

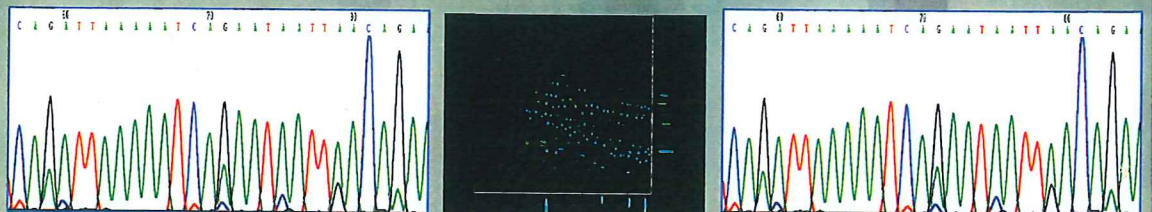


DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS

Tesis Doctoral

**EPIGENÉTICA DEL DESARROLLO
ONTOGÉNICO EN *Pinus radiata* D. Don.
IMPLICACIONES EN PROCESOS
PRODUCTIVOS**

María Berdasco Menéndez





Universidad de Oviedo



Departamento de Biología de
Organismos y Sistemas

TOMÁS EMILIO DÍAZ GONZÁLEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CERTIFICA

Que la memoria titulada "**Epigenética del desarrollo ontogénico en *Pinus radiata* D. Don. Implicaciones en procesos productivos**", que para aspirar al grado de Doctora en Biología presenta la Licenciada **María Berdasco Menéndez**, ha sido realizada bajo la dirección de los Profesores Dr. Roberto Rodríguez Fernández y Dra. María Jesús Cañal Villanueva, en la Unidad de Fisiología Vegetal de dicho Departamento, y considerando que representa trabajo de Tesis Doctoral, autoriza su presentación.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Oviedo, a 1 de Junio de 2005.

Fdo.: Tomás E. Díaz

Departamento B.O.S.
C/ Catedrático Rodrigo Uría, s/n.
33071 Oviedo - ESPAÑA
Tlfs. 985 10 47 74 / 985 10 47 76
fax 985 10 47 77



Universidad de Oviedo



Departamento de Biología de
Organismos y Sistemas

ROBERTO RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL Y MARÍA JESÚS CAÑAL VILLANUEVA, PROFESORA TITULAR DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CERTIFICAN

Que la memoria presentada por la Licenciada **María Berdasco Menéndez**, titulada "**Epigenética del desarrollo ontogénico en *Pinus radiata* D. Don. Implicaciones en procesos productivos**", ha sido realizada bajo su dirección en la Unidad de Fisiología Vegetal de dicho Departamento, y considerando que representa trabajo de Tesis Doctoral, autorizan su presentación.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en Oviedo, a 1 de Junio de 2005.

Fdo.: Roberto Rodríguez

Fdo.: María Jesús Cañal



Melchor Fernández Almagro, 3
E 28029- MADRID
Tfnos: +34 917328000
+ 34 912246900
Fax: + 34 912246980

MARIO FERNÁNDEZ FRAGA, DOCTOR INVESTIGADOR DEL GRUPO DE
EPIGENÉTICA DEL CÁNCER DEL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
ONCOLÓGICAS

CERTIFICA

Que la memoria presentada por la Licenciada **María Berdasco Menéndez**, titulada
“**Epigenética del desarrollo ontogénico en *Pinus radiata* D. Don. Implicaciones en
procesos productivos**”, ha sido realizada bajo su dirección en dicho centro, y
considerando que representa trabajo de Tesis Doctoral, autoriza su presentación.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid, a 1 de Junio de 2005.



Fdo.: Mario F. Fraga

INDICE

CAPÍTULO 1. Introducción.

1.1. Envejecimiento vegetal, una barrera al desarrollo de Programas de Mejora en especies leñosas.	1
1.1.1. Contexto actual del problema.	1
1.1.2. Envejecimiento, maduración y revigorización en especies forestales.	3
1.1.3. <i>Pinus radiata</i> D. Don. Particularidades e interés económico.	6
1.2. Bases de la diferenciación y del desarrollo en organismos eucariotas.	7
1.3. Factores reguladores de la cromatina en plantas.	8
1.4. Modificaciones posttranscripcionales de histonas.	11
1.4.1. Fosforilación de histonas.	15
1.4.2. Metilación de histonas.	15
1.4.3. Acetilación de histonas.	17
1.4.4. Particularidades en las modificaciones de histonas exclusivas en plantas.	22
1.5. Metilación del ADN.	24
1.5.1. ADN metiltransferasas en plantas.	25
1.5.2. Mecanismos de demetilación.	29
1.5.3. Implicaciones de la metilación del ADN en plantas.	30
1.5.4. Peculiaridades de la metilación del ADN en plantas.	31
1.6. Conexiones metabólicas existentes entre la metilación del ADN y la acetilación de histonas, una prueba más a favor del código epigenético.	32
1.7. Planteamiento y objetivos.	34
1.8. Bibliografía.	38

CAPÍTULO 2. Dinámica temporal y espacial de la metilación del ADN durante el desarrollo ontogénico de *Pinus radiata* D. Don

2.1. Introducción.	55
2.2. Material y métodos.	58
2.2.1. Material vegetal.	58
2.2.1.1. Efecto del genotipo.	59
2.2.1.2. Efecto del desarrollo ontogénico y cambio de fase.	59
2.2.1.3. Efecto de la aplicación de podas intensivas sobre cepas madre.	61

2.2.2. Cuantificación del grado de metilación global del ADN genómico mediante HPCE.	61
2.3. Resultados.	63
2.3.1. Efecto de la procedencia sobre los niveles específicos de 5- mdC en plántulas.	63
2.3.2. Niveles de 5-mdC genómica dependientes del estado de desarrollo ontogénico y del grado de maduración del órgano.	64
2.3.2.1. Dinámica de metilación en ápices caulinares.	64
2.3.2.2. Cambios de metilación del ADN durante la ontogénesis de fascículos aciculares.	65
2.3.2.3. Cambios de metilación del ADN en primordios aciculares b1 de fases maduras vegetativas y fases maduras reproductivas.	66
2.3.3. Dinámica reversible de metilación del ADN inducida por revigorización	66
2.4. Discusión.	68
2.5. Bibliografía.	70

CAPÍTULO 3. Metilación del ADN genómico y distribución de 5-metilcitosina como indicadores de diferenciación y de adquisición de competencia reproductiva en *Pinus radiata* D. Don.

3.1. Introducción.	73
3.2. Material y métodos.	75
3.2.1. Material vegetal.	75
3.2.2. Análisis histológico de los primordios aciculares.	75
3.2.3. Inmunolocalización de 5-metilcitosina.	76
3.2.4. Cuantificación del grado global de metilación genómica mediante HPCE.	77
3.3. Resultados.	78
3.3.1. Organización de primordios aciculares.	78
3.3.2. Inmunolocalización de 5-mC en primordios aciculares.	80
3.3.3. Niveles globales de metilación del ADN genómico (HPCE).	82
3.4. Discusión.	84
3.5. Bibliografía.	86

CAPÍTULO 4. Hiperacetilación/hipoacetilación de histona H4 asociada a la competencia vegetativa/reproductiva en *Pinus radiata* D. Don.

4.1. Introducción.	89
4.2. Material y métodos.	92
4.2.1. Material vegetal.	92
4.2.2. Análisis histológico de los primordios aciculares b1.	92
4.2.3. Inmunolocalización de histona H4 acetilada.	92
4.2.4. <i>Western blotting</i>	93
4.2.4.1. Extracción proteica.	93
4.2.4.2. Separación proteica mediante electroforesis.	94
4.2.4.3. Transferencia proteica a membrana de nylon.	94
4.2.4.4. Inmunodetección de histona H4 acetilada.	95
4.3. Resultados.	96
4.3.1. Inmunolocalización de histona H4 acetilada en fases vegetativas y reproductivas.	96
4.3.2. Inmunodetección de histona H4 acetilada mediante <i>Western blotting</i> en fases vegetativas y fases reproductivas.	98
4.4. Discusión.	99
4.5. Bibliografía.	101

CAPÍTULO 5. ¿Son los niveles de histona H4 acetilada indicadores de fase de desarrollo?. Validación de la propuesta en individuos adultos revigorizados y en órganos con grado de diferenciación variable de *Pinus radiata* D. Don.

5.1. Introducción.	105
5.2. Material y métodos.	107
5.2.1. Material vegetal.	107
5.2.2. Organización de primordios aciculares.	107
5.2.2.1. Inclusión en Epon de primordios b0.	108
5.2.2.2. Inclusión en Lowicryl de primordios b0.	109
5.2.2.3. Análisis de la estructura general de primordios b0 y b1 mediante contraste DIC.	112
5.2.3. Determinación de la actividad proliferativa mediante inmunolocalización de Ciclina B1.	112

5.2.4. Inmunolocalización de histona H4 acetilada.	113
5.2.5. <i>Western blotting</i> para la detección de histona H4 acetilada.	113
5.3. Resultados.	114
5.3.1. Organización de primordios aciculares durante las fases del desarrollo ontogénico.	114
5.3.2. Organización de la estructura de primordios aciculares localizados sobre ramas revigorizadas (brote epicórmico)	114
5.3.3. Cambios en la actividad proliferativa dependientes de edad ontogénica y de revigorización.	118
5.3.4. Variaciones de histona H4 acetilada dependientes de desarrollo ontogénico.	120
5.3.5. Efecto de la revigorización sobre los niveles de histona H4 acetilada en primordios aciculares.	122
5.4. Discusión.	125
5.5. Bibliografía.	130

CAPÍTULO 6. Detección mediante microarrays de los cambios de expresión génica inducidos por tratamientos con 5- Aza 2'- deoxicitidina en suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana*.

6.1. Introducción.	133
6.2. Material y Métodos.	135
6.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	135
6.2.2. Tratamiento de cultivos celulares con 5-Aza 2'-deoxicitidina.	135
6.2.3. Análisis de la expresión génica mediante microarrays (GeneChip ® de Affymetrix®).	135
6.2.4. Cuantificación de la metilación global del ADN genómico mediante HPCE.	136
6.2.5. Metilación en dinucleótidos CpG (ensayo de actividad de <i>SssI</i> metilasa).	136
6.3. Resultados.	138
6.3.1. Efecto de Aza-dC sobre las tasas de proliferación de suspensiones celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i>	138
6.3.2. Hipometilación global del ADN genómico inducida por tratamiento con Aza-dC.	138
6.3.3. Determinación mediante microarrays de los cambios en los niveles de expresión génica.	139
6.4. Discusión.	144
6.5. Bibliografía.	153

CAPÍTULO 7. Represión epigenética en suspensiones celulares desdiferenciadas de *Arabidopsis thaliana*.

7.1. Introducción.	157
7.2. Material y métodos.	159
7.2.1. Material vegetal.	159
7.2.2. Secuencias analizadas en los estudios de metilación sitio específica.	159
7.2.3. Análisis del estado de metilación de islas CpG en promotores de genes específicos mediante secuenciación genómica de bisulfito.	160
7.2.3.1. Modificación del ADN genómico con bisulfito sódico.	160
7.2.3.2. Amplificación selectiva de genes candidatos modificados con bisulfito sódico mediante PCR.	160
7.2.3.3. Secuenciación del ADN modificado con bisulfito sódico.	161
7.2.4. Análisis de los niveles de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa.	161
7.2.4.1. Síntesis de ADNc.	161
7.2.4.2. Amplificación selectiva mediante PCR.	161
7.2.5. Ensayo de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).	162
7.3. Resultados.	163
7.3.1. Análisis de la metilación de islas CpG en promotores de genes específicos. ..	163
7.3.2. Represión génica asociada a hipermetilación de promotores.	166
7.3.3. Cambios en la acetilación y metilación de histonas dependientes de tejido. ...	166
7.4. Discusión.	168
7.5. Bibliografía.	173
 CAPÍTULO 8. Conclusiones.	 177

ABREVIATURAS

3mK4H3	Histona H3 trimetilada en la lisina 4 del extremo N-terminal
5-mC	5-metil - citosina
5-mdC	5-metil-2' deoxicitidina
AC	Ápice caulinar
AC ap	Porción apical del ápice caulinar
AC bas	Porción basal del ápice caulinar
AcH3	Histona H3 tetraacetilada
AcH4	Histona H4 tetraacetilada
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia de ARN
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	ARN copia
ARNm	ARN mensajero
Aza-dC	5- Aza- 2' deoxicitidina
BE	Brote epicórmico
CACTA	Elementos transponibles del genoma con elementos repetitivos ricos en secuencias de nucleótidos citosina-adenina-citosina-timina-adenina
CDKs	Proteínas kinasas dependientes de ciclinas
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CMT	Enzimas cromometiltransferasas
CpG	Dinucleótido citosina-guanina
^m CpG	Metilación de citosinas en dinucleótidos CpG
CpNpG	Trinucleótido citosina-cualquier base-guanina
CpApG	Trinucleótido citosina-adenina-guanina
^m CpApG	Metilación de citosinas en trinucleótidos CpApG
CpTpG	Trinucleótido citosina-timina-guanina
^m CpTpG	Metilación de citosinas en trinucleótidos CpTpG
CYCs	Ciclinas
CYCA	Ciclina tipo A
CYCB	Ciclina tipo B
CYCB1	Ciclina tipo B1
CYCD	Ciclina tipo D
DAPI	4,6 Diamidino 2- fenilindol

dC	2' deoxicitidina
DIC	Contraste diferencial de interferencia o contraste de Nomarsky
DNMTs	Enzimas metiltransferasas de ADN
EP	Epidermis
FA	Fascículo acicular
FA ap	Porción apical del fascículo acicular
FA bas	Porción basal del fascículo acicular
GSTF5	Glutation S-transferasa tipo <i>phi</i>
H1	Histona tipo 1
H2A	Histona tipo 2A
H2B	Histona tipo 2B
H3	Histona tipo 3
H4	Histona tipo 4
HATs	Enzimas acetiltransferasas de histonas
HDACs	Enzimas deacetilasas de histonas
HIP	Hipodermis
HMTs	Enzimas metiltransferasas de histonas
HPCE	Electroforesis Capilar de Alta Resolución
IA	Índice relativo de acetilación
J1	Fase juvenil temprana
J2	Fase juvenil tardía
MA	Meristemo apical
MES	Mesófilo
MET	DNMTs tipo I
MR	Fases maduras reproductivas
MV	Fases maduras vegetativas
Primordios b0	Primordios aciculares de 10-20 días de desarrollo
Primordios b1	Primordios aciculares de 1 mes de desarrollo
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional
R1	Cepas madre con 4 turnos de poda
R2	Cepas madre con 8 turnos de poda
RB	Roseta basal
SC	Suspensiones celulares
SLR	Nivel de significación del cambio entre las muestras
SssI	Enzima metiltransferasa de ADN de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
SUVH8	Proteína con actividad metiltransferasa de histonas en plantas

TGS	Silenciamiento génico transcripcional
TTG1	Transparent Testa Glabra 1
VASC	Sistema vascular

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1.1. Envejecimiento vegetal, una barrera al desarrollo de procesos productivos y programas de mejora en especies leñosas.

1.1.1. Contexto actual del problema.

Los árboles son componentes esenciales del medio natural que juegan un papel crucial en el equilibrio global de los ecosistemas, proporcionando además materias primas a industrias transformadoras. Se estima que para el año 2010 los países desarrollados requerirán de unos 50–100 millones de hectáreas plantadas para abastecer sus industrias. A pesar de su importancia desde el punto de vista medioambiental, económico y social, se conoce poco de los mecanismos básicos que regulan la productividad forestal. Este hecho es sorprendente, puesto que la comprensión de estos mecanismos guiaría los esfuerzos dirigidos tanto a asegurar la preservación a largo plazo como a la mejora de la calidad y productividad forestal.

La propagación de especies de interés forestal es primordial, tanto para la multiplicación en masa de genotipos seleccionados, como para potenciar y dinamizar la ganancia genética en programas de mejora. En especies leñosas, como *Pinus radiata* D. Don la propagación en masa de individuos élite, en general, no es factible. La edad del árbol es un factor limitante ya que en la fase adulta de desarrollo se produce un descenso generalizado de la capacidad regenerativa y de la competencia morfogénica, siendo precisamente en esta fase cuando se manifiesta las características de interés tales como la cantidad y calidad de madera, volumen de producción, vigor o crecimiento. Desde el punto de vista práctico tenemos que conformarnos con multiplicar individuos

juveniles, y basar los programas de mejora en el comportamiento de árboles adultos puesto que sólo en fase adulta los individuos exhiben las características que deben ser evaluadas para su selección. La baja capacidad de propagación de tejidos adultos, junto con características inherentes a la biología de árboles como gran tamaño de genomas o largos ciclos de vida, hacen que la mejora y, por tanto la producción forestal, esté condicionada a:

- i) la optimización de la propagación vegetativa de árboles adultos seleccionados,
- ii) la determinación de marcadores que permitan predecir la calidad de los árboles adultos mediante la selección temprana de fenotipos con caracteres deseables,
- iii) el desarrollo de tecnologías eficaces de transferencia que permitan introducir genes funcionalmente útiles en programas de mejora.

Pero para rentabilizar esta mejora es necesario:

- i) identificar y comprender la función de los genes que controlan aspectos básicos del desarrollo,
- ii) conocer cómo fluctúa la expresión de estos genes,
- iii) identificar cuáles son los mecanismos de regulación de la expresión de estos genes durante el desarrollo vegetal

En los últimos años se han iniciado varios programas (*European Forest Genomic, Red Nacional de Genómica Forestal*), cuyo objetivo es el análisis a gran escala de genomas arbóreos, abarcando aspectos como la Genómica Funcional de la formación de madera, biomasa, madurez, propagación, reproducción, resistencia a enfermedades y la adaptación a cambios ambientales. La posibilidad efectiva de identificar globalmente genes funcionalmente relacionados con la productividad forestal a través de estudios genómicos abre una vía importantísima para transferir genes útiles a los programas de mejora, y desarrollar mapas funcionales que puedan ser utilizados para la selección asistida por marcadores. Además, pueden utilizarse estas mismas herramientas como indicadores precisos de diagnóstico para el control de la

productividad forestal. Esta posibilidad acelerará el ritmo de mejora y permitirá incrementar la productividad y calidad de los árboles, lo que llevará a conseguir el desarrollo sostenible de sistemas naturales y explotaciones. A pesar del valor añadido que la identificación de genes específicos puede aportar a procesos productivos, debe tenerse en consideración que lo verdaderamente importante no es la presencia-ausencia sino su control.

1.1.2. Envejecimiento, maduración y revigorización en especies forestales.

El desarrollo ontogénico de leñosas abarca varias etapas caracterizadas por la expresión de diferentes competencias morfogénicas (Figura 1.1):

- i) *Fase embrionaria*, desde la formación del eje embrionario a partir del cigoto hasta la formación del embrión maduro que se mantiene en dormición hasta la germinación.
- ii) *Fase juvenil*, a partir de la germinación del embrión hasta la adquisición de la capacidad de floración tras el cambio de fase juvenil-adulto. Puesto que la adquisición de la capacidad de reproducción es un proceso que transcurre de forma gradual, existen etapas transitorias con características intermedias entre estados juveniles y maduros que pueden englobarse en la fase adulta vegetativa.
- iii) *Fase adulta reproductiva*, determinada principalmente por la adquisición y mantenimiento de la capacidad de floración.

Aunque la pérdida de competencia morfogénica es un proceso gradual, el mayor descenso se produce durante el cambio de fase que, a su vez, implica la pérdida brusca de capacidad de enraizamiento, crecimiento plagiotrópico y, específicamente, adquisición de la capacidad de evocación y manifestación floral; alteraciones que conllevan pérdida generalizada del vigor o envejecimiento fisiológico (Franclet et al., 1987). Precisamente esta pérdida de vigor es la característica principal que permite definir los conceptos de maduración y envejecimiento ya que, mientras que el envejecimiento implica la pérdida gradual de vigor, y eventualmente senescencia y

muerte, la maduración se refiere a cambios específicos relacionados, sobre todo, con el estado fisiológico que permite la inducción de la evocación floral (Borchert, 1976).



Figura 1.1. Etapas del desarrollo ontogénico en especies leñosas y principales características asociadas a estados vegetativos y reproductivos. El ciclo ontogénico puede ser revertido parcialmente mediante la aplicación de técnicas de revigorización.

La recuperación, al menos en parte, del vigor característico de etapas juveniles sin que medie reproducción sexual, pasa por la revigorización parcial del material adulto. En este punto cabe destacar que la recuperación total de las características juveniles, fenómeno denominado rejuvenecimiento, implicaría la reversión completa del proceso de maduración (Hackett, 1985) como resultado de la reproducción sexual (Pennel & Bell, 1987) o de la propagación vegetativa a través de formación de yemas adventicias y embriones somáticos (Bonga & von Aderkas, 1988).

Mediante la aplicación de técnicas específicas sobre individuos en fase adulta es posible la recuperación de algunas características propias de fases juveniles, sin embargo en este caso no se debe hablar de rejuvenecimiento total sino de revigorización. Además, mediante el empleo de técnicas de revigorización la reversión de los distintos caracteres, que conllevan cambios en las potencialidades morfogénicas asociados a la maduración, no se producen simultáneamente ni con la misma facilidad (Hackett & Murray, 1993). Las alternativas utilizadas para inducir revigorización y

permitir la clonación de árboles adultos, se pueden agrupar bajo tres metodologías generales (Tabla 1.1), que presentan diferentes grados de dificultad para su aplicación y diferentes grados de respuesta de revigorización: utilizando tejidos juveniles del árbol, cuyo crecimiento puede ser natural o inducido -forzado- mediante podas severas, aplicando tratamientos de revigorización *in vivo* y aplicando estos mismos tratamientos *in vitro*. A menudo, los mejores resultados se obtienen cuando se combinan diferentes métodos y especialmente cuando se aplican de forma secuencial (Pierik, 1990). Aunque existen evidencias macromorfológicas de que es posible inducir la revigorización de ciertos tejidos vegetales, también es cierto que los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en los procesos de envejecimiento y revigorización no se conocen en profundidad.

	MÉTODO	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
Tejidos Juveniles	Esferoblastos	Ocasional	<i>Pierik, 1990; Borchert, 1976; Ahuja, 1987; Fortanier & Jonkers, 1976</i>
	Brotos epicórmicos	Ocasional	
	Yemas florales	Pocos ejemplos	
	Brotos basales	Ocasional	
	Tallos de raíz	Ocasional	
	Yemas de rama lateral	Siempre	
Tratamiento <i>in vivo</i>	Aplicación de citoquininas	Pocos ejemplos	<i>Thorpe & Hield, 1970 ; Ballester et al., 1990</i>
	Podas intensivas	Ocasional	
	Injerto (cascada)	Incompatibilidad	
	Etiolación	Trabajoso	
	Enraizamiento de esquejes	Pocos ejemplos	
Tratamiento <i>in vitro</i>	Subcultivo continuado	Ocasional	<i>Meynier, 1985 ; Ballester et al. 1990; Oliphant, 1990; Fraga et al., 2002</i>
	Recultivo horizontal	Pocos ejemplos	
	Miniaturización	Pocos ejemplos	
	Yemas adventicias	Inducción difícil	
	Embriogénesis asexual	Inducción difícil	
	Microinjerto	Incompatibilidad	

Tabla 1.1. Alternativas de revigorización de materiales adultos. En negrilla aparecen las alternativas o tratamientos de revigorización utilizados en la Tesis.

1.1.3. *Pinus radiata* D. Don. Particularidades e interés económico.

El pino insigne o pino de Monterrey (*Pinus radiata* D. Don) pertenece al Orden Coniferales, Familia Pináceas, constituyendo dentro de este orden, la especie que presenta mayor tasa de crecimiento en distintos tipos de suelo. Esta característica, unida a las propiedades de su leño, convierten al pino insigne en una de las alternativas más interesantes para la producción industrial de pulpa, papel y madera aserrada. De hecho, la producción mundial anual de madera a partir de plantaciones de *P. radiata* se estima en 370 millones de m³, lo cual supone, al menos, un 25% de la producción mundial total.

El área de distribución autóctona de esta especie es bastante reducida, y se encuentra prácticamente restringida a algunas regiones costeras de California. El clima de estas regiones se caracteriza por precipitaciones medias anuales de 424 a 761 mm, con un régimen invernal (70-75%) y humedad relativa alta, que en invierno se mantiene entre un 60 y un 70%. Las temperaturas medias son de 10 °C en invierno y de 14 °C en verano, y las temperaturas extremas absolutas son -6,7 °C y 42 °C. Los suelos de dicha zona son profundos, bien drenados, pero bastante húmedos, de texturas livianas y originados de granito o de margas arenosas. Sin embargo, el gran potencial económico de la especie ha inducido su expansión artificial, de modo que actualmente pueden encontrarse plantaciones comerciales en Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Chile y España.

Los individuos de *P. radiata* se caracterizan por presentar porte erecto, llegando a alcanzar en algunos casos alturas superiores a los 50 metros, desarrollo sólo superado por algunas especies del género *Eucalyptus*. Sus ramas, persistentes, se desarrollan a modo de verticilos. Presenta hojas aciculares que se agrupan en fascículos de tres (de 7 a 20 cm de longitud). El cambio de fase acontece, generalmente, en torno a los ocho años de edad, momento en que comienza a desarrollar conos ovoides -cónicos (de 5 a 20 cm de largo) capaces de producir hasta 200 semillas cada uno. Estos conos comienzan a madurar en febrero, dos años después de la polinización, y pueden persistir sobre el árbol durante períodos largos de tiempo, que oscilan entre los seis y los veinte años.

La madera de esta especie es liviana, blanda, poco durable, permeable y de baja resistencia mecánica; características que determinan que un 40% del volumen total esté destinado a la producción de pulpa y papel, un 35% a madera aserrada y el resto a tableros y otros productos, tales como cerchas, paneles, pisos, cielos, revestimientos exteriores e interiores, etc.

1.2. Bases de la diferenciación y del desarrollo en organismos eucariotas.

Los avances de los grandes Proyectos de Secuenciación del Genoma, a destacar entre los animales el genoma humano (<http://www.genome.gov>), *Rattus* sp (http://www.argosbiotech.de/700/omics/genomics/mo/sp_rattus.htm) y *Caenorhabditis elegans* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans), y los Proyectos de Secuenciación de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org>) y *Populus* sp. (<http://www.oinl.gov/sci/jpsc/>) entre las plantas, han dado lugar a la explosión de numerosos conocimientos acerca de la estructura génica y la función celular. Sin embargo, aun continúa siendo un enigma cómo las células de un organismo, con idéntico genotipo, pueden diferenciarse y generar tejidos específicos en el momento adecuado, en el tiempo correcto y bajo determinadas condiciones ambientales, o lo que es lo mismo, siguiendo un orden espacio-temporal.

Hay que tener en cuenta que el fenotipo no está sólo determinado por la estructura primaria del ADN (la secuencia de bases de nucleótidos). Disponer solo de la secuencia génica no es suficiente, ya que no se contemplan aspectos celulares que potencialmente pueden influir en la actividad celular, tales como las interacciones proteína-proteína o la localización subcelular. Por otro lado, a partir de la secuencia genómica no puede extrapolarse que un gen se vaya a traducir hacia una proteína o que ejerza su función en forma de ARN. Además, la mayor parte de los caracteres fenotípicos de un organismo no están codificados por un solo gen, sino que vienen determinados por la actividad de sistemas multigénicos. De ahí, que consideremos la diferenciación como el resultado de microambientes distintos para núcleos genéticamente iguales.

Sin embargo, no seremos capaces de entender la expresión específica de genes sin considerar la información no contenida directamente en la secuencia de nucleótidos

y de aminoácidos, es decir, sin descifrar los mecanismos de control de la expresión génica en función del espacio y del tiempo, denominándose código epigenético al conjunto de variaciones-alteraciones bioquímicas que acontecen sobre la cromatina y que confieren información definitiva.

Los factores epigenéticos afectan a macromoléculas, proteínas y ácidos nucleicos, alterando su patrón de actividad. Por tanto, los factores epigenéticos regulan la expresión génica específica mediante modificaciones: transcripcionales, post-transcripcionales, translacionales y post-translacionales. La epigenética no opera mediante mutaciones, sino que actúa a través de modificaciones del ADN más versátiles que permiten la interacción específica entre factores de transcripción espaciales y temporales, directamente con la molécula de ADN o indirectamente mediante la interacción del material genético con componentes de señalización derivados de factores ambientales. Al igual que la información genética, la información epigenética es heredable, sin embargo no es estática presentándose como una información versátil y dinámica que representa la unión entre el continuo cambio ambiental y el organismo.

Estas alteraciones transitorias de los nucleótidos constituyen marcas moleculares de procesos biológicos tales como replicación o transcripción génica, así como perfiles de expresión génica de citodiferenciación y de desarrollo ontogénico. Los fenómenos epigenéticos tienen un papel fundamental en el control de procesos biológicos, tales como imprinting genómico, desarrollo embriogénico y procesos de citodiferenciación, maduración sexual o senescencia, entre otros. Las implicaciones de los factores epigenéticos en el control de la expresión génica y conformación de la cromatina pueden agruparse en función del tipo de macromolécula que resulte modificada: *i*) modificaciones de proteínas de la cromatina (Apartado 1.4.); modificaciones sobre la molécula del ADN (Apartado 1.5.); *iii*) modificaciones sobre el ARN o silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS).

1.3. Factores reguladores de la cromatina en plantas.

Cada vez está más aceptada la idea de que la cromatina no constituye solo el mecanismo de compactación o agrupamiento del material genético dentro del núcleo, sino que también debe entenderse como una estructura dinámica que varía en respuesta

a cambios en el ambiente celular. El control preciso de las modificaciones acontecidas en la estructura de la cromatina en respuesta a estas variaciones ambientales y de desarrollo determina la expresión génica a lo largo del tiempo y del espacio. La cromatina influye en el desarrollo de todos los procesos biológicos nucleares, tales como replicación, recombinación, reparación del material genético y transcripción génica.

Los primeros estudios acerca de la estructura y función de la cromatina en plantas fueron realizados a principios de la década de los 70 (Spiker & Krishnaswamy, 1973; McGhee & Engel, 1975). A pesar que estos estudios se encontraban seriamente limitados por la inexistencia de sistemas de transcripción *in vitro*, el interés suscitado tanto por su implicación en los mecanismos de silenciamiento génico y otros procesos epigenéticos (Matzke & Matzke, 1998; Wolffe & Matzke, 1999) como por el descubrimiento de que muchos factores remodeladores de la cromatina condicionan el desarrollo vegetal (Jeddeloh et al., 1999; Ogas et al., 1999; Eshed et al., 1999), impulsó el avance de las investigaciones concernientes a la regulación de la estructura de la cromatina. Actualmente, las investigaciones concernientes a la cromatina en plantas representan un pilar fundamental hacia la comprensión de los papeles desempeñados por los factores remodeladores de la cromatina durante el desarrollo, prestándose especial atención a la caracterización bioquímica y molecular de muchos de los factores y complejos que modifican la estructura cromatínica (Francis & Kingston, 2001; Narlikar et al., 2002).

Las investigaciones en plantas tienen la ventaja de que, a diferencia de lo que ocurre en animales, donde mutaciones en factores remodeladores de la cromatina conllevan efectos letales, en plantas se dispone de mutaciones similares que permiten la viabilidad de los individuos y que acaban generando un amplio rango de anomalías fisiológicas y fenotípicas manifiestas a lo largo del ciclo vital de la planta. Actualmente, se encuentran descritas numerosas mutaciones en homólogos de factores remodeladores de la cromatina de metazoos que conllevan anomalías en plantas (Tabla 1.2.).

Complejo homólogo en metazoos	Subunidad central (actividad bioquímica)	Efecto sobre la cromatina	Región del cromosoma modificada	Efecto sobre transcripción	Factor en plantas
Ensamblaje de la cromatina					
CAF1		Deposición de histonas	Global		FAS1, FAS2 (Tyler et al., 1999)
Asf1	TSL-like (kinasa)	Deposición de histonas	Global		TSL? (Roe et al., 1999)
Remodelación de la cromatina, regulación de la transcripción y memoria transcripcional					
<i>Factores que influyen en la posición y/o conformación del nucleosoma</i>					
Snf2/Brm	SWI/SNF (ATPasa)	Alteración estable de la posición y conformación del nucleosoma	Local/ promotor	Activación o represión	SYD (Wagner & Meyerowitz, 2002)
ISWI SWR1/Domi no	SWI/SNF (ATPasa)	Alteración de la posición del nucleosoma, reprogramación?	Global?	Activación o represión	AtISWI (Wagner, 2003)
<i>Factores implicados en la modificación de la cromatina</i>					
- Acetilación de histonas: HATs tipo A (nuclear)					
Familia GNAT	Gcn5 (HAT)	Acetilación de histonas	Local	Activación	AtGCN5
p300/CBP	p300/CBP (HAT)	Acetilación de histonas	Local	Activación	p300/CBP
- Deacetilación de histonas (HDACs)					
NurD	RPD3 (HDAC)	Deacetilación de histonas	Global?	Represión	HD1; HDA6
NurD	Mi-2 (ATPasa)		Global?	Represión?	PKL
-	-	Deacetilación de histonas		Represión	HD2 (HDAC)
Factores del grupo Policomb (PcG)					
E(z)/Esc	RPD3 (HDAC)	Deacetilación de histonas	Local	Represión	CLF, MEA, FIE (Goodrich et al., 1997; Meyerowitz, 2002)
E(z)/Esc	E(z), Esc	Unión al complejo de represión?		Represión	
Su(z)12				Represión	FIS2, VRN2, EMF2 (Luo et al., 2000; Chaudhury et al., 2001; Gendall et al., 2001; Yoshida et al., 2001)
Silenciamiento y formación de heterocromatina					
Metilación de histonas					
Su(var)3-9	Su(var)3-9 (HMT)	Metilación de histonas	Global	Represión	KYP
Metilación del ADN					
-	-	Mantenimiento de la metilación CpNpG	Global	Represión	CMT3 (DNMT)
-	Dnmt1 (DNMT)	Mantenimiento de la metilación CpG	Global	Represión	MET1, DDM2
-	Dnmt3 (DNMT)	Metilación del AND de novo	Global	Represión	DRM1, DRM2
-	Lsh (SWI/SNF ATPasa)	Metilación del ADN	Global	Represión	DDM1
-	-	Silenciamiento de transgenes	Global	Represión	MOM1 (SWI/SNF ATPasa)
Heterocromatina					
HP1		Condensación	Global	Represión	LHP1, TFL2 (Gaudin et al., 2001)

Tabla 1.2. Mutantes de plantas para factores remodeladores de la cromatina y metilación del ADN, agrupados en base a su actividad en sus homólogos en metazoos. Tomado de Wagner (2003).

1.4. Modificaciones posttranscripcionales de histonas.

A pesar de que las histonas mantienen una secuencia conservada entre especies, especialmente las histonas H3 y H4, pueden presentar gran variabilidad y dinamismo. Esta “paradoja” está condicionada por la susceptibilidad que presentan determinados aminoácidos constituyentes de las colas o extremos de las histonas a sufrir modificaciones covalentes de adición/eliminación de grupos químicos. Estas modificaciones no afectan por igual a los distintos tipos de histona, ni se mantienen estables en una histona determinada a lo largo del ciclo vital y de la diferenciación del individuo. Entre estas modificaciones covalentes se incluyen reacciones de acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, ADP ribosilación, carbonilación, sumolación y biotinilación, causando todas ellas reordenamientos estructurales y funcionales de la cromatina. En la Figura 1.2. se recogen los residuos aminoacídicos que se ven afectados y el grupo químico que se adiciona en cada tipo de histona.

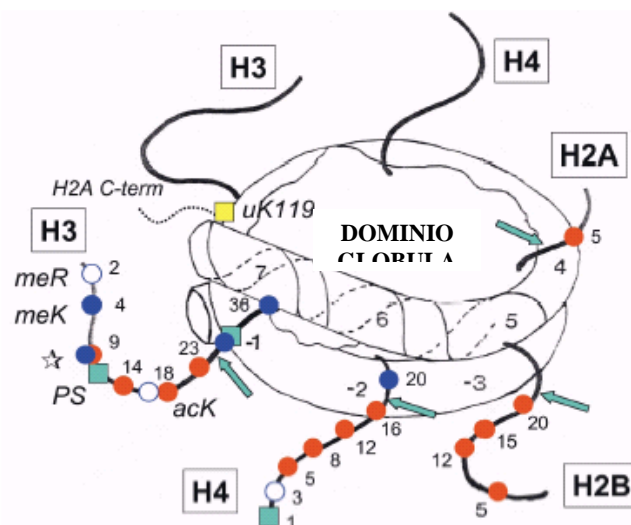


Figura 1.2. Núcleo del nucleosoma con los dominios terminales, colas de histonas, y sus modificaciones covalentes post-transcripcionales más importantes. Solo se muestran las modificaciones en una de cada dos copias de los 4 tipos de histonas. Los números existentes a lo largo de la molécula de ADN indican la posición de los nucleótidos en cada vuelta de la superhélice. Las flechas verdes indican sitios susceptibles de rotura con tratamientos con tripsina en nucleosomas intactos. Representación de las modificaciones: acetilación de lisina (acK; círculos rojos); metilación de lisina (meK; círculos azules); metilación de arginina (meR; círculos blancos); fosforilación de serina (PS, cuadrados verdes); ubiquitinación de lisina (uK; cuadrado amarillo). Tomado de Spootswood & Turner (2002).

La función de cada una de estas modificaciones todavía no se conoce con exactitud en todos los casos pero, debido a su importante papel en la regulación de la compactación de la cromatina y consecuentemente por su implicación en el control de procesos biológicos tales como replicación del ADN o transcripción génica, son numerosas las investigaciones focalizadas en estos aspectos. A pesar de que en algunos casos se ha podido vincular la modificación de histona con un proceso biológico concreto (Tabla 1.3), por ejemplo acetilación y transcripción génica, cada día toma mayor validez la denominada hipótesis del “código de histonas” (Strahl & Allis, 2000; Jenuwein & Allis, 2001; Turner, 2002), en la que se propone que las modificaciones de las histonas actúan de modo secuencial o en combinación para regular el desarrollo de los procesos biológicos.

Debe destacarse la cantidad de información epigenética que puede estar contenida en los residuos terminales de las histonas. Existen descritas 50 isoformas de histonas acetiladas (H2B, H3 y H4 tienen 16 isoformas, H2A tiene dos isoformas) que, además, pueden estar sujetas a modificación mediante metilación de lisinas o de argininas (H3 y H4) o fosforilación de serinas (H3, H4, H2B). Además, si tenemos en cuenta que la metilación de histonas puede implicar la adición de uno, dos o tres grupos metilo y que también pueden existir otras modificaciones menos comunes como ubiquitinación o ADP ribosilación, el número total de posibles isoformas de histonas modificadas con distintas combinaciones puede extenderse a miles (Spotswood & Turner, 2002). Este código es reconocido e interpretado por reguladores transcripcionales y elementos de la maquinaria de factores remodeladores de la cromatina. Sin embargo, todavía quedan por responder diversas preguntas: cómo se lee este código, cómo se establecen los patrones y cómo son mantenidos en regiones concretas de la cromatina o quién lee cada parte del código.

Ahora bien, la información epigenética no se relega solo a las modificaciones de histonas sino que también puede estar contenida en la propia molécula del ADN, tal como ocurre con la metilación del ADN. Se han descrito numerosas interacciones entre las vías de actuación de las modificaciones de histonas, tales como acetilación y metilación, con el proceso de metilación del ADN (Apartado 1.5). Este hecho ha llevado a la reformulación de un nuevo término, el denominado “código epigenético” (Turner, 2000; Spotswood & Turner, 2002) en el que se agrupan todas las combinaciones posibles que controlan epigenéticamente el desarrollo de procesos biológicos.

SITIO	ENZIMA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA
HISTONA H3				
R2-Me	CARM1	<i>Mm, Hs</i>	Metilación in vitro	Chen et al., 1999 ; Schurter et al., 2001
K4-Me	-	<i>Tt</i>	Activación de la transcripción	Strahl et al., 1999
	Set1	<i>Sc</i>	Silenciamiento ADNr, silenciamiento de telómeros	Briggs et al., 2001 ; Roguev et al., 2001 ; Nagy et al., 2002 ; Bryk et al., 2002
	Set1	<i>Sc</i>	Activación de la transcripción	Bernstein et al., 2002; Santos-Rosa et al., 2002
	SET7/Set9	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Wang et al.,2001a; Nishioka et al., 2002a ; Zegerman et al., 2002
	Trx/MLL	<i>Dm, Hs</i>	Activación de Trithorax	Czerman et al., 2002; Milne et al., 2002 ; Nakamura et al., 2002
K9Ac	Ash1	<i>Dm</i>	Activación de Trithorax	Beisel et al., 2002
	SAGA	<i>Sc</i>	Activación de la transcripción	Grant et al., 1999
K9-Me	SRC1	<i>Mm</i>	Coactivador de receptor nuclear	Spencer et al., 1997
	Suv39h1	<i>Mm</i>	Heterocromatina pericéntrica	Rea et al., 2000; Lachner et al., 2001 ; Peters et al., 2001
	Suv39h2	<i>Mm</i>	Heterocromatina pericéntrica	O'Carroll et al., 2000; Lachner et al., 2001 ; Peters et al., 2001
	Su(var)3-9	<i>Dm</i>	Modificador del efecto PEV	Czerman et al., 2001; Schotta et al., 2002
	Clr4	<i>Sp</i>	Silenciamiento centrómeros	Bannister et al., 2001; Nakayama et al., 2001
	Dim5	<i>Nc</i>	Metilación del ADN	Tamaru & Selker, 2001
	KRYPTONITE	<i>At</i>		Jackson et al., 2002
	Suv39h1	<i>Mm</i>		Lehnertz et al., sin publicar
	Suv39h2	<i>Mm</i>		Lehnertz et al., sin publicar
	SUV39H1	<i>Hs</i>	Silenciamiento mediado por Rb	Nielsen et al., 2001 ; Vandel et al., 2001
	G9a	<i>Mm</i>	Imprinting	Xin et al., 2003
	G9a	<i>Mm</i>	Represión de la transcripción	Tachibana et al., 2001; Tachibana et al., 2002
	G9a	<i>Hs</i>	Represión de la transcripción	Ogawa et al., 2002
	Eu-HMTase	<i>Hs</i>		
	Eset/SETDB1	<i>Mm, Hs</i>	Represión de la transcripción	Yang et al., 2002 ; Schultz et al., 2002
	E(z)/EZH2	<i>Dm, Hs</i>	Represión de PcG	Czerman et al., 2002 ; Kuzmichev et al., 2002
	Ash1	<i>Dm</i>	Activación de Trithorax	Beisel et al., 2002
	-	<i>Mm, Hs</i>	Inactivación del cromosoma X	Boggs et al., 2002 ; Peters et al., 2002 ; Heard et al., 2001 ; Mermoud et al., 2002
S10-P	Snf1	<i>Sc</i>	Activación de la transcripción	Lo et al., 2001
	Jil-1	<i>Dm</i>	Regulación transcripcional del cromosoma X en machos	Jin et al., 1999 ; Wang et al., 2001b
	Rsk2	<i>Mm, Hs</i>	Activación de la transcripción de genes de expresión temprana	Sassone-Corsi et al., 1999 ; Thomson et al., 1999 ; Cheung et al., 2000b ; Clayton et al., 2000
	Msk1	<i>Mm</i>		
	Ip11/AuroraB	<i>Sc, Ce</i>	Condensación de los cromosomas mitóticos	Wei et al., 1999 ; Hsu et al., 2000
	NIMA	<i>An</i>	Condensación de los cromosomas mitóticos	De Souza et al., 2000
K14-Ac	Gcn5	<i>Tt, Sc, Mm</i>	Activación de la transcripción	Brownell et al., 1996 ; Kuo et al., 1996
	TAF _{II} 230	<i>Dm</i>	Activación de la transcripción	Mizzen et al., 1996
	TAF _{II} 250	<i>Hs</i>		
	P300	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999
K14-Ac	Gcn5	<i>Tt, Sc, Mm</i>	Activación de la transcripción	Brownell et al., 1996 ; Kuo et al., 1996
	TAF _{II} 230	<i>Dm</i>	Activación de la transcripción	Mizzen et al., 1996
	TAF _{II} 250	<i>Hs</i>		
	P300	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999
	PCAF	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999

(Tabla 1.3, continua)

SITIO	ENZIMA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA
K14-Ac	Gen5	<i>Tt, Sc, Mm</i>	Activación de la transcripción	Brownell et al., 1996 ; Kuo et al., 1996
	TAF _{II} 230	<i>Dm</i>	Activación de la transcripción	Mizzen et al., 1996
	TAF _{II} 250	<i>Hs</i>		
	p300	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999
	PCAF	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999
R17-Me	SRC1	<i>Mm</i>	Coactivador de receptor nuclear	Spencer et al., 1997
	CARM1	<i>Mm, Hs</i>	Activación de la transcripción	Chen et al., 1999 ; Schurter et al., 2001 ; Ma et al., 2001 ; Bauer et al., 2002
K18-Ac	CARM1	<i>Mm, Hs</i>	Activación de la transcripción	Daujat et al., 2002
	SAGA	<i>Sc</i>	Activación de la transcripción	Grant et al., 1999
	Ada	<i>Sc</i>		
K23-Ac	p300	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999
	CBP	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Daujat et al., 2002
	SAGA	<i>Sc</i>	Activación de la transcripción	Grant et al., 1999
K27-Me	CBP	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Daujat et al., 2002
	G9a	<i>Mm</i>	Represión de la transcripción	Tachibana et al., 2001; Tachibana et al., 2002
	E(z)/EZH2	<i>Dm, Hs</i>	Represión de PcG	Czermin et al., 2002 ; Cao et al., 2002 ; Müller et al., 2002 ; Kuzmichev et al., 2002
	EZH2	<i>Hs</i>	Progresión de cáncer de próstata	Varambally et al., 2002
	Ezh2	<i>Mm</i>	Desarrollo temprano células B, reordenamientos de IgH	Su et al., 2003
	Ezh2	<i>Mm</i>	Inactivación del cromosoma X	Wang et al., 2001c ; Mak et al., 2002 ; Silva et al., 2003 ; Plath et al., 2003
S28-P	Aurora-B	<i>Mm, Hs</i>	Condensación de cromosomas mitóticos	Goto et al., 1999 ; Goto et al., 2002
K36-Me	Set2	<i>Sc</i>	Represión génica	Strahl et al., 2002
K79-Me	Dot1/DOT1L	<i>Sc, Hs</i>	Silenciamiento de telómeros	van Lecuwen et al., 2002; Lacoste et al., 2002; Ng et al., 2002 ; Feng et al., 2002
HISTONA H4				
S1-P	-	-	-	van Holde, 1988
R3-Me	PRMT1	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Strahl et al., 2001 ; Wang et al., 2001d
K5-Ac	Hat1	<i>Tt, Dm, Hs</i>	Deposición de histonas	Sobel et al., 1995; Kleff et al., 1995 ; Parthun et al., 1996
	Esa1/NuA4	<i>Sc</i>	Progresión del ciclo celular	Smith et al., 1998; Clarke et al., 1999 ; Allard et al., 1999
	ATF2	<i>Hs, Ms</i>	Factor de transcripción específico de secuencia	Kawasaki et al., 2000
K8-Ac	p300	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999
	ATF2	<i>Hs, Mm</i>	Factor de transcripción específico de secuencia	Kawasaki et al., 2000
	PCAF	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999
K12-Ac	p300	<i>Hs</i>	Activación de la transcripción	Schiltz et al., 1999
	Hat1	<i>Sc</i>	Deposición de histonas	Sobel et al., 1995 ; Kleff et al., 1995 ; Parthun et al., 1996
K16-Ac	MOF	<i>Dm</i>	Regulación transcripcional del cromosoma X en machos	Akhtar & Becker, 2000 ; Smith et al., 2000
	ATF2	<i>Hs, Mm</i>	Factor de transcripción específico de secuencia	Kawasaki et al., 2000
K20-Me	Pr-SET7/Set8	<i>Hs, Dm</i>	Silenciamiento transcripcional, condensación mitótica	Nishioka et al., 2002b ; Fang et al., 2002; Rice et al., 2002
	Ash1	<i>Dm</i>	Activación de Trithorax	Beisel et al., 2002

Tabla 1.3. Acetilación, fosforilación y metilación en residuos aminoacídicos susceptibles de modificaciones en las histona H3 y H4. Abreviaturas de las especies: *At*: *Arabidopsis thaliana*; *Ce*: *Caenorhabditis elegans*; *Dm*: *Drosophila melanogaster*; *Hs*: *Homo sapiens*; *Mm*: *Mus musculus*; *Nc*: *Neurospora crassa*; *Sp*: *Schizosaccharomyces pombe*; *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Tt*: *Tetrahymena thermophila*. Modificado de Lachner et al. (2003).

1.4.1. Fosforilación de histonas.

Los residuos 10 y 28 del extremo N-terminal de la histona H3 (H3S10, H3S28), el residuo 1 del extremo N-terminal de la histona H4 (H4S1) y varios residuos de la histona H1, son susceptibles de sufrir modificaciones mediante fosforilación, acción llevada a cabo por diversas enzimas con actividad kinasa (Cheung et al., 2000a). Desde hace varios años, se relaciona la fosforilación global de la serina 10 de histona H3 (H3K10) con el control del grado de condensación de la cromatina a lo largo del ciclo celular (Hendzel et al., 1997; Wei et al., 1999). La fosforilación de H3 en el residuo 10, en combinación con la fosforilación de H3 en el residuo 28, conlleva a la condensación y segregación cromosómica; mientras que acetilación en el residuo 14, junto con fosforilación en el residuo 10 de la histona H3, promueve la descondensación de la cromatina y la activación de la transcripción (Cheung et al., 2000a). Además, la fosforilación de la histona H1 interviene en el debilitamiento de las interacciones básicas entre las colas de las histonas y la molécula del ADN (Hill et al., 1991).

1.4.2. Metilación de histonas.

Actualmente, se encuentran identificadas varias enzimas metiltransferasas de histonas (HMTs, “histone methyltransferases”) (Feng et al., 2002; Lacoste et al., 2002; Ng et al., 2002; van Leeuwen et al., 2002) que catalizan la transferencia de grupos metilo a grupos arginina o lisina localizados en los extremos N-terminales de las histonas H3 (R2, K4, K9, R17, R26, K27, K36) y H4 (R3, K20). A diferencia de otras modificaciones de histonas, la metilación puede afectar también a lisinas constituyentes de la subunidad globular de la histona H3 (K79) (Feng et al., 2002). La arginina puede encontrarse mono- o dimetilada simétricamente (ambos lados del grupo amino de la cadena aminoacídica) o asimétricamente (sólo un lado del grupo amino está dimetilado) (Kouzarides, 2002), catalizando estas reacciones enzimas arginina- metiltransferasas (PRMTs, “protein arginine methyl-transferases”). Por su parte, las lisinas pueden ser mono-, di- o trimetiladas por enzimas correspondientes a la familia de HMTs con dominios SET. En contraste con otras modificaciones, no se ha llegado a la identificación de enzimas que reviertan la acción de las HMTs, es decir, no se han definido enzimas demetilantes de histonas.

La metilación de histonas se correlaciona con el control de la transcripción, regulando tanto su activación como su represión, aún tratándose de modificaciones en el mismo residuo. Este comportamiento va a depender del gen que se vea afectado, del tipo de enzima y, en mayor medida, del número de grupos metilo añadidos (2 o 3 grupos) (Santos-Rosa et al., 2002). En este sentido, la activación completa de determinados promotores requiere de la alta presencia de lisina 4 de la histona H3 en estado trimetilado (K4H3), mientras que estados basales de transcripción se relacionan con estados dimetilados de K4H3 (Santos-Rosa et al., 2002). En contraste, la metilación de la lisina 9 en la histona H3 (K9H3) se encuentra mayoritariamente en dominios de cromatina silenciados, mientras que en las regiones activas aparece abundante metilación en K4H3 unida a ausencia de dimetilación en K9H3 (Briggs et al., 2001). En concordancia con este trabajo, se ha descrito ampliamente (Tachibana et al., 2001; Nielsen et al., 2001; Vandel et al., 2001; Ogawa et al., 2002; Schultz et al., 2002; Tachibana et al., 2002; Yang et al., 2002) que la reclusión de enzimas HMTs específicas de metilación en K9H3 conlleva a la represión de genes localizados en zonas de eucromatina. En cuanto a la metilación de argininas, adición de grupos metilo al residuo 17 de la histona H3 está correlacionada con activación génica (Bauer et al., 2002; Davie & Dent, 2002).

En lo referente a la relación de eu-, heterocromatina con la metilación de histonas Jasencakova et al. (2003) encontraron que, en *Arabidopsis*, la eucromatina se caracteriza por presentar altos niveles de dimetilación en K4H3, encontrando altos niveles de dimetilación de K9H3 para los dominios heterocromáticos. Sin embargo, cada vez está más aceptada la idea de que la metilación de histonas, al igual que ocurre con el resto de modificaciones de histonas, no actúa sola. En el caso concreto del ensamblaje de la heterocromatina en *Arabidopsis*, parecen estar implicadas metilación del ADN, acetilación de histona H4 y metilación de histona H3, actuando las tres modificaciones en forma de cascada de reacciones (Soppe et al., 2002). De igual modo, para el mantenimiento de la heterocromatina también se necesita de la sincronización con otras proteínas remodeladoras de la cromatina, tal como HP1 (*Heterochromatin protein*) que se une al extremo N-terminal de H3 cuando está metilado en la lisina 9 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001).

1.4.3. Acetilación de histonas.

De entre todos los tipos de modificaciones posttranscripcionales que afectan a las histonas, sin duda, la acetilación de histonas constituye la más caracterizada. Grupos ϵ -amino de lisinas localizadas en los extremos N-terminales de los cuatro tipos de histonas del núcleo del nucleosoma pueden ser modificados. Se ha identificado un residuo susceptible de adición de grupos acetilo en la histona H2A (K5H2A) frente a los cuatro residuos lisina en H2B (K5H2B, K12H2B, K15H2B; K20H2B). Sin embargo, los mayores efectos funcionales cursados a través de la acetilación de histonas están adscritos a modificaciones en las histonas H3 (K4H3, K9H3, K14H3, K18H3, K23H3) y en las histonas H4 (K5H4, K8H4, K12H4, K16H4 y, en plantas, K20H4).

Teniendo en cuenta las combinaciones que pueden generarse, la información potencial que puede contener la acetilación de histonas es enorme. Por ejemplo, para las histonas H2B, H3 y H4 tenemos, al menos, 16 posibles isoformas (1 tetraacetilada, 4 triacetilada, 6 diacetilada, 4 monoacetilada y 1 isoforma sin acetilar). En total, de los 4 tipos de histonas del núcleo, hay aproximadamente 50 posibles isoformas que pueden encontrarse en forma de 8192 combinaciones distintas ($16 \times 16 \times 16 \times 2$) dentro del mismo nucleosoma. Además, debe tenerse en cuenta que cada nucleosoma contiene dos copias de cada tipo de histona, lo cual provoca un aumento de las posibles combinaciones a $6,7 \times 10^7$ (8192×8192), lo cual excede el número de nucleosomas presentes en el núcleo de una célula eucariota (Turner, 1998).

La adición de grupos acetilo a los residuos de Lys de los extremos N-terminales de las histonas es llevada a cabo por enzimas denominadas acetiltransferasas de histonas o HATs (“histone acetyltransferases”) que utilizan acetil-CoA como cosustrato, revirtiéndose esta reacción mediante la acción catalítica llevada a cabo por otro grupo de enzimas, las deacetilasas de histonas o HDACs (“histone deacetylases”). Se han identificado numerosas proteínas con actividades HATs y HDACs que pertenecen a diversas familias de proteínas, aceptándose el hecho de que las actividades HATs y HDACs son llevadas a cabo por proteínas pertenecientes a multicomplejos proteicos en los que existen otras subunidades proteicas que, probablemente, sean necesarias para la unión del complejo al nucleosoma y para la modificación del mismo. Además, HATs y

HDACs no solo son capaces de modificar histonas sino que también pueden regular la adición/eliminación de grupos acetilo en otras proteínas.

Mediante análisis de las secuencias de distintas proteínas con actividad de acetilasa de histonas se ha llegado a establecer cuatro familias distintas de HATs:

(1) la familia GNAT (“GCN5-related N-terminal acetyltransferases”) –MYST (Candau et al., 1996; Neuwald & Landsman, 1997), cuyos miembros tienen secuencias compartidas con enzimas capaces de acetilar proteínas no histónicas y otras moléculas pequeñas;

(2) la familia del coactivador p300/CBP (“CREB- binding protein”) implicado, en animales, en la regulación de determinados genes requeridos para el control del ciclo celular, diferenciación y apoptosis (Bannister & Kouzarides, 1996; Giles et al., 1998);

(3) la familia relacionada con la proteína de mamíferos TAF_{II}250, perteneciente a la familia de los factores asociados a las proteínas de unión TATA (TAFs) incluido dentro del complejo de factores de transcripción TFIID (Mizzen et al., 1996);

(4) la familia relacionada con coactivadores de receptores nucleares, tales como un coactivador de receptores de esteroides (SRC-1, “steroid receptor coactivator”) y un coactivador de la hormona tiroidea y del ácido retinoico denominado ACTR (Xu et al., 1999; Leo & Chen, 2000; Sterner et al., 2000). Esta familia de HATs está presente en mamíferos pero ausente en plantas, hongos u otros animales inferiores.

Por su parte, las HDACs pueden agruparse en tres grandes familias:

(1) miembros de la superfamilia génica RPD3/HDA1, presente en todos los organismos eucariotas e incluso en bacterias que no presentan histonas (Leipe & Landsman, 1997);

(2) miembros de la familia de SIR2 (“Silent Information Regulator 2”) (Frye, 2000), cuya peculiaridad es que no presentan similitud estructural con

otras HDACs y que requieren NAD como cofactor (Imai et al., 2000), estando presentes en organismos de todos los reinos;

(3) enzimas de la familia HD2 (Dang et al., 2001), exclusiva de plantas y descubiertas por primera vez en maíz (Lusser et al., 1997). No muestran ninguna homología estructural con otras HDACs (Wu et al., 2000).

En general, la información disponible acerca de los papeles específicos que desempeñan los miembros de estas familias de HATs y HDACs en el control de la expresión génica está muy limitada, especialmente en plantas (Graessle et al., 2001; Lusser et al., 2001). En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado 12 HATs y 16 HDACs (Pandey et al., 2002), lo cual supone mayor número de genes que el encontrado para otros tipos de organismos (Tabla 1.4.). Además, la distribución de grupos homólogos en las distintas clases de HATs y HDACs en *Arabidopsis* también difiere notablemente de la distribución encontrada para otros organismos (Tabla 1.4.).

GRUPOS DE HOMOLOGÍA	PLANTAS		HONGOS		ANIMALES	
	<i>At</i>	<i>Sc</i>	<i>Sp</i>	<i>Dm</i>	<i>Ce</i>	
<i>Grupos de homología HDACs</i>						
Familia RPD3/HDA1 (<i>genes HDA</i>)						
Clase I	4	3	2	2	3	
Clase II	3	1	1	2	4	
Clase III	1	0	0	1	1	
Sin clasificar	2	1	0	0	0	
Familia HD2 (<i>genes HDT</i>)	4	0	0	0	0	
Familia SIR2 (<i>genes SRT</i>)						
Clase I	0	5	3	1	1	
Clase II	1	0	0	1	2	
Clase IV	1	0	0	2	1	
Total de homólogos de HDACs	16	10	6	9	12	
<i>Grupos de homología HATs</i>						
Superfamilia GNAT-MYST (<i>genes HAG</i>)						
Familia GNAT						
GCN5	1	1	1	1	1	
ELP3	1	1	1	1	1	
HAT1	1	1	1	1	1	
HPA2	0	2	1	0	0	
Familia MYST	2	3	2	5	4	
Familia CBP (<i>genes HAC</i>)	5	0	0	1	1	
Familia TAF _{II} 250 (<i>genes HAF</i>)	2	1	1	1	1	
Total de homólogos de HATs	12	9	7	10	9	

Tabla 1.4. Comparativa de la frecuencia de cada miembro de las distintas familias de homólogos de HDACs y HATs en plantas, hongos y animales. Abreviaturas de las especies: *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Ce*, *Caenorhabditis elegans*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Sp*, *Schizosaccharomyces cerevisiae*. Modificado de Pandey et al.(2002).

El análisis filogenético de estas proteínas permite concluir que existen proteínas que se han diversificado funcionalmente a lo largo de la evolución hacia plantas, mientras que otras proteínas presentan secuencias altamente conservadas con otros organismos (Pandey et al., 2002). Sin duda, el hecho más indicativo de la diversificación de las HATs y HDACs en plantas, con respecto a los animales y hongos, lo constituye la presencia de una familia de HDACs única de plantas, la familia de HD2. Puesto que no se han encontrado homólogos de HD2 en animales u hongos, parece que estas proteínas responden a una función exclusiva de plantas, o bien que cubren una función llevada a cabo por otro tipo de HDACs en animales u hongos. Pandey et al. (2002), en base a análisis filogenéticos, postulan que el grado de diversificación de las plantas dicotiledóneas es mayor que el encontrado para las plantas monocotiledóneas, lo que les lleva a sugerir que en dicotiledóneas se produjo una duplicación génica y una posterior diversificación funcional que explicaría la presencia de las HDACs de tipo HD2 en plantas.

Debido a la importante relevancia que ejerce la acetilación de histonas en términos de control de la expresión génica y, en general, en la regulación del estado funcional de la cromatina, la célula debe poseer mecanismos de control encargados de mantener un correcto equilibrio entre las actividades HATs y HDACs, adaptando los niveles de acetilación de histonas a los requerimientos tiempo y espacio –dependientes. En este sentido, la célula dispone de varios mecanismos que potencialmente pueden regular la actividad de HATs/HDACs, agrupándose estas vías en tres grupos: (a) factores que controlan la cantidad del enzima, (b) factores que regulan la actividad enzimática y, (c) factores que controlan la disponibilidad de los enzimas.

(a) Como cualquier otra proteína, la actividad de HATs/HDACs puede ser regulada mediante el control de la expresión de estas proteínas. Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares de esta regulación, sí se han descrito factores que afectan a la expresión y, por tanto, a los niveles celulares de estos enzimas. Por ejemplo, se sabe que el ARNm del gen *Hdac1* está inducido por hiperacetilación de histonas, es decir, es un mecanismo de feedback (Hauser et al., 2002). También se han descrito aumentos en los niveles de ARNm relacionados con HATs/HDACs de mamíferos inducidos por factores del crecimiento (Bartl et al., 1997) o por suero (Hauser et al., 2002).

(b) Las actividades enzimáticas de HATs/HDACs pueden estar sujetas a control mediante modificaciones posttranscripcionales, tales como fosforilación (Kawasaki et al., 2000) o sumoilación (Kirsh et al., 2002). Puesto que los enzimas HATs/HDACs forman parte de un complejo proteico con otras subunidades enzimáticas, parece que las interacciones entre estas proteínas constituyen otro mecanismo de regulación de la actividad enzimática (Shen et al., 2001; Girdwood et al., 2003). Por último, la actividad enzimática de HATs/HDACs puede ser regulada a través de la disponibilidad de cofactores metabólicos de estos enzimas, tales como NAD⁺ (Denu, 2003).

(c) La disponibilidad de HATs/HDACs puede regularse mediante cambios en la localización celular de los enzimas (Baek et al., 2002) o mediante reclusión física a promotores específicos mediada por factores de transcripción (Xu et al., 2001).

En suma, la regulación de la actividad de HATs/HDACs, mediante los mecanismos antes expuestos, conlleva al establecimiento de patrones específicos de acetilación de residuos de lisina en los extremos N-terminales de las histonas. Estos patrones de acetilación pueden mantenerse tras la replicación (Turner, 1998), pero no se mantienen invariables a lo largo del ciclo vital o de la diferenciación del organismo. El dinamismo de la acetilación de histonas está vinculado a cambios en las actividades enzimáticas de HATs/HDACs. Aunque este mecanismo de control supone demandas energéticas continuadas en la célula, también se presenta como una ventaja a la hora de regular genes cuya expresión debe controlarse de modo rápido, como es el caso de genes que deben responder ante estimulación por hormonas o factores de crecimiento (Spootswood & Turner, 2002).

Desde hace varios años, se ha establecido una estrecha relación entre acetilación de histonas y la regulación de la transcripción de genes específicos (Allfrey, 1977), reforzándose esta hipótesis con el descubrimiento de que complejos coactivadores requeridos para la activación de la transcripción contienen actividades acetiltransferasas (Brownell et al., 1996; Kuo et al., 1998; Sterner & Berger, 2000; Chen et al., 2001; Roth et al., 2001), mientras que complejos correpresores que incluyen actividades deacetilasas confieren represión transcripcional (Hassing et al., 1998; Wong et al., 1998; Klochbin et al., 2001). Todo parece indicar que la acetilación de histonas actúa como señal que facilita la unión de determinados factores de transcripción a promotores específicos, para lo cual se necesita que la cromatina esté en un grado de compactación

que resulte accesible a toda esta maquinaria de transcripción. En este sentido, el efecto de la acetilación de histonas puede entenderse a dos niveles distintos: a nivel local entendido como la función que ejerce en la expresión de genes específicos, o a nivel global que abarcaría cambios en la estructura cromatínica (nucleosomas o estructuras de orden superior). Aunque no se han definido los mecanismos por los cuales la acetilación de histonas afecta a las propiedades biofísicas de la cromatina, está aceptado que la acetilación de los extremos N-terminales de las histonas reduce la estabilidad de interacción entre las histonas que forman el núcleo del nucleosoma y el ADN del mismo (Hong et al., 1993). Esta reducción en la afinidad permite mayor grado de movilidad de los nucleosomas a lo largo de la fibra de ADN con respecto a los nucleosomas que no están acetilados (Puig et al., 1998). Otra posibilidad interesante es que la acetilación de histonas desestabilice las estructuras secundarias existentes entre los extremos N-terminales correspondientes a las histonas H3 y H4 (Baneres et al., 1997), lo cual también conllevaría a la pérdida de las interacciones entre el núcleo del nucleosoma y la molécula del ADN. En un tercer grado de afectación, la acetilación puede afectar también a la estructura de la fibra de 30 nm. En este sentido, la acetilación de histona actúa como un indicador epigenético (Turner, 1998; Turner, 2000) de estados de eu- o heterocromatina. Se han descrito los mecanismos moleculares que conllevan al ensamblaje de la cromatina y a la formación de la heterocromatina en diversos organismos (Richards & Elgin, 2002) estando implicada, junto con otros complejos proteicos como el complejo SIR(1-4), la acetilación de las histonas (Noma et al., 2001; Suka et al., 2001; Eberharter & Becker, 2002).

1.4.4. Particularidades en las modificaciones de histonas exclusivas en plantas.

Las plantas difieren en ciertos aspectos relacionados con las modificaciones covalentes de las histonas y que hacen referencia principalmente a los sitios susceptibles de modificación (a), a la presencia de una familia exclusiva de HDACs (b), así como a la existencia de distintas vías de regulación de la actividad enzimática (c) (Loidl, 2004).

(a) *Residuos de aminoácidos susceptibles de acetilación y metilación exclusivos de plantas.* En plantas existen mayor número de residuos de lisina en los extremos N-terminales de las histonas susceptibles de sufrir modificaciones covalentes. Las plantas pueden ser acetiladas en la posición Lys 20 de la histona

H4 (H4K20), pudiendo originar formas penta-acetiladas de histona H4 (Waterborg, 1992). Por otro lado, las lisinas en posición 14,18 y 23 de la histona H3 pueden encontrarse metiladas, aparte de acetiladas (Loidl, 2004). La presencia de estos residuos adicionales susceptibles de acetilación/metilación elevan aún más el número de combinaciones que se pueden establecer entre todas las posibles modificaciones y que, al fin y al cabo, constituyen los principios básicos del denominado “código de histonas”.

(b) *Las plantas poseen una familia de enzimas HDACs exclusiva.* Como ya se ha descrito con anterioridad en el Apartado 1.4.3., las plantas poseen una familia de enzimas con actividad HDACs que no se encuentra representada en animales o en hongos. Se trata de la familia HD2 (Lusser et al., 1997) que no comparte secuencia con otros enzimas HDACs y que requiere de fosforilación previa a su activación (Pandey et al., 2002). HD2 puede desempeñar el papel regulador de genes implicados en vías exclusivas de plantas, o puede que asuma ciertas funciones llevadas a cabo por otras HDACs en animales o en hongos.

(c) *Vías de regulación de la actividad enzimática exclusivas de plantas.* Pipal et al. (2003) han descrito recientemente que el homólogo Hda1 en maíz (ZmHDA1) está regulado por proteólisis. De este modo, ZmHDA1 es sintetizado como una proteína precursora inactiva, con un peso molecular aproximado de 84 kDa, que forma parte de un complejo proteico de 300 kDa de función desconocida. Su actividad represora de la transcripción le es conferida cuando se convierte en una proteína de 48 kDa mediante escisión proteolítica del extremo C-terminal de la subunidad de 84 kDa. Ambas subunidades son modificadas mediante fosforilación, hecho que comparten con homólogos en animales (Pflum et al., 2001). Sin embargo, la regulación vía proteólisis es, hasta el momento, un nivel de regulación de la actividad de HDACs exclusivo de plantas.

1.5. Metilación del ADN.

La adición postsintética de grupos metilo en la posición C5 de la citosina constituye la modificación epigenética más frecuente y su papel en el desarrollo de procariotas y eucariotas ha sido objeto de numerosos estudios (Finnegan & Kovac, 2000). Sin embargo, la adición de grupos metilo a las bases nitrogenadas del ADN puede producirse también sobre los residuos de nitrógeno no cíclicos de la adenina (N6) o citosina (N4), multiplicando mediante estas modificaciones las posibilidades informativas del ADN (Jeltsch, 2002).

La metilación de citosina está producida por metiltransferasas, enzimas que catalizan la transferencia de grupos metilo desde S-adenosilmetionina (SAM o S-AdoMet) hasta los residuos de citosina, produciéndose metilcitosina y S-adenosilhomocisteína (SAH). La metilación puede tener lugar en cualquier residuo de citosina del genoma. Sin embargo, la transmisión clonal de los patrones de metilación está restringida a citosinas de secuencias simétricas CpG y CpNpG (N hace referencia a cualquier nucleótido) (Finnegan et al., 1998a), es decir, en secuencias cuya lectura es palindrómica (Gruenbaum et al., 1981). En plantas también se ha descrito la existencia de metilación en secuencias no simétricas, como CpTpT o CpApT (Finnegan et al., 2000), aunque no se conoce su papel como mecanismo de control de la expresión génica. La metilación que tiene lugar en trinucleótidos CpNpG es exclusiva de plantas. Las agrupaciones de dinucleótidos CpG, islas CpG, se encuentran con frecuencia asociadas a secuencias reguladoras de los genes, zonas de los promotores y del exón1, pero también pueden localizarse en regiones próximas al extremo 3' (Jones & Takai, 2001). Las islas CpG se definen como regiones de más de 200 pb con alto contenido en secuencias CG y con relación frecuencia observada/esperada de CpG > 0.6. Puesto que en general los genomas contienen menos proporción de secuencias codificantes (< 2%) que de elementos transponibles (> 45%), es esperable que los niveles de metilación genómica en plantas y hongos sean superiores a los de mamíferos (Martienssen & Colot, 2001). La distribución de 5-metilcitosinas en el genoma de eucariotas no se produce al azar, la mayor parte de las citosinas metiladas se localizan en regiones heterocromáticas con alta presencia de secuencias repetitivas (Bennetzen, 1996; Finnegan & Kovac, 2000). Pero, la metilación de citosinas también se puede producir

en regiones de ADN de copia única, donde ejerce un papel importante en el control de la expresión génica (Jacobsen & Meyerowitz, 1997; Cubas et al., 1999).

Como se presenta a continuación, la metilación de citosinas desempeña dos papeles fundamentales en los organismos eucariotas:

(1) La metilación del ADN colabora en la dirección de la función génica; reprime la transcripción de elementos móviles o invasivos del genoma, transposones o ADN viral. De este modo, se disminuye la posibilidad de disrupción causada por transposones o la frecuencia de recombinación entre elementos no alélicos (Finnegan et al., 1998a; Finnegan et al., 2000).

(2) La metilación del ADN es esencial para el correcto desarrollo de eucariotas superiores. En animales, modificaciones en metiltransferasas que impliquen alteraciones en los patrones de metilación genómica generan daños letales (Li et al., 1992). En plantas, aunque no alcanzan la letalidad, pueden producir disfunciones del desarrollo, floración principalmente, y la manifestación de anomalías variadas (Kakutani et al., 1995; Finnegan et al., 1996; Ronemus et al., 1996; Finnegan et al., 1998b; Finnegan et al., 2000).

1.5.1. ADN metiltransferasas en plantas.

En plantas se han descrito tres grupos de metiltransferasas (Tabla 1.5): (1) el grupo de enzimas MET1 que agrupa a metiltransferasas de mantenimiento de metilación en CpG, es decir, aquellas que restablecen los patrones de metilación tras el proceso de replicación, empleando como molde hebras hemimetiladas (Finnegan & Kovac, 2000); (2) cromometiltransferasas (CMT) implicadas en la metilación *de novo* de islas CpNpG, es decir, introducen grupos metilo sobre citosinas que no se encontraban previamente metiladas (Bartee et al., 2001; Lindroth et al., 2001; Papa et al., 2001); (3) un grupo de metiltransferasas que actúan *de novo*, pertenecientes a distintos grupos, y que se clasifican como una familia aparte de las anteriormente citadas (Cao et al., 2000; Finnegan & Kovac, 2000). Debe destacarse que la metilación del ADN requiere, además, de la acción complementaria de otras proteínas, tales como factores remodeladores de la cromatina (DDM1) que aumentan la accesibilidad de la molécula

de ADN o proteínas de unión a dominios metilados (MBD, “Methyl-CpG-binding domain”).

En la clase MET1 de metiltransferasas descritas para *Arabidopsis* se incluyen al menos 5 miembros de esta familia multigénica, estando cuatro de ellos parcialmente caracterizados (Finnegan & Dennis, 1993; Genger et al., 1999). Dos de estos genes, METIIa y METIII, se encuentran estrechamente ligados, pero los otros dos genes (METI y METIIb) no se encuentran ligados. Se sabe que los cuatro genes proceden del mismo gen ancestral a través de fenómenos de duplicación génica, estando su estructura génica, formada por 11 intrones, muy conservada entre ellos (Finnegan & Kovac, 2000). METI es la metiltransferasa más predominante si se analizan los niveles de transcritos presentes (Genger et al., 1999), expresándose tanto en tejidos vegetativos como en tejidos florales, pero principalmente adscritos a células meristemáticas (Ronemus et al., 1996). METIIa/b también se localizan en todos los tejidos, pero sus niveles de expresión son muy inferiores a los cuantificados para METI (Genger et al., 1999). No se han realizado estudios de expresión de METI y su papel en la metilación del ADN permanece aún sin descifrar (Genger et al., 1999; Finnegan & Kovac, 2000). Además de en *Arabidopsis*, se han identificado homólogos de METI en zanahoria (Bernacchia et al., 1998), guisante (Pradhan et al., 1998), tomate y maíz (Tabla 1.5.).

La segunda clase de metiltransferasas presente en plantas está constituida por la familia de enzimas cromometiltransferasas, identificadas por primera vez por Henikoff & Comai (1998). En *Arabidopsis* se han identificado al menos 3 enzimas pertenecientes a la familia de CMT (Rose et al., 1998; Genger et al., 1999), tratándose de una familia caracterizada por la inserción de un cromodominio dentro del dominio conservado de la metiltransferasa. Dentro de las regiones conservadas del dominio metiltransferasa se ha encontrado una homología de entre el 30 y el 70% entre la secuencia de METI y CMT, estando esta secuencia muy conservada (65- 100%) al comparar los distintos miembros de la familia CMT (Genger et al., 1999). La longitud de los dominios variables de los enzimas CMT es muy cambiante y no muestran similitudes con la familia METI, lo cual sugiere que desempeñan papeles distintos (Finnegan & Kovac, 2000). Al igual que ocurría con METIII, CMT1 no es esencial y se ha detectado expresión de *CMT1* tanto en tejidos vegetativos como florales aunque en estos últimos los niveles de expresión son mayores (Henikoff & Comai, 1998). Los otros dos miembros de la familia CMT, *CMT2* y *CMT3* también se transcriben, siendo los transcritos de *CMT2* los más

abundantes de esta familia (Genger et al., 1999). También se han identificado CMT en *Brassica* y en maíz (Rose et al., 1998; Genger et al., 1999; Finnegan & Kovac, 2000).

Finalmente, existen otras proteínas con actividad metiltransferasa descritas en organismos eucariotas superiores (Tabla 1.5.) y basadas en alineamientos de secuencias con otras dos metiltransferasas, Masc1 de *Ascobolus* y Dnmt3 de ratón (Malagnac et al., 1997; Okano et al., 1998). Se trata de metilasas *de novo* incluidas en la denominada clase DRM (“*Domain Rearranged Methyltransferases*”) para las que se ha encontrado homología en *Arabidopsis*, aunque se desconocen datos de su expresión y función (Cao et al., 2000; Finnegan & Kovac, 2000). También se han localizado homólogos de Dnmt3 en maíz (Finnegan & Kovac, 2000), así como homólogos de metiltransferasas de ARN (Reid et al., 1999).

Actualmente, existe una base de datos denominada REBASE que incluye información muy amplia y actual acerca de metiltransferasas y de los enzimas de restricción sensibles a la metilación, así como de otras proteínas relacionadas. A través de esta base de datos puede obtenerse amplia información acerca de cualquiera de estos enzimas, tales como: disponibilidad comercial, datos de secuenciación, estructuras, sitios de ruptura, secuencias de reconocimiento, isoesquizómeros o temperaturas de acción y sensibilidad a la metilación. Además, se incluyen herramientas informáticas útiles (“REBASE tools”) para su uso conjunto con otras bases de datos existentes, tales como BLAST. Puede accederse a esta información a través de su página web (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>).

GEN	ORGANISMO	CLASIFICACIÓN	FUNCIÓN	REFERENCIA
Dnmt1/MET1				
<i>Dnmt1</i>	Ratón	Clase Dnmt1	Mantenimiento y quizás metilación <i>de novo</i>	Bestor et al., 1988
<i>MET1</i> (<i>DDM2</i>)	<i>Arabidopsis</i>	Familia MET1 (Clase Dnmt1)	Metilación en CpG y CpNpG; en copias únicas del genoma; quizás mantenimiento	Finnegan & Dennis, 1993
<i>MET1a</i>	<i>Arabidopsis</i>	Familia MET1	Mantenimiento?	Genger et al., 1999
<i>MET1b</i>	<i>Arabidopsis</i>	Familia MET1	Mantenimiento?	Genger et al., 1999
<i>MET1c</i>	<i>Arabidopsis</i>	Familia MET1	Mantenimiento? No esencial	Genger et al., 1999
<i>PMET</i>	Guisante	Familia MET1	Mantenimiento CpG, CpNpG	Pradhan et al., 1998
<i>CMET5</i>	Zanahoria	Familia MET1	Mantenimiento?	Bernacchia et al., 1998
<i>CMET21</i>	Zanahoria	Familia MET1	Mantenimiento?	Bernacchia et al., 1998
<i>ZMET</i>	Maíz	Familia MET1	Mantenimiento?	Olhoft, 1998
Cromometiltransferasas (CMT)				
<i>CMT1</i>	<i>Arabidopsis</i>	Familia CMT	Heterocromatina? No esencial	Henikoff & Comai, 1998
<i>CMT2</i>	<i>Arabidopsis</i>	Familia CMT	Heterocromatina?	Rose et al., 1998 ; Genger et al., 1999
<i>CMT3</i>	<i>Arabidopsis</i>	Familia CMT	Heterocromatina?	Finnegan & Kovac, 2000
<i>ZMET2a</i>	Maíz	Familia CMT	CpNpG en ADN repetitivo	Finnegan & Kovac, 2000
<i>ZMET2b</i>	Maíz	Familia CMT	Heterocromatina?	Finnegan & Kovac, 2000
Dnmt2				
<i>Dnmt2</i>	Ratón	Dnmt2	Desconocido	Yoder & Bestor, 1998
	<i>Arabidopsis</i>	Dnmt2 putativa	Desconocido	Nº acceso AF045889
Dnmt3				
<i>Dnmt3a</i>	ratón	Familia Dnmt3	Metilación <i>de novo</i>	Okano et al., 1998
<i>DNMT3b</i>	humano	Familia Dnmt3	Metilación <i>de novo</i> ; ADN satélite	Xie et al., 1999 ; Xu et al., 1999
	<i>Arabidopsis</i>	Familia Dnmt3	Putativa <i>de novo</i>	Finnegan & Kovac, 2000
	maíz	Familia Dnmt3	Putativa <i>de novo</i>	Finnegan & Kovac, 2000
MASC1				
<i>Masc1</i>	<i>Ascobolus</i>	MASC1	Metilación <i>de novo</i>	Malagnac et al., 1997
	<i>Arabidopsis</i>	MASC1 putativa	Desconocida	Nº Acceso AF025475
Otros				
<i>DDM1</i> (<i>SOM</i>)	<i>Arabidopsis</i>	SNF2/SWI2	Remodelamiento de la cromatina	Jeddeloh et al., 1999 ; Mittelsten Scheid et al., 1998
<i>HOG</i>	<i>Arabidopsis</i>	Desconocida	Desconocida	Furner et al., 1998
<i>DDMB</i>	<i>Arabidopsis</i>	Desconocida	Mutación dominante, metilación reducida	Finnegan & Kovac, 2000
<i>DDM0</i>	<i>Arabidopsis</i>	Desconocida	Mutación dominante, metilación reducida	Finnegan & Kovac, 2000

Tabla 1.5. Principales enzimas con actividad metiltransferasa y otros componentes de la maquinaria de metilación descritos en plantas y ciertos homólogos en sistemas animales. Modificado de Finnegan & Kovac (2000).

1.5.2. Mecanismos de demetilación del ADN.

Puesto que la metilación es un proceso reversible, debemos entender que los perfiles de metilación del ADN pueden estar sujetos a cambios continuos que conduzcan a estados hipermetilados del genoma (o de genes específicos) en determinadas situaciones, frente a estados hipometilados bajo otras condiciones.

La demetilación del ADN puede suceder de modo pasivo, sin la intervención de actividades enzimáticas demetilantes. Esto sucede si, tras replicación, no se produce la restitución de metilcitosinas en la nueva hebra. En situaciones normales, tras la replicación se producen hebras hemimetiladas que son reconocidas por la metilasa de mantenimiento, la cual restaura el patrón normal de metilación. La unión de la metilasa de mantenimiento a la hebra metilada puede producirse en menos de un minuto pero, en ocasiones, antes de que se produzca este reconocimiento, se produce la unión de factores de transcripción a esta zona, haciéndola inaccesible a la metiltransferasa. El mantenimiento de la metilación puede verse afectado también por la unión de histonas acetiladas. En suma, se trata de errores o defectos en el mantenimiento de la metilación. Sin embargo, la demetilación mediante este mecanismo es un proceso lento en el que se requieren 5 ciclos de replicación para reducir la metilación a un nivel <5% (Jeltsch, 2002).

Una velocidad mayor de demetilación solo puede ser conseguida a través de mecanismos activos mediados por actividades enzimáticas. En contraste con las bien definidas bases de la genética molecular, biología celular y bioquímica de las metiltransferasas, poco se sabe acerca de los mecanismos activos de demetilación *in vivo*. Aunque en plantas todavía no se han identificado enzimas demetilantes, hace ya varios años se ha propuesto un mecanismo bioquímico de demetilación activa en animales y que se basa en la escisión de la metilcitosina por una glicosilasa, creándose un sitio abásico que, posteriormente, es reparado por la maquinaria de reparación celular (Jost et al., 1995; Weiss et al., 1996). En plantas, recientemente, se ha caracterizado una proteína con actividad glicosilasa/liasa que conlleva represión génica transcripcional (Gong et al., 2002). Otros autores (Cervoni et al., 1999) defienden un mecanismo activo basado en la disgregación del grupo metilo de la citosina mediante un ataque nucleofílico del enzima al carbono 5 de la citosina. Se crearía un complejo intermedio

enzima-DNA y, tras un proceso oxidativo, se desprendería el grupo metilo en forma de dióxido de carbono. Puesto que la energía necesaria para romper un enlace C-C es muy grande, esta hipótesis ha despertado gran controversia, generando una cierta reticencia a la hora de aceptar estos mecanismos. Actualmente, se han desarrollado hipótesis basadas en la acción de demetilinas que operarían en conjunción con otros mecanismos epigenéticos, tales como acetilación de histonas, de modo que el efecto final sería fruto de una serie de acontecimientos sucesivos que implican ambas modificaciones (Cervoni & Szyf, 2001).

1.5.3. Implicaciones de la metilación del ADN en plantas.

La metilación del ADN en plantas desempeña papeles fundamentales en distintos procesos celulares:

- *control de la expresión de genes específicos.* Aunque generalmente se dice que “la metilación bloquea la expresión génica”, esta afirmación es una simplificación de la situación real. La metilación cambia las interacciones entre las proteínas y el ADN, lo cual conduce a alteraciones en la estructura de la cromatina que, a su vez, conllevan aumentos o descensos de las tasas de transcripción (Jones & Takai, 2001). La metilación del ADN puede reprimir la transcripción a través de dos mecanismos: directamente si las citosinas metiladas se encuentran dentro de las secuencias de los elementos reguladores, o indirectamente cambiando la estructura de la cromatina y modificando las interacciones normales entre los factores de transcripción y el ADN (Santos & Fevereiro, 2002).

- *sistema de defensa del propio genoma.* Los genomas de plantas contienen gran cantidad de transposones, la mayor parte de los cuales se encuentran generalmente silenciados. Se han descrito numerosos trabajos (Miura et al., 2001; Okamoto & Hirochika, 2001; Kloti et al., 2002; Fukuda et al., 2004) en los que se pone de manifiesto la implicación de la metilación del ADN en la supresión de las transposiciones, evitando que se produzcan interrupciones en otras secuencias del genoma que pudiesen alterar los patrones de expresión de ciertos genes. Los fenómenos de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), que conllevan silenciamiento tanto de transposones como de transcritos víricos, también están asociados con la metilación del ADN (Mallory et al., 2001).

- *formación de alotetraploides* (Liu & Wendel, 2003). La hibridación entre dos especies conlleva la formación de un individuo diploide, al quedar parte de la información genética aportada por cada parental silenciada mediante cambios en la estructura cromatínica y en los perfiles de metilación de citosinas (Shaked et al., 2001; Madlung et al., 2002).

- *fenómeno de impronta parental o "imprinting"*, tanto en mamíferos (Surani, 2001) como en vegetales. En este sentido, la metilación del ADN está asociada con el silenciamiento génico de ciertos alelos de genes cuya expresión varía a lo largo del desarrollo del endospermo del embrión en distintas especies (Adams et al., 2000; Vinkenoog et al., 2000; Vinkenoog et al., 2001).

1.5.4. Peculiaridades de la metilación del ADN en plantas.

Resulta interesante destacar que las plantas presentan varias peculiaridades en sus enzimas metilasas con respecto a los animales. Quizás el hecho más significativo lo constituya la presencia de una familia, la familia CMT, exclusiva en plantas. Sin embargo, dentro de la familia Dnmt1/METI también se encuentran comportamientos diferenciales. Por ejemplo, los enzimas en plantas no contienen una región de cisteínas rica en uniones de zinc que se presenta en la región N-terminal de las metilasas de mamíferos (Bestor, 1992). Exclusivamente en plantas aparece una región ácida compuesta por, al menos, un 50% de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico. Aunque el papel de esta región no está aun definido, el hecho de que se mantenga conservado en todas las metiltransferasas METI de plantas sugiere que adopta un significado biológico específico de estas (Finnegan & Kovac, 2000). Además, en plantas se produce una delección de, aproximadamente, 40-41 residuos de aminoácidos dentro del dominio de reconocimiento a la diana o sustrato con respecto a los mamíferos (Genger et al., 1999). Estos dominios de reconocimiento se encuentran mucho menos conservados entre plantas, lo cual parece indicar que existen diferencias de preferencia por el sustrato o que esta región no confiere especificidad de sustrato (Finnegan & Kovac, 2000). Además, se han identificado mayor número de metiltransferasas en plantas que en animales (Jeltsch, 2002).

La abundancia de metiltransferasas en plantas, la presencia de dos códigos distintos de metilación (sobre CpG o sobre CpNpG), la existencia de la familia de enzimas CMT, entre otras singularidades, pueden estar relacionadas con la naturaleza sésil de las mismas que no les permite escapar de aquellas condiciones ambientales que les resultan desfavorables. Las plantas requieren de una adaptación muy eficiente de su programa genético a las condiciones microambientales de los hábitats en los que se desarrollan. Puesto que estas adaptaciones deben ser reversibles, los mecanismos epigenéticos proveen a las plantas de formas de regulación rápidas y eficaces que pueden ser reformuladas para cada situación ambiental, figurando la metilación del ADN entre estos mecanismos epigenéticos adaptativos.

1.6. Conexiones metabólicas existentes entre la metilación del ADN y la acetilación de histonas, una prueba más a favor del código epigenético.

Hemos visto que tanto las modificaciones post-transcripcionales de las histonas, los mecanismos de silenciamiento transcripcional y la metilación del ADN son fenómenos epigenéticos que modulan los perfiles de expresión de genes en una manera dependiente de espacio y de tiempo. Ahora bien, cuando observamos la represión de la transcripción de un gen específico ¿qué mecanismo epigenético está implicado?, ¿hasta que punto son independientes los mecanismos epigenéticos que regulan la transcripción génica?. En principio, cualquiera de estos mecanismos de por sí puede conducir a que un determinado gen se mantenga silenciado en unas condiciones determinadas. Sin embargo, todo parece apuntar a la existencia de estrechas comunicaciones entre estos factores, de modo que el efecto final de silenciamiento génico es fruto de la suma de toda una cascada de reacciones en las que se encuentran implicados enzimas causantes de varias modificaciones epigenéticas. En suma, se puede hablar de un código epigenético (Spotswood & Turner, 2002; Loidl, 2004) que actuaría con un orden determinado y en el que el efecto final sobre un gen depende del conjunto de señales o marcas epigenéticas que acontezcan en su entorno.

Puesto que la metilación del ADN y la acetilación de histonas H3 y H4 constituyen los mecanismos epigenéticos más frecuentemente asociados al silenciamiento génico y, además, son los factores epigenéticos analizados en nuestro sistema experimental, a continuación se recogen las vías de interacción metabólicas de

estos dos factores. Debe destacarse que, aunque se ha llegado a establecer conexiones entre ambas vías, los papeles de la metilación del ADN o de la hipoacetilación de histonas en el silenciamiento génico, así como la relación entre ambos factores, son variables incluso dentro del mismo organismo (Dobosy & Selker, 2001). En la Tabla 1.6. se recogen aquellos componentes de complejos multiproteicos que han permitido el establecimiento de conexiones entre la metilación del ADN y la acetilación de histonas.

Complejo Sin3	Complejo MBD1	Complejo MeCP1	Complejo DNMT1	Complejo Mi2/NuRD	Complejo Rb/E2F1
Sin3	MBD1	MBD2	DNMT1	Mi-2	DNMT1
RbAp48/p46	HDAC	HDAC1	HDAC1	MBD2	RB
		HDAC2	HDAC2		
HDAC1		RbAp48/p46	MBD2	HDAC1	HDAC1
HDAC2			MBD3	HDAC2	
SAP30			TSG101	MTA2	E2F1
SAP18			PCNA	MBD3	
MeCP2			DMAP1	RbAp48/p46	

Tabla 1.6. Componentes de complejos multiproteicos para los que se han establecido conexiones entre acetilación de histonas y metilación del ADN. Modificado de Dobosy & Selker (2001).

Por un lado, se han detectado complejos multiproteicos que contienen proteínas de unión al ADN metilado (MeCP, “*Methyl-CpG binding proteins*”) e histonas deacetilasas (HDACs). Tal es el caso de MeCP2 que, en ratón y en *Xenopus*, se incluyen en complejos homólogos a RPD3 (en *Xenopus*) y HDAC1/HDAC2 (en ratón) (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). También para MeCP1 se han localizado actividades deacetilasas y metilasas en el mismo complejo proteico (Ng et al., 1999). Por otro lado, en humanos y en *Xenopus*, se ha encontrado que el complejo denominado Mi2/NuRD, con actividad remodeladora de la cromatina e histona deacetilasa, también contiene MBD3, un miembro de una familia de proteínas homólogas a MBD de MeCP2 (Wade et al., 1999).

Por otro lado, enzimas metiltransferasas de ADN (DNMTs) también se asocian con HDACs. Por ejemplo, segmentos del extremo N-terminal de DNMT1 interactúan con determinadas proteínas, entre ellas HDAC1 (Fuks et al., 2000; Robertson et al., 2000) y HDAC2 (Rountree et al., 2000).

Aunque todos estos trabajos han sido realizados con animales y, puesto que tanto DNMTs como HDACs están bastante conservadas en la evolución, cabría esperar un comportamiento similar en plantas. Trabajos que correlacionen directamente las rutas metabólicas de la metilación del ADN y de la acetilación de histonas son escasos, aunque existen evidencias menos directas de esta conexión. Por ejemplo, en *Brassica napus* tratamientos tanto con 5-azacitidina (inhibidor competitivo de las DNMTs) como con TSA (inhibidor de deacetilasas) conduce a la pérdida de represión génica y, por tanto, expresión de genes rRNAs antes silenciados.

Por último, en plantas se han descrito conexiones entre otras modificaciones de histonas y la metilación del ADN, tales como metilación de histona H3 (Tamaru & Selker, 2001; Lusser et al., 2001), así como entre factores remodeladores de la cromatina, proteínas PcG y HP1, con la metilación del ADN (Henikoff & Comai, 1998; Loidl, 2004).

1.7. Planteamiento y objetivos.

En la mayoría de especies vegetales de interés forestal, la falta de conocimientos sobre el control de la maduración, tanto de órganos como de individuos, así como las respuestas del material durante su multiplicación son la causa principal de los problemas de gestión. Por otra parte, aunque teóricamente la producción clonal de plantas debería generar copias idénticas del genotipo seleccionado, las variaciones epigenéticas ocasionadas por las técnicas de producción (estresses inducidos por heridas, cambios de polaridad, tipo de medios, tipo de sustratos o régimen de cultivo), pueden causar desviaciones y afectar a las previsiones de producción. Se ha sugerido que en el genoma vegetal, al ser menos estable que el de las células animales, los cambios epigenéticos y polisomatismos podrían ser mas frecuentes. Los conocimientos actuales en estos temas distan mucho de constituir bases que permitan generar conclusiones científicamente fundadas. En consecuencia, profundizar en el estudio del código epigenético es un área de interés no abordada con frecuencia en leñosas, y que complementará otras acciones mas frecuentes sobre Genómica Forestal.

La pérdida de competencia asociada a la expresión diferencial de genes dependiente de edad ha impedido, hasta la fecha, el éxito de la propagación clonal de

individuos seleccionados. El conocimiento de las bases de la competencia en plantas, en las que la morfogénesis es estable pero no estática y por tanto reversible, se basa en la información sobre la plasticidad de la diferenciación. En este sentido, los mecanismos de control epigenético son fundamentales para comprender el paradigma del desarrollo vegetal desde una perspectiva básica y aplicada.

La Tesis Doctoral que se presenta aborda la problemática expuesta desde una perspectiva multidisciplinar que abarca desde estudios de Biología Celular, permitiendo el análisis de la localización celular de los factores epigenéticos, hasta estudios de Genética Molecular dirigidos a la comprensión de la regulación de genes implicados en procesos de crecimiento y desarrollo vegetal. Abordajes que sólo son posibles mediante el uso de nuevas tecnologías, tales como microscopia confocal, microarrays, secuenciación de bisulfito o ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, entre otras. El estudio se realiza con selecciones de *P. radiata* como especie primaria, sin embargo en determinadas etapas del estudio se utilizan sistemas modelo derivados de *Arabidopsis thaliana*.

A) Objetivo general.

Estudio del código epigenético como factor regulador del desarrollo en plantas.

B.1) Objetivos parciales desarrollados en *P. radiata*.

- Estudio de la dinámica espacial y temporal de la metilación del ADN y de la acetilación de histonas, objetivo que se desarrollará según los siguientes planteamientos:

1a) Efecto del genotipo, maduración de órganos, e individuos sobre los niveles de metilación global del ADN genómico. Se trata de definir niveles específicos de metilación dependientes de fase de desarrollo, resultados que además de otras aportaciones permitirán definir los materiales óptimos para la consecución de los objetivos siguientes.

1b) Distribución de 5-metilcitosina en los órganos previamente definidos mediante inmunolocalización en diferentes poblaciones celulares de órganos en diferentes estados de desarrollo, lo cual permitirá identificar posibles células diana.

1c) Evolución de los niveles de histona H4 acetilada en órganos con diferente competencia morfogénica, resultados que junto con las variaciones de metilación nos permitirá integrar el posible papel de las dos figuras fundamentales del código epigenético.

1d) Validación de los cambios de acetilación de histona H4 como proceso dependiente de desarrollo ontogénico y de procesos de revigorización.

B.2) Objetivos parciales desarrollados en *Arabidopsis thaliana*.

- Estudios de expresión génica regulada por metilación de promotores, para cuya consecución se plantearon las siguientes estrategias:

2a) Desenmascaramiento químico mediante tratamientos con el agente demetilante 5- Aza 2'-deoxitidina, lo que permitirá la identificación de genes cuya expresión está regulada por metilación del ADN en secuencias CpG de los promotores (metilación sitio-específica).

2b) Identificación de patrones de metilación sitio- específica asociados a órganos con distintas tasas de proliferación, incluyendo tejidos diferenciados procedentes de etapas normales del desarrollo vegetal y células desdiferenciadas con pautas de crecimiento aberrantes. Este objetivo conducirá a la identificación de genes cuya expresión está controlada por metilación del ADN de forma natural en plantas, aquellos que no manifiestan cambios de metilación asociados a crecimiento, así como genes implicados en la generación de pautas aberrantes de crecimiento celular, cuya expresión varía dependiendo de las tasas de proliferación.

2c) Interacción entre las modificaciones de proteínas de la cromatina y promotores de genes hipermetilados asociados a altas tasas de proliferación celular, es

decir, en secuencias génicas asociadas a mecanismos de supresión del crecimiento vegetal. Tras confirmar los cambios en los niveles de transcritos génicos dependientes de tasas de proliferación, se analizarán los estados específicos de acetilación de histona H3 e histona H4, así como la trimetilación de histona H3 en los genes hipermetilados seleccionados, estudios que permitirán establecer relaciones más específicas entre los distintos componentes del código epigenético.

1.8. BIBLIOGRAFÍA.

Adams, S., Vinkenoog, R., Spielman, M., Dickinson, H.G. & Scott, R.J. 2000. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development* 127: 2493-2502.

Ahuja M.R. 1987. *In vitro* propagation of poplar and aspen. En: J. M. Bonga & D.J. Durzan (eds.), *Cell and tissue culture in forestry* 3, 207-223. Nijhoff, Dordrecht.

Akhtar, A. & Becker, P.B. 2000. Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Molecular Cell* 5: 367-375.

Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L. & Cote, J. 1999. NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO Journal* 18: 5108-5119.

Allfrey, V.G. 1977. Post-synthetic modifications of histone structure: a mechanism for the control of chromosome structure by the modulation of histone-DNA interactions. En: *Chromatin and Chromosome Structure*. H.J. Li & R. Eckhardt (Eds.), Academic Press, New York, pp. 167-191.

Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K. & Resenfeld, M.G. 2002. Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF- κ B and β -amyloid precursor protein. *Cell* 110: 55-67.

Ballester, A., Sánchez, M.C., San-José, M.C., & Vieitez, A.M. 1990. Development of rejuvenation methods for *in vitro* establishment, multiplication and rooting of mature trees. En: R. Rodríguez, R. Sánchez Tamés, & D.J. Durzan (eds.), *Plant aging: Basic and applied approaches*, 43-49. Plenum Press, New York.

Baneres, J.L., Martin, A. & Parello, J. 1997. The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *Journal of Molecular Biology* 273: 503-508.

Bannister, A.J. & Kouzarides, T. 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384: 641-643.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partidge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. & Kouzarides, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromodomain. *Nature* 410: 120-124.

Bartee, L., Malagnac, F. & Bender, J. 2001. *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes and Development* 15: 1753-1758.

Bartl, S., Taplick, J., Lagger, G., Khier, H., Kuchler, K. & Seiser, C. 1997. Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor-inducible gene. *Molecular & Cellular Biology* 17: 5033-5043.

Bauer, U.M., Daujat, S., Nielsen, S.J., Nightingale, K. & Kouzarides, T. 2002. Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Journal* 3: 39-44.

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. & Sauer, F. 2002. Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* 419: 857-862.

Bennetzen, J.L. 1996. The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution. *Trends in Microbiology* 4: 347-353.

Bernacchia, G., Primo, A., Giorgetti, L., Pitto, L. & Cella, R. 1998. Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression. *The Plant Journal* 13(3): 317-329.

Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T. & Schreiber, S.L. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99: 8695-8700.

Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. & Ingram, V. 1988. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. *Journal of Molecular Biology* 203: 971-983.

Bestor, T.H. 1992. Activation of mammalian DNA methyltransferases by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO Journal* 11: 2611-2617.

Boggs, B.A., Cheung, P., Heard, E., Spector, D.L., Chinault, A.C. & Allis, C.D. 2002. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nature Genetics* 30: 73-76.

Bonga, J.M. & von Aderkas, P. 1988. Attempts to micropropagate mature *Larix decidua* Mill. En: M.R. Ahuja (ed.), *Somatic cell genetics of woody plants*, 155-168. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.

Borchert, R., 1976. The concept of juvenility in woody plants. *Acta Horticulturae* 56 : 21-36.

Briggs, S.D., Bryk, M., Strahl, B.D., Cheung, W.L., Davie, J.K., Dent, S.Y., Winston, F. & Allis, C.D. 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* 15: 3286-3295.

Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. & Allis, C.D. 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843-851.

Bryk, M., Briggs, S.D., Strahl, B.D., Curcio, M., Allis, C.D. & Winston, F. 2002. Evidence that Set1, a factor required for methylation of histone H3, regulates rDNA silencing in *S. cerevisiae* by a Sir2-Independent mechanism. *Current Biology* 12: 165-170.

Candau, R., Moore, P.A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C.Y., Rosen, C.A. & Berger, S.L. 1996. Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Molecular & Cellular Biology* 16: 593-602.

Cao, X., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Phillips, R.L., Kaeppler, S. & Jacobsen, S.E. 2000. Conserved plant genes with similarity to mammalian *de novo* DNA methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97(9): 4979-4984.

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. & Zhang, Y. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: 1039-1043.

Cervoni, N., Bhattacharya, S. & Szyf, M. 1999. DNA demethylase is a processive enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 274(13): 8363-8366.

Cervoni, N. & Szyf, M. 2001. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *The Journal of Biological Chemistry* 276(44): 40778-40787.

Chaudhury, A.M., Koltunow, A., Payne, T., Luo M., Tucker, M.R., Dennis, E.S. & Peacock, W.J. 2001. Control of early seed development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 677-699.

Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. & Stallcup, M.R. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284: 2174-2177.

Chen, H., Tini, M. & Evans, R.M. 2001. HATs on and beyond chromatin. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 218-224.

Cheung, P., Allis, C.D. & Sassone-Corsi, P. 2000a. Signaling to chromatin through histone modification. *Cell* 103: 263-271.

Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M. & Allis, C.D. 2000b. Synergist coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Molecular Cell* 5: 905-915.

Clarke, A.S., Lowell, J.E., Jacobson, S.J. & Pillus, L. 1999. Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Molecular Cell Biology* 19: 2515-2526.

Clayton, A.L., Rosse, S., Barratt, M.J. & Mahadevan, L.C. 2000. Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO Journal* 19: 3714-3726.

Cubas, P., Vincent, C. & Coen, E. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401:157-161.

Czermin, B., Schotta, G., Hulsman, B.B., Brehm, A., Becker, P.B., Reuter, G. & Imhof, A. 2001. Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Reports* 2: 915-919.

Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. & Pirrotta, V. 2002. *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111: 185-196.

Dang, M., Brosch, G., Haas, H., Loidl, P. & Lusser, A. 2001. Comparative analysis of HD2 type histone deacetylases in higher plants. *Planta* 213: 280- 285.

Daujat, S., Bauer, U.M., Shah, V., Turner, B.M., Berger, S. & Kouzarides, T. 2002. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation of histone H3. *Current Biology* 12: 2090-2097.

Davie, J.K. & Dent, S.Y. 2002. Transcriptional control: an activating role for arginine methylation. *Current Biology* 12: R59-R62.

De Souza, C.P., Osmani, A.H., Wu, L.P., Spotts, J.L. & Osmani, S.A. 2000. Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 102: 293-302.

Denu, J.M. 2003. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD⁺-dependent deacetylases. *Trends in Biochemical Science* 28: 41-48.

Dobosy, J.R. & Selker, E.U. 2001. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 721- 727.

Eberharter, A. & Becker, P.B. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Reports* 3(31): 224- 229.

Eshed, Y., Baum, S.F. & Bowman, J.L. 1999. Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* 99: 199-209.

Fang, J., Feng, Q., Ketel, C.S., Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Simon, J.A. & Zhang, Y. 2002. Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4- lysine 20- specific methyltransferases. *Current Biology* 12: 1086- 1099.

Feng, Q., Wang, H., Hui Ng, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K. & Zhang, Y. 2002. Methylation of H4- lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Current Biology* 12: 1052- 1056.

Finnegan, E.J. & Dennis, E.S. 1993. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferases from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 21: 2383-2388.

Finnegan, E.J., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93: 8449-8454.

Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1998a. DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 223-247.

Finnegan, E.J., Genger, R.K., Kovac, K., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1998b. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 5824-5829.

Finnegan, E.J. & Kovac, K.A. 2000. Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 43: 189-201.

Finnegan, E.J., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 2000. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development* 10: 217-223.

Fortanier, E.J. & Jonkers, H. 1976. Juvenility and maturity of plants as influenced by their ontogenical and physiological ageing. *Acta Horticulturae* 56: 37-44.

Fraga M., Cañal, M.J., Aragonés A. & Rodríguez, R. 2002. Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. *Annals of Forest Science* 59: 155-161.

Francis, N.J. & Kingston, R.E. 2001. Mechanisms of transcriptional memory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 409-421.

Francllet, A., Boulay, M., Bekkaoui, F., Fouret, Y., Verschoore-Martouzet, B., & Walker, N. 1987. Rejuvenation. En: J. M. Bonga & D. J. Durzan (eds.), Cell and tissue culture in forestry, 232-248. Nijhoff, Dordrecht.

Frye, R.A. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical et Biophysica Research Communications* 273: 793-798.

Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L. & Kouzarides, T. 2000. DNA methyltransferases Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics* 24: 88-91.

Fukuda, T., Sakai, M., Takano, H., Ono, K. & Takio, S. 2004. Hypermethylation of retrotransposons in the liverwort *Marchantia paleacea* var. *diptera*. *Plant Cell Reports* 22: 594-598.

Furner, I.J., Sheikh, M.A. & Collot, C.E. 1998. Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: genetic modifiers and DNA methylation. *Genetics* 149: 651-662.

Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D. & Grandjean, O. 2001. Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*.

Gendall, A.R., Levy, Y.Y., Wilson, A. & Dean, C. 2001. The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* 107: 525-535.

Genger, R.K., Kovac, K.A., Dennis, E.S., Peacock, W.J. & Finnegan, E.J. 1999. Multiple DNA methyltransferases genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 41: 269-278.

Giles, R.H., Peters, D.J. & Breuning, M.H. 1998. Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends in Genetics* 14: 178-183.

Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., García-Wilson, E., Perkins, N.D. & Hay, R.T. 2003. p300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Molecular Cell* 11: 1043-1054.

Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L. & Zhu, J.K. 2002. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111(6):803-14.

Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M. & Coupland, G. 1997. A Polycomb- group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386: 44-51.

Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T. & Takahashi, T. 1999. Identification of a novel phosphorylation site in histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *Journal of Biological Chemistry* 274: 25543-25549.

Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A. & Inagaki, M. 2002. Aurora-B phosphorylates histone H3 at serine 28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 7: 11-17.

Graessle, S., Loidl, P. & Brosch, G. 2001. Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 704-720.

Grant, P.A., Eberharter, A., John, S., Cook, R., Turner, B.M. & Workman, J.J. 1999. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *Journal of Biological Chemistry* 274: 5895-5900.

Gruenbaum, Y., Naveh-Manly, T., Cedar, H. & Razin, A. 1981. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292: 860-862.

Hackett, W.P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Hortic.Rev.* 7, 109-155.

Hackett, W.P. & Murray, J.R. 1993. Maturation and rejuvenation in woody species. En: M.R. Ahuja (ed.), *Micropropagation of woody plants*, 93-105. Kluwer Adac. Publ., Dordrecht.

Hassing, C.A., Tong, J.K., Fleischer, T.C., Owa, T., Grable, P.G., Ayer, D.E. & Schreiber, S.L. 1998. A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 3519-3524.

Hauser, C., Schuettengruber, B., Barti, S., Lagger, G. & Seiser, C. 2002. Activation of the mouse histone deacetylase 1 gene by cooperative histone phosphorylation and acetylation. *Molecular & Cellular Biology* 22: 7820-7830.

Heard, E., Rougeulle, C., Arnaud, D., Avner, P., Allis, C.D. & Spector, D.L. 2001. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* 107: 727-738.

Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ronalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. & Allis, C.D. 1997. Mitosis specific phosphorylation of H3 initiates primarily within pericentric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106: 348-360.

Henikoff, S. & Comai, L. 1998. A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 148: 307-318.

Hill, C.S., Rimmer, J.M., Green, B.N., Finch, J.T. & Thomas, J.O. 1991. Histone-DNA interactions and their modulation by phosphorylation of Ser-Pro-X-Lys/Arg- motifs. *EMBO Journal* 10: 1939-1948.

Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P. & Bradbury, E.M. 1993. Studies of the DNA binding properties of the histone H4 amino terminus. *Journal of Biological Chemistry* 268: 305-314.

Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A. & Hunt, D.F. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ip11/aurora kinase and Glc/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102: 279-291.

Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403: 795-800.

Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X. & Jacobsen, S.E. 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416: 556-560.

Jacobsen, S.E. & Meyerowitz, E.M. 1997. Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science* 277: 1100-1103.

Jasencakova, Z., Soppe, W.J.J., Meister, A., Germand, D., Trner, B.M. & Schubert, I. 2003. Histone modifications in *Arabidopsis*- high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. 2003. *The Plant Journal* 33: 471- 480.

Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. & Richards, E.J. 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genetics* 22: 94-97.

Jeltsch, A. 2002. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBioChem* 3: 274-293.

Jenuwein, T. & Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.

Jin, Y., Wang, Y., Walker, D.L., Dong, H., Conley, C., Johansen, J. & Johansen, K.M. 1999. JIL-1: a novel chromosomal tandem kinase implicate din transcriptional regulation in *Drosophila*. *Molecular Cell* 2: 129-135.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberg, N. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* 19: 187-191.

Jones, P.A. & Takai, D. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068-1070.

Jost, J.P., Siegmann, M., Sun, L. & Leung, R. 1995. Mechanism of DNA demethylation in chicken embryos. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (17): 9734-9739.

Kakutani, T., Jeddeloh, J.A. & Richards, E.J. 1995. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant. *Nucleic Acids Research* 23: 130-137.

Kawasaki, H., Schiltz, L., Chiu, R., Itakura, K., Taira, K., Nakatani, Y. & Yokoyama, K.K. 2000. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* 405: 195-200.

Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., Dejean, A. 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO Journal* 21: 2682-2691.

Kleff, S., Andrulis, E.D., Anderson, C.W. & Sternglanz, R. 1995. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 270: 24674-24677.

Klochbin, S., Verdel, a., Lemerrier, C. & Seigneurin-Berny, D. 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Current Opinion in Genetics & Development* 11: 162-166.

Kloti, A., He, X., Potrykus, I., Hohn, T. & Fütterer, J. 2002. Tissue-specific silencing of a transgene in rice. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99(16): 10881-10886.

Kouzarides, T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetic Development* 12: 198-209.

Kuo, M.H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. & Allis, C.D. 1996. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383: 269-272.

Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E.A. & Allis, C.D. 1998. Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes *in vivo*. *Genes & Development* 12: 627-639.

Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Reinberg, D. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes & Development* 16: 2893-2905.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. 2003. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410: 116-120.

Lacoste, N., Utley, R.T., Hunter, J.M., Poirier, G.G. & Cote, J. 2002. Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 30421-30424.

Leipe, D.D. & Landsman, D. 1997. Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine aminohydrolases are members of an ancient protein superfamily. *Nucleic Acids Research* 25: 3693-3697.

Leo, C. & Chen, J.D. 2000. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245: 1-11.

Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase genes results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.

Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. & Jacobsen, S.E. 2001. Requirement of *CHROMOMETHYLASE3* for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292: 2077-2080.

Liu, B. & Wendel, J.F. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 365-379.

Lo, W.S., Duggan, L., Tolga, N.C., Emre, Belotserkovskaya, R., Lane, W.S., Shiekhatar, R. & Berger, S.L. 2001. Snf1- a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293: 1142-1146.

Loidl, P. 2004. A plant dialect of the histone language. *Trends in Plant Science* 9(2): 84-90.

Lusser, A., Brosch, G., Loidl, A., Haas, H. & Loidl, P. 1997. Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science* 277: 88-91.

Lusser, A., Kolle, D. & Loidl, P. 2001. Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends in Plant Science* 6: 59-65.

Luo, M., Bilodeau, P., Dennis, E.S., Peacock, W.J. & Chaudhury, A. 2000. Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 10637-10642.

Ma, H., Baumann, C.T., Li, H., strahl, B.D., Rice, R., Jelinek, M.A., Aswad, D.W., Allis, C.D., Hager, G.L. & satllcup, M.R. 2001. Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Current Biology* 11: 1981-1985.

Madlung, A., Masuelli, R.W., Watson, B., Reynolds, S.H., Davison, J. & Comai, L. 2002. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiology* 129: 733-746.

Mak, W., Baxter, J., Silva, J., Newall, A.E., Otte, A.P. & Brockdorff, A. 2002. Mitotically stable association of polycomb group proteins *eed* and *enx1* with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells. *Current Biology* 12: 1016-1020.

Malagnac, F., Wendel, B., Goyon, C., Faugeron, G., Zicker, D. 1997. A gene essential for *de novo* methylation and development in *Ascobolus* reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferases structure. *Cell* 91: 281-290.

Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V.B. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *The Plant Cell* 13: 571-583.

Martienssen, R.A. & Colot, V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293: 1070- 1074.

Matzke, A.J.M. & Matzke, M.A. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 142-148.

McGhee, J.D. & Engel, J.D. 1975. Subunit structure of chromatin is the same in plants and animals. *Nature* 254: 449-450.

Mermoud, J.E., Popova, B., Peters, A.H., Jenuwein, T. & Brockdorff, N. 2002. Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Current Biology* 12: 247-251.

Meyerowitz, E.M. 2002. Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* 295: 1482-1485.

Meynier, V. 1985. Contribution de la culture de méristèmes à la micropropagation *in vitro* du noyer. *Annales AFOCEL* 1984 : 187-197.

Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D. & Hess, J.L. 2002. MLL targets SET domain methyltransferases activity to Hox gene promoters. *Molecular Cell* 10: 1107-1117.

Mittelsten Scheid, O., Afsar, K. & Paszkowski, J. 1998. Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 632-637.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. & Kakutani, T. 2001. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* 411: 212-214.

Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L. & Kouzarides, T. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87: 1261-1270.

Müller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E. & Simon, J.A. 2002. Histone methyltransferases activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* 111: 197-208.

Nagy, P.L., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D. & Cleary, M.L. 2002. A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99: 90-94.

Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C.M. & Canaani, E. 2002. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Molecular Cell* 10: 1119-1128.

Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. & Grewald, S.I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292: 110-113.

Nan, X., Hg, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M. & Bird, A. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389.

Narlikar, G.J., Fan, H.Y. & Kingston, R.E. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487.

Neuwald, A.F. & Landsman, D. 1997. GCN5-related histone N-acetyltransferase belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends in Biochemical Science* 22: 154-155.

Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M. & Erdjument-Bromage, H. 1999. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature Genetics* 23: 58-61.

Ng, H.H., Feng, Q., Wang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Zhang, Y. & Struhl, K. 2002. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes & Development* 16: 1518-1527.

Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T. & Herrera, R.E. 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412: 561-565.

Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P. & Reinberg, D. 2002a. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tails modifications required for heterochromatin formation. *Genes & Development* 16: 479-489.

Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P. & Reinberg, D. 2002b. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & Development* 16: 479-489.

Noma, K., Allis, C.D. & Grewald, S.I. 2001. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 293: 1150-1155.

O'Carroll, D., Scherthan, H., Peters, A.H., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A. & Jerratsch, M. 2000. Isolation and

characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Molecular Cell Biology* 20: 9423-9433.

Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J., Somerville, C. 1999. PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryogenic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 13839-13844.

Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M. & Nakatani, Y. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive gene in G0 cells. *Science* 296: 1132-1136.

Okamoto, H. & Hirochika, H. 2001. Silencing of transposable elements in plants. *Trends in Plant Science* 6(11): 527-534.

Okano, M., Xie, S. & Li, E. 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genetics* 19: 219-220.

Olhoft, P.M. 1998. Cloning and characterization of the 5-methylcytosine methyltransferases gene in maize (*Zea mays*) plants and tissue cultures. PhD, Thesis, University of Minnesota, St Paul, MN.

Oliphant, J. L. 1990. Juvenility and maturity of woody species in New Zealand. En: R. Rodríguez, R. Sánchez Tamés, & D.J. Durzan (eds.), *Plant aging: Basic and applied approaches*, 37-42. Plenum Press, New York.

Pandey, R., Müller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W. & Jorgensen. 2002. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 30(23): 5036-5055.

Papa, C., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Meeley, R. & Kaeppler, S.M. 2001. Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation. *The Plant Cell* 13: 1919-1928.

Parthun, M.R., Widom, J. & Gottschling, D.E. 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87: 85-94.

Pennell, R.I. & Bell, P.R. 1987. Megasporogenesis and the subsequent cell lineage within the ovule of *Taxus baccata* L. *Annals of Botany* 59, 693-704.

Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M. & Kohlmaier, A. 2001. Loss of Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107: 323-337.

Peters, A.H., Mermoud, J.E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N. & Jenuwein, T. 2002. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nature Genetics* 30: 77-80.

Pflum, M.K.H., Tong, J.K., Lane, W.S. & Schreiber, S.L. 2001. Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 47733-47741.

Pierik, R.L.M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. En: H. J. J. Nijkamp, L. H. W. van der Plas, & J. van Artrijk (eds.), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, 91-101. Kluwer Acad. Publ, Dordrecht.

Pipal, A., Goralik-Schramel, M., Lusser, A., Lanzanova, C., Sarg, B., Loidl, A., Lindner, H., Rossi, V. & Loidl, P. 2003. Regulation and processing of maize histone deacetylase Hda1 by limited proteolysis. *The Plant Cell* 15: 1904-1917.

Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B. & Zhang, Y. 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300: 131-135.

Pradhan, S., Cummings, M., Roberts, R.J. & Adams, R.L.P. 1998. Isolation, characterization and baculovirus-mediated expression of the cDNA encoding cytosine DNA methyltransferase from *Pisum sativum*. *Nucleic Acids Research* 26: 1214-1222.

Puig, O.M., Belles, E., López-Rodas, G., Sendra, R. & Tordera, V. 1998. Interaction between N-terminal domain of H4 and DNA is regulated by the acetylation degree. *Biochimica et Biophysica Acta* 1397: 79-80.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P. & Allis, C.D. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406: 593-599.

Reid, R., Greene, P.J. & Santi, D.V. 1999. Exposition of a family of RNA m⁵C methyltransferases from searching genomic and proteomic sequences. *Nucleic Acids Research* 27: 3138-3145.

Rice, J.C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D. & Allis, C.D. 2002. Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes & Development* 16: 2225-2230.

Richards, E.J. & Elgin, S.C.R. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108: 489-500.

Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L. & Wolffe, A.P. 2000. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and repress transcription from E2F-responsive promoters. *Nature Genetics* 25: 338-342.

Roe, J.L., Rivin, C.J., Sessions, R.A., Feldmann, K.A. & Zambryski, P.C. 1999. The *Tousled* gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell* 75: 939-950.

Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W.W., Wilm, M., Aasland, R. & Stewart, A.F. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO Journal* 20: 7137-7148.

Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J. & Dellaporta, S.L. 1996. Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* 273: 654-657.

Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCalum, C.M. & Henikoff, S. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research* 26: 1628-1635.

Roth, S.Y., Denu, J.M. & Allis, C.D. 2001. Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 70: 81-120.

Rountree, M.R., Bachman, K.E. & Baylin, S.B. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication loci. *Nature Genetics* 25: 269-277.

Santos, D. & Fevereiro, P. 2002. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 155-161.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sheriff, j., Bernstein, B.E., Tolga Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. & Kouzarides, T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419: 407-411.

Sassone-Corse, P., Mizzen, C.A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A. & Allis, C.D. 1999. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 285: 886-891.

Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vasilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D. & Nakatani, Y. 1999. Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *Journal of Biological Chemistry* 274: 1189-1192.

Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffman, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R. & Reuter, G. 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO Journal* 21: 1121-1131.

Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G. & Rauscher, F.J. 2002. SETDB1: a novel KAP-1 associated histone H3 lysine 9 methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes & Development* 16: 919-932.

Schurter, B.T., Koh, S.S., Chen, D., Bunick, G., Harp, J.M., Hanson, B.L., Henschen-Edman, A., Mackay, D.R., Stallcup, M.R. & Aswad, D.W. 2001. Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferases 1. *Biochemistry* 40: 5747-5756.

Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M. & Levy, A.A. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *The Plant Cell* 13: 1749-1759.

Shen, W.F., Krishnan, K., Lawrence, H.J. & Largman, C. 2001. The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. *Molecular & Cellular Biology* 21: 7509-7522.

Silva, J., Mak, W., Zvetkova, I., Appanah, R., Nesterova, T.B., Webster, Z., Peters, A.H., Jenuwein, T., Otte, A.P. & Brockdorff, N. 2003. Establishment of the histone H3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Developmental Cell* 4: 481-495.

Smith, E.R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R.G., Lucchesi, J. & Allis, C.D. 1998. ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 3561-3565.

Smith, E.R., Pannuti, A., Gu, W., Steurnagel, A., Cook, R.G., Allis, C.D. & Lucchesi, J.C. 2000. The *Drosophila* MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Molecular Cell Biology* 20: 312-318.

Sobel, R.E., Cook, R.G., Perry, C.A., Annunziato, A.T. & Allis, C.D. 1995. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 1237-1241.

Soppe, W.J.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Shubert, I. & Fransz, P. 2002. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 21(23): 6549-6559.

Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y. & Tsai, M.J. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389: 194-198.

Spiker, S. & Krishnaswamy, L. 1973. Constancy of wheat histones during development. *Planta* 110: 71-76.

Spotswood, H.T. & Turner, B.M. 2002. An increasing complex code. *Journal of Clinical Investigation* 110: 577-582.

Sterner, D.E. & Berger, S.L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 435-459.

Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G. & Allis, C.D. 1999. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 14967-14972.

Strahl, B.D. & Allis, D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.

Strahl, B.D., Briggs, S.D., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Mollah, S., Cook, R.G., Shabanowitz, J. & Hunt, D.F. 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Current Biology* 11: 996-1000.

Strahl, B.D., Grant, P.A., Briggs, S.D., Sun, Z.W., Bone, J.R., Caldwell, J.A., Mollah, S., Cook, R.G., Shabanowitz, J. & Hunt, D.F. 2002. Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Molecular & Cell Biology* 22: 1298-1306.

Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T. & Tarakhovskiy, A. 2003. Ezh2 controls B cell cycle development through histone H3 methylation and IgH rearrangement. *Nature Immunology* 4: 124-131.

Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J. & Grunstein, M. 2001. Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Molecular Cell* 8: 473-479.

Surani, M.A. 2001. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122-128.

Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. & Shinkai, Y. 2001. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *Journal of Biological Chemistry* 276: 25309-25317.

Tachibana, M., Sugimoto, K., Nazaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H. & Kato, H. 2002. G9a histone methyltransferase plays a

dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & Development* 16: 1779-1791.

Tamaru, H. & Selker, E.U. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277-283.

Thomson, S., Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., Rose, S., Barratt, M.J. & Mahadevan, L.C. 1999. The nucleosomal response associated with immediate-early induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO Journal* 18: 4779-4793.

Thorpe, T.A. & Hield, H.Z. 1970. Gibberellin and rejuvenation in *Citrus*. *Phyton* 27: 63-68.

Turner, B.M. 1998. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 21-31.

Turner, B.M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* 22: 836-845.

Turner, B.M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-291.

Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T. & Kadonaga, J.T. 1999. The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* 402: 555-560.

van Holde, K.E. 1988. The Proteins of Chromatin. I. Histones. En: *Chromatin*, Springer-Verlag (Ed.), New York, pp. 69-180.

van Leeuwen, F., Gafken, P.R. & Gottschling, D.E. 2002. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* 109: 745-756.

Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. & Trouche, D. 2001. Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Molecular Cell Biology* 21: 6484-6494.

Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G. & Otte, A.P. 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624-629.

Vinkenoog, R., Spielman, M., Adams, s., Fischer, R.L., Dickinson, H.G., Scott, R.J. 2000. Hypomethylation promotes autonomous endosperm development and rescues postfertilization lethality in *fi*e mutants. *The Plant Cell* 12: 2271-2282.

Vinkenoog, R. & Scott, R.J. 2001. Autonomous endosperm development in flowering plants: how to overcome the imprinting problem? *Sexual Plant Reproduction* 14: 189-194.

Wade, P.A., Geronne, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F. & Wolffe, A.P. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylation. *Nature Genetics* 23: 62-66.

Wagner, D. & Meyerowitz, E.M. 2002. SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Current Biology* 12: 85-94.

Wagner, D. 2003. Chromatin regulation of plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 20-28.

Wang, Y., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P. & Zhang, Y. 2001a. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferases. *Molecular Cell* 8: 1207-1217.

Wang, H., Zhang, W., Jin, Y., Johansen, J. & Johansen, K.M. 2001b. The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell* 105: 433-443.

Wang, J., Mager, J., Chen, Y., Schneider, E., Cross, J.C., Nagy, A. & Magnuson, T. 2001c. Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nature Genetics* 28: 371-375.

Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J. & Tempst, P. 2001d. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293: 853-857.

Waterborg, J.H. 1992. Identification of five sites of acetylation in alfalfa histone H4. *Biochemistry* 31: 6211-6219.

Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. & Allis, C.D. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97: 99-109.

Weiss, A., Keshet, I., Razin, A. & Cedar, H. 1996. DNA demethylation in vitro: involvement of RNA. *Cell* 86: 709-718.

Wolffe, A.P. & Matzke, M.A. 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286: 481-486.

Wong, J., Patterton, D., Imhof, A., Shi, Y.D. & Wolffe, A.P. 1998. Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *EMBO Journal* 17: 520-534.

Wu, K., Tian, L., Malik, K., Brown, D. & Miki, B. 2000. Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 22: 19-27.

Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., Okumura, K. & Li, E. 1999. Cloning, expression and chromosome locations of the human *DNMT3* gene family. *Gene* 236: 87-95.

Xin, Z., Tachibana, M., Guggiari, M., Heard, E., Shinkai, Y. & Wagstaff, J. 2003. Role of histone methyltransferases G9a in CpG methylation of the Prader-Willi syndrome imprinting center. *Journal of Biological Chemistry* 278(17):14996-5000.

Xu, L., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current Opinion in Genetic Development* 9: 140-147.

Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B.M., Montminy, M. & Evans, R.M. 2001. A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* 294: 2507-2511.

Yang, L., Xia, L., Wu, D.Y., Wang, H., Chansky, H.A., Schubach, W.H., Hickstein, D.D. & Zhang, Y. 2002. Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferases that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene* 21: 148-152.

Yoder, J.A. & Bestor, T.H. 1998. A candidate mammalian DNA methyltransferases related to Pmt1p of fission yeast. *Human Molecular Genetics* 7: 279-284.

Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z.R. & Takahashi, S. 2001. EMBRYONIC FLOWER2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 2471-2481.

Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D. & Kouzarides, T. 2002. Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *Journal of Biological Chemistry* 277: 11621-11624.

Capítulo II

DINÁMICA TEMPORAL Y ESPACIAL DE LA METILACIÓN DEL ADN DURANTE EL DESARROLLO DE *Pinus radiata* D. Don.

2.1. INTRODUCCIÓN.

La metilación del ADN, una de las modificaciones epigenéticas mejor caracterizadas en organismos eucariotas superiores, desempeña un papel fundamental en la regulación de los procesos de desarrollo (Finnegan et al., 2000; Meehan, 2003). En animales, la metilación del ADN es esencial para que los mecanismos que determinan embriogénesis se produzcan de modo correcto (Brandeis et al., 1993). Se ha comprobado que niveles reducidos de 5-mC genómica resultan letales en embriones de ratón, produciéndose abortos espontáneos durante la gestación (Li et al., 1992). Además, la metilación del ADN en animales resulta determinante de procesos de imprinting genómico (Razin & Ceglar, 1994), inactivación de cromosoma X (Surani, 2001), así como controla el silenciamiento de transposones, retrotransposones o retrovirus (Yoder et al., 1997).

En plantas, la metilación del ADN también ejerce funciones fundamentales para el correcto desarrollo del organismo pero, a diferencia del comportamiento en animales, los estados de demetilación no resultan letales sino que generan una serie de efectos pleiotrópicos que pueden determinar la implantación de nuevos patrones de diferenciación y morfogénesis. Actualmente se dispone de herramientas que permiten la obtención de plantas con una reducción general de metilación del ADN, entre ellas: tratamientos con agentes demetilantes (Sano et al., 1990), mutaciones en el gen *DDMI* (*Decrease of DNA methylation 1*) codificante de un miembro de la familia de los

factores remodeladores de la cromatina SWI2/SNF2 (Jeddeloh et al., 1999) o el empleo de secuencias antisentido que suprimen la expresión de DNMTs (Finnegan et al., 1998). Las consecuencias de la hipometilación inducida incluyen una serie de anormalidades fenotípicas como pérdida de la dominancia apical, desarrollo foliar aberrante o cambios en los patrones temporales de la floración (Burn et al., 1993; Fieldes & Amyot, 1999; Finnegan et al., 1998; Genger & Peacock, 2003). Estas anormalidades son fruto de la fuerte correlación existente entre la metilación del ADN y el control de la expresión de genes específicos (Bird, 1986; Jones & Takai, 2001; Santos & Feveireiro, 2002). En consecuencia, las pautas de metilación de genes específicos han de variar a lo largo del desarrollo, estableciéndose patrones de metilación tiempo-dependientes para cada gen o conjunto de genes.

Se han identificado variaciones en los niveles globales de 5-mC genómica en función de la etapa del desarrollo del individuo, es decir, pautas de metilación global del ADN genómico que, aunque no proveen información de la expresión de genes específicos, han permitido establecer marcadores de procesos de envejecimiento en varias especies vegetales (Zlucova et al., 2001; Bitonti et al., 2002; Fraga et al., 2002b,c; Baurens et al., 2004). El estudio de los procesos de envejecimiento y revigorización en especies leñosas constituye un área de investigación muy importante, no sólo por su incidencia sobre la clonación sino por sus implicaciones en campos de interés económico como floración, fructificación y programas de selección, conservación y mejora.

Ahora bien, la metilación del ADN regula la expresión génica diferencial generando pautas específicas, no solo a lo largo del tiempo, sino entre los distintos órganos. Existen diferencias importantes en los procesos de maduración de tejidos localizados en diferentes partes de la planta (Greenwood et al., 1990), diferencias que reflejan distintas competencias morfogénicas. Por ejemplo, en especies leñosas, las ramas de las regiones basales del árbol mantienen características de individuos juveniles, por lo que se consideran los tejidos más apropiados para ser utilizados en programas de multiplicación vegetativa de individuos adultos seleccionados (Bonga, 1980). Además, la capacidad de consolidación de microinjertos de *P. radiata* está condicionada, no solo por el envejecimiento del individuo, sino también por el estado de maduración de los órganos seleccionados como púa (Fraga et al., 2002a).

Así pues, tanto el envejecimiento como la maduración, inducen pérdida de competencia hasta hacer imposible la mayor parte de los procesos de multiplicación. La recuperación parcial de competencia morfogénica en fases adultas es factible cuando se aplican procesos efectivos de revigorización (Hackett, 1985; Pierik, 1990; Bonga, 1993). La reversión de los procesos de envejecimiento y maduración, en términos de capacidad morfogénica, implica que algunas de las bases moleculares responsables de estos procesos, entre ellas la metilación del ADN (Fraga et al., 2002d), han de ser estables, -mantienen estados de diferenciación determinados-, pero no estáticas, -permitiendo cambios en la expresión específica de genes.

Actualmente no existen estudios sobre la dinámica de metilación global del ADN en relación con el grado de maduración de órganos en especies leñosas, aspecto que se aborda en este Capítulo. Mediante el análisis de los contenidos globales de 5-mC en distintas etapas de desarrollo ontogénico y en órganos de *P. radiata* con distinto grado de diferenciación, se pretende analizar la posible interrelación entre fases de desarrollo, maduración de órganos y metilación global del ADN. La certificación de resultados se efectuará mediante el estudio de los cambios de metilación inducidos por poda intensiva. Los resultados obtenidos permitirán establecer conclusiones acerca de las bases epigenéticas que subyacen en los procesos de envejecimiento-revigorización de individuos y maduración de órganos.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.2.1. Material vegetal.

Los materiales utilizados procedieron del Programa de Mejora Genética del Centro Neiker (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario) y fueron cedidos por Viveros Oihamberri (Bilbao). Se seleccionaron individuos de *Pinus radiata* D. Donde: a) distintas procedencias, b) diferentes edades y c) distintas etapas de desarrollo ontogénico. Para validar resultados se incluyeron como material de estudio individuos revigorizados procedentes de cepa madre a las que se les había efectuado distintos turnos de podas intensivas. Se consideraron para el estudio los siguientes órganos (Figura 2.1): (i) ápices caulinares (AC), porciones apicales con yema apical terminal y prófilos (Figura 2.1b), (ii) fascículos aciculares (FA) tomados de regiones próximas al ápice caulinar (Figura 2.1c) y (iii) primordios aciculares de 1 mes de edad (b1) de 13 mm de longitud (Figura 2.1e) localizados en unidades de crecimiento anual de primavera. En todos los casos, los órganos analizados se dividieron en porciones apicales y porciones basales.

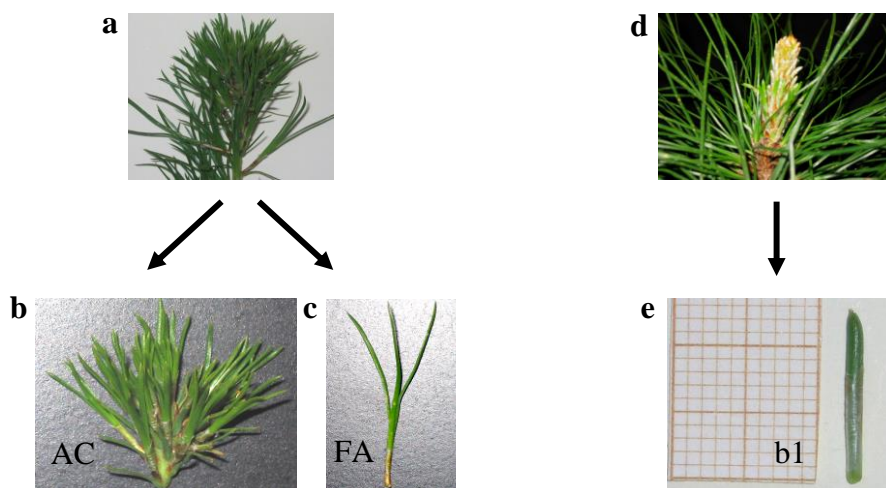


Figura 2.1. Localización y origen de los órganos analizados. A partir de regiones apicales (a) se escindieron ápices caulinares (b) de individuos de 1, 4, 7, 8, 12, 20, 24, 36 y 48 meses de desarrollo, así como fascículos aciculares (c) de individuos de 4, 7, 8 y 20 meses de edad. De unidades de crecimiento anual (d) se escindieron primordios aciculares b1 (e) de individuos de 36 y 48 meses.

2.2.1.1. Efecto del genotipo.

Se utilizaron ápices caulinares y fascículos aciculares de plántulas de 8 meses generadas a partir de: a) semillas de cruces no controlados y b) semillas del cruce 68 Iurre x 42 Orozco.

2.2.1.2. Efecto del desarrollo ontogénico y cambio de fase.

Se utilizaron individuos procedentes de semilla seleccionada (cruce 68 Iurre x 42 Orozco) de 1, 4, 7, 8, 12, 20, 24, 36 y 48 meses de desarrollo (Figura 2.2). En base a la arquitectura se analizaron los órganos que se indican en las siguientes fases de desarrollo:

a) Fases juveniles:

a.1) *Plántulas* de 1 mes a 12 meses (J1). En todos los casos se dispuso de ápices caulinares y entre 4-8 meses también se tomaron fascículos aciculares.

a.2) *Árboles con arquitectura sencilla* de 12 a 24 meses de desarrollo que presentan 3 niveles de ramificación y ausencia de capacidad de floración (J2). Se analizaron ápices caulinares de individuos de 12, 20 y 24 meses, así como fascículos aciculares en el caso de individuos de 20 meses.

b) Fases adultas vegetativas:

b.1) *Árboles con arquitectura compleja* de 36 meses de desarrollo, con al menos 5 niveles de ramificación y sin capacidad reproductiva (MV). Se analizaron ápices caulinares en todas las fases de desarrollo y primordios b1 de árboles de 36 meses.

c) Fases adultas reproductivas:

c.1) *Árboles con arquitectura compleja* de 48 meses de desarrollo con más de 5 niveles de ramificación y con evocación floral manifiesta (MR). Se dispuso de los órganos indicados en el Apartado b.1.

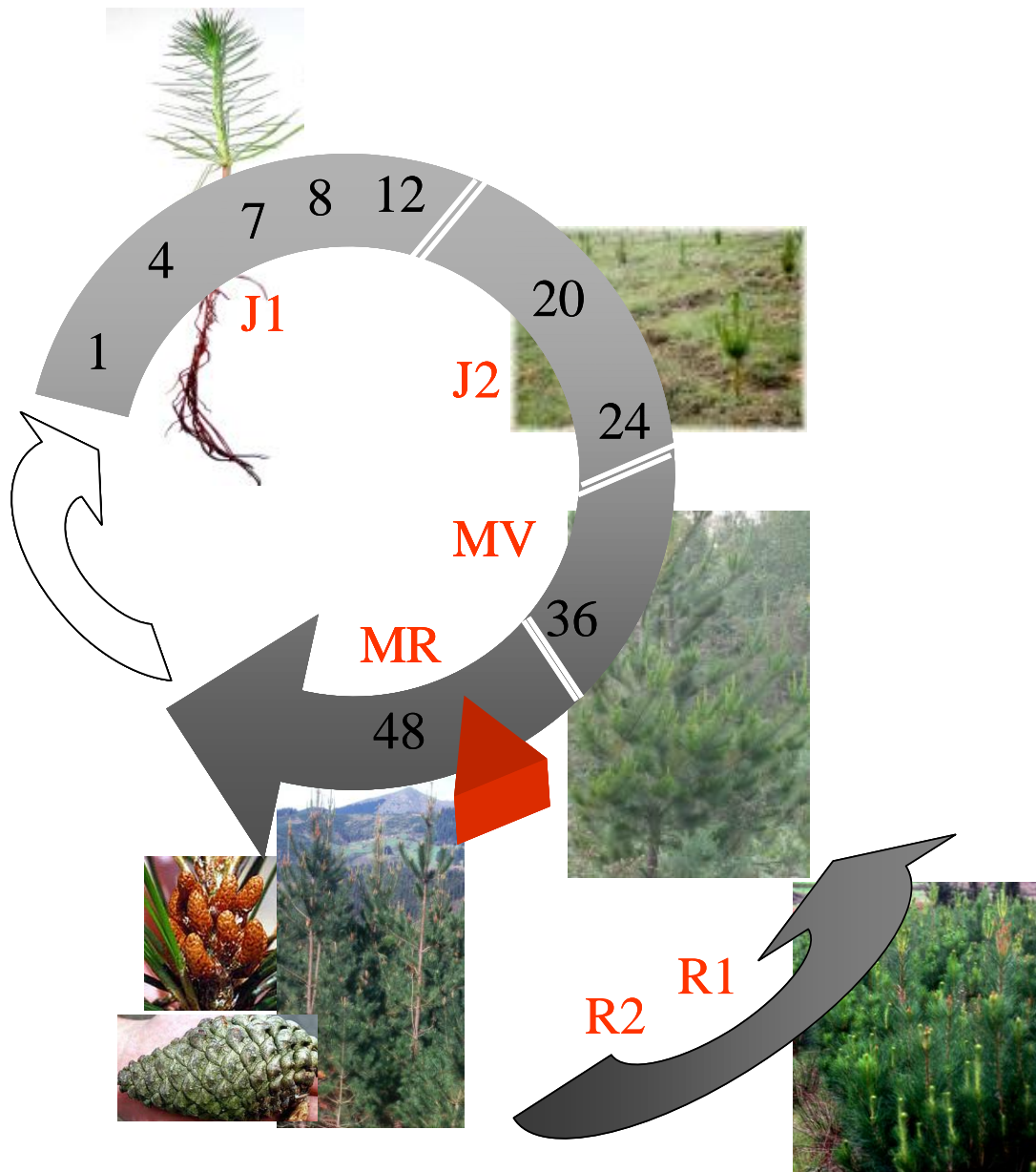


Figura 2.2. Etapas del desarrollo ontogénico y estados de revigorización analizados: J1, fases juveniles tempranas (individuos desde 1 hasta 12 meses de edad); J2, fases juveniles tardías (desde 12 a 24 meses); MV, estados maduros vegetativos (desde 24 hasta 36 meses); MR, estados maduros reproductivos (36-48 meses); R1, fases de revigorización grado 1 (cepas madre de 24 meses con 4 turnos de poda); R2, fases de revigorización grado 2 (cepas madre de 48 meses, 8 turnos de poda).

2.2.1.3. Efecto de la aplicación de podas intensivas sobre cepas madre.

Se consideraron individuos con distinto grado de revigorización obtenidos mediante aplicación de distinta intensidad de poda sobre ejemplares adultos (Figura 2.2).

- R1: cepas madre, individuos adultos preparados para ser utilizados como fuente de estaquillas, que experimentaron 4 turnos de poda en 24 meses.
- R2: cepas madre que experimentaron 8 turnos de poda intensiva en 48 meses.

En ambos casos se analizaron ápices caulinares que fueron recogidos 7 meses después de haberse realizado la última poda.

2.2.2. Cuantificación del grado de metilación global del ADN genómico mediante HPCE.

La extracción de ADN, su hidrólisis y la cuantificación del contenido de 5- metil 2'-deoxicitidina (5-mdC) se llevó a cabo según el protocolo optimizado en nuestro laboratorio para el análisis del grado de metilación de ADN genómico mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) (Fraga et al., 2002e). Para la extracción del ADN se empleó el kit de extracción para plantas Nucleon Phytopure (Amershand). Se realizó una digestión con 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ RNAsa A (Sigma S.A.) a 37 °C durante 30 min para obtener muestras libres de ácidos ribonucleicos. El ADN genómico se precipitó con 2-isopropanol frío (-20 °C) y el precipitado obtenido se lavó con etanol 70% frío (-20 °C). Una vez seco, el ADN genómico se resuspendió en 30 μl de agua destilada y se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

La obtención de nucleósidos libres a partir del ADN genómico se llevó a cabo mediante hidrólisis enzimática. Para ello se introdujeron los tubos con las muestras de ADN en una baño de agua a 100 °C durante 2 min y se enfriaron rápidamente en hielo

durante 5 min. Tras añadir 1,25 μl de 10 mM ZnSO_4 y 2,5 μl de nucleasa P1 (Sigma S.A., 200 unidades. ml^{-1} en 30 mM $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$), se incubaron durante 16 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 1,25 μl de tampón Tris (0.5 M, pH 8.3) y 1,0 μl de fosfatasa alcalina (Sigma S.A., 50 unidades. ml^{-1} en 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y se mantuvieron 2 h a 37 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 15000 g durante 20 min y se almacenaron a 4 °C.

Las separaciones se realizaron mediante un capilar de sílice abierto (Waters Chromatography S.A.) (600 x 0,075 mm, longitud efectiva 570 mm) montado en un equipo de electroforesis capilar (Capillary Ion Analyzer, Waters Chromatography S.A.), conectado a una unidad de procesamiento de datos Millennium 2010 (Waters Chromatography S.A.). Como electrolito se empleó 48 mM NaHCO_3 pH 9.6 más 60 mM SDS (Sigma, S.A.). Las temperaturas de trabajo y los voltajes empleados fueron 20 °C y 17 kV, respectivamente. La absorbancia de las bases fue monitorizada a 254 nm. Los hidrolizados de las muestras se inyectaron hidrostáticamente a una altura de 9.8 cm sobre el cátodo durante 15 s.

El grado de metilación del ADN genómico se cuantificó mediante el cálculo del porcentaje relativo de 5-mdC de la siguiente forma: $\text{área de 5-mdC} \times 100 / (\text{área 5-mdC} + \text{área dC})$. Se realizaron tres extracciones de ADN por muestra y de cada extracción se realizaron 2 análisis de HPCE.

2.3. RESULTADOS.

2.3.1. Efecto de la procedencia sobre los niveles de 5-mdC en plántulas.

Al analizar el ADN genómico en fascículos aciculares y en ápices caulinares de plántulas de 8 meses procedentes de semillas no seleccionadas y de semillas de cruces controlados, se constata que los niveles de 5-mdC son idénticos a pesar del distinto genotipo (Figura 2.3). En ambos casos, los porcentajes de metilación del ADN genómico dependen del órgano analizado, cuantificándose niveles de 5-mdC superiores en fascículos aciculares, más diferenciados, que en ápices caulinares que contienen la yema apical y prófilos, aunque ambos órganos procedan de individuos con la misma edad cronológica (Figura 2.3).

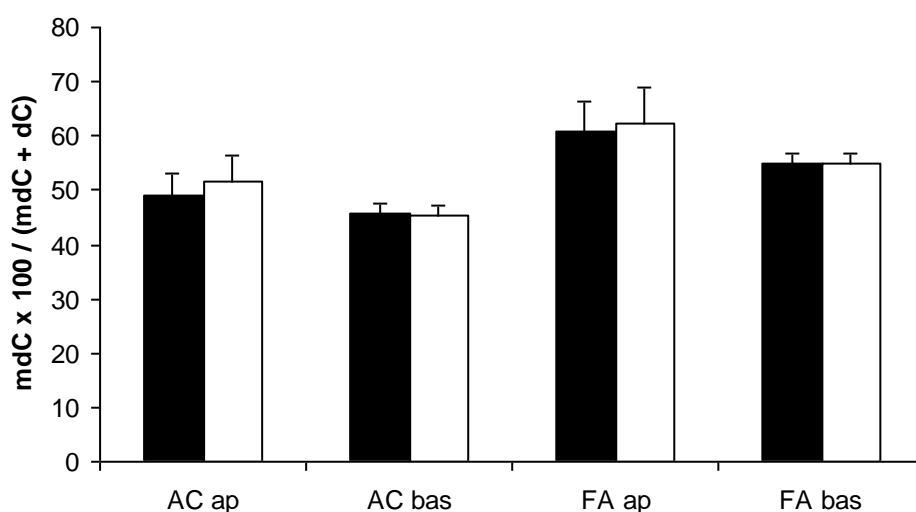


Figura 2.3. Porcentajes de metilación del ADN genómico en porciones apicales (AC ap) y basales (AC bas) de ápices caulinares y en regiones apicales (FA ap) y basales (FA bas) de fascículos aciculares de plántulas de 8 meses de edad, procedentes de semilla seleccionada (barras negras) y semilla no seleccionada (barras blancas). Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. mdC, 5-metil 2'-deoxicidina; dC, 2'-deoxicidina.

En regiones apicales de ápices caulinares se cuantifican niveles de 5-mdC del 50% (Figura 2.3) en ambos tipos de plántulas, mientras que en regiones basales los porcentajes de metilación del ADN son del 45%.

En el caso de fascículos aciculares, tanto en regiones apicales como en regiones basales, los niveles de 5-mdC son superiores a los de ápices caulinares. Como en ápices caulinares, se cuantifica mayor metilación del ADN en regiones apicales que en porciones basales con porcentajes de metilación del 61% y 55%, respectivamente (Figura 2.3).

2.3.2. Niveles de 5-mdC genómica dependientes del estado de desarrollo ontogénico y del grado de maduración del órgano.

Descartadas posibles variaciones dependientes de genotipo, se pone de manifiesto que los niveles de 5-mdC varían en función de la fase del desarrollo ontogénico del individuo (variación temporal) y presentan variaciones órgano-dependientes (variación espacial). También se constata que existe relación entre metilación del ADN y el grado de diferenciación del órgano.

2.3.2.1. Dinámica de metilación en ápices caulinares.

La metilación del ADN en ápices caulinares (Figura 2.4) aumenta progresivamente en el desarrollo de la fase juvenil temprana (J1), tanto en partes apicales como en basales. El cambio de modelo de desarrollo a fases juveniles tardías (J2) es concomitante con una estabilidad de la metilación tanto en regiones basales como apicales. Sin embargo, la transición progresiva de estado maduro vegetativo (MV) a maduro reproductivo (MR), implica cambios de metilación tejido-espacio-dependientes. En estas fases, se mantienen los niveles de metilación en regiones apicales de ápices caulinares, mientras que se hace manifiesta una demetilación progresiva en regiones basales.

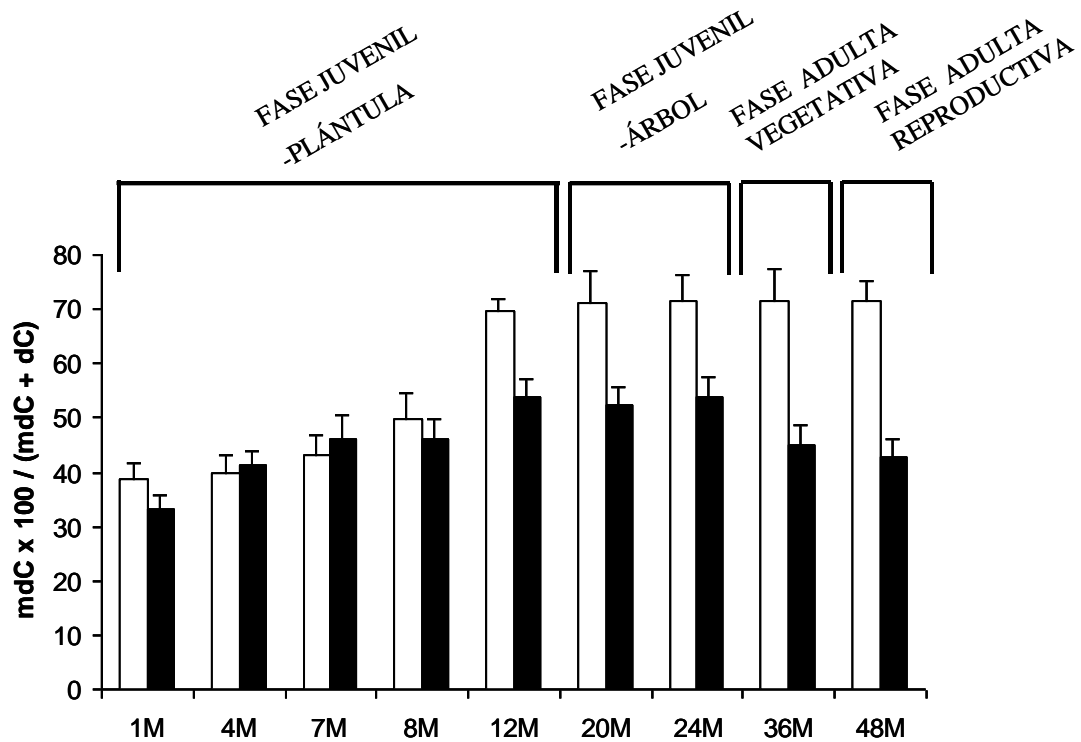


Figura 2.4. Dinámica de metilación temporal y espacial en porciones apicales (barras blancas) y porciones basales (barras negras) de ápices caulinares durante el desarrollo ontogénico. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. mdC, 5-metil 2'-deoxicitidina; dC, 2'-deoxicitidina. En el eje de abscisas se representa la edad ontogénica del individuo (en meses).

2.3.2.2. Cambios de metilación del ADN durante la ontogénesis de fascículos aciculares.

En todos los fascículos aciculares analizados, correspondientes a fases juveniles, se demuestra una dinámica de metilación semejante a la descrita para ápices caulinares. Las regiones apicales aumentan progresivamente su nivel de metilación del ADN desde valores del 40% en individuos de 4 meses de desarrollo hasta porcentajes del 70% en individuos de 20 meses de edad. Sin embargo, la región basal de individuos de 20 meses manifiesta demetilación (Figura 2.5) respecto a fases de desarrollo previas.

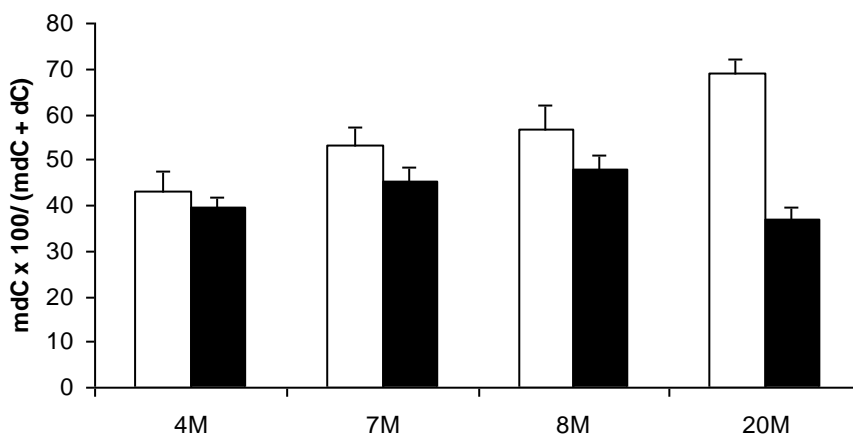


Figura 2.5. Evolución de la metilación durante el desarrollo ontogénico de fascículos aciculares. Se muestran los valores obtenidos para porciones apicales (barras blancas) y porciones basales (barras negras). Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. mdC, 5-metil 2'-deoxicitidina; dC, 2'-deoxicitidina. En el eje de abscisas se representa la edad ontogénica del individuo (en meses).

2.3.2.3. Cambios de metilación del ADN en primordios aciculares b1 de fases maduras vegetativas y fases maduras reproductivas.

No se cuantifican diferencias en los niveles de 5-mdC (71%) en segmentos apicales (b1a) de árboles de 36 y 48 meses de desarrollo (Figura 2.6). Sin embargo, hay hipermetilación en los segmentos basales (b1b), con niveles de 5-mdC del 36% para árboles sin capacidad de floración de 36 meses de edad, mientras que árboles con capacidad reproductiva de 48 meses presentan un 65% de sus citosinas genómicas metiladas (Figura 2.6).

2.3.3. Dinámica reversible de metilación del ADN inducida por revigorización.

La poda intensiva induce demetilación en regiones basales y apicales de ápices caulinares, descensos de metilación que se mantienen al menos hasta 7 meses después de haberse efectuado el tratamiento (Figura 2.7).

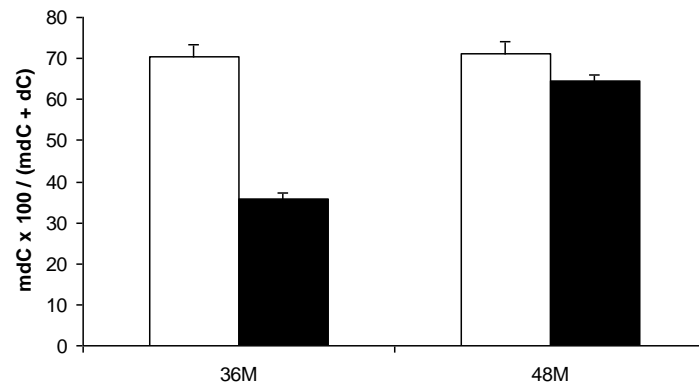


Figura 2.6. Cambios de metilación del ADN en segmentos apicales (barras blancas) y segmentos basales (barras negras) de primordios acilares b1 durante el cambio de fase. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. mdC, 5-metil 2'-deoxicidina; dC, 2'-deoxicidina. En el eje de abscisas se representa la edad ontogénica del individuo (en meses).

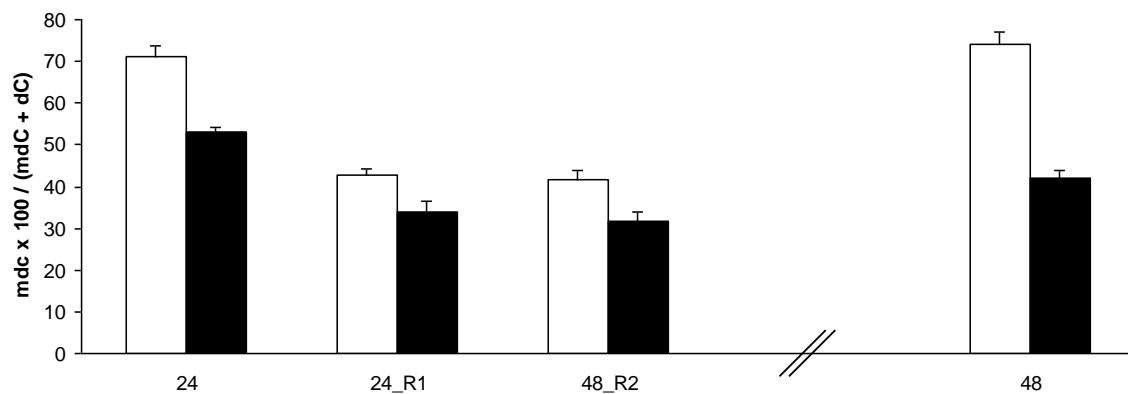


Figura 2.7. Dinámica de metilación en segmentos apicales (barras blancas) y segmentos basales (barras negras) de ápices caulinares en etapas no revigorizadas (24 y 48 meses), así como en cepas madre revigorizadas de 24 y 48 meses (24_R1 y 48_R2). Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. mdC, 5-metil 2'-deoxicidina; dC, 2'-deoxicidina. Los resultados en individuos de 48 meses se muestran separados, puesto que son los únicos en los que se manifiesta capacidad floral y, por tanto, se incluye un factor más a parte del efecto de la revigorización.

2.4. DISCUSIÓN.

El análisis de los niveles de 5-mdC en plántulas de la misma edad pero genéticamente distintas indica que la metilación global del ADN, como mecanismo implicado en el desarrollo, no está influenciada por el genotipo del individuo de la misma especie, apoyando resultados anteriores realizados con distintas procedencias de *P. radiata* (Fraga et al., 2002d). Se pone de manifiesto que la dinámica de metilación global del ADN está asociada a fases concretas de desarrollo y afecta de modo diferencial a los órganos que integran el individuo en función de su diferenciación. En conjunto un individuo constituye un mosaico de situaciones de metilación, datos que apoyan el papel de la metilación del ADN sobre la regulación de las pautas de desarrollo y diferenciación (Meyerowitz 1997; Finnegan et al., 1998; Lenhard & Laux, 1999; Fieldes & Amyot, 1999; Genger & Peacock, 2003) mediante la activación/represión de genes específicos (Razin & Riggs, 1980; Jacobsen & Meyerowitz 1997; Martienssen, 1998; Cubas et al., 1999). En consecuencia, los mecanismos de control epigenético que regulan la correcta transición entre etapas de desarrollo en individuos de la misma especie, deben desarrollar su papel independientemente del genotipo.

Por otra parte, es importante el hecho de que la metilación del ADN varía en función del órgano vegetal, estando asociada a su grado de maduración/diferenciación. En todos los casos estudiados la porción apical, constituida por tejidos diferenciados, presentan niveles de metilación superiores a la correspondiente porción basal, menos diferenciada al presentar en ápices caulinares yemas terminales y en fascículos aciculares poblaciones meristemáticas protegidas por vainas. Actualmente, se acepta que la metilación del ADN es un mecanismo de control de la diferenciación mediante la regulación de la expresión de genes tejido-específicos, así como a través del control de la estabilidad o mantenimiento de estados celulares (Babinger et al., 2001).

La dinámica espacial de metilación del ADN se pone de manifiesto claramente al analizar los resultados obtenidos en ápices caulinares y en primordios aciculares b1. A pesar de que en ambos órganos existen diferencias temporales ápice-base, es importante destacar que en regiones apicales de ápices caulinares se alcanzan altos niveles de metilación coincidiendo con la madurez del individuo, situación que se

mantiene estable incluso durante el cambio de fase. Por el contrario, la región basal, espacio físico donde tendrá lugar la evocación y manifestación floral, experimenta tras una situación estable de altos niveles de metilación coincidiendo con fase vegetativa adulta, demetilación para facilitar la consiguiente reprogramación celular.

Sin embargo, en primordios aciculares, concretamente en estados de desarrollo b1, a pesar de existir también diferencias ápice-base consecuencia de la diferenciación acrópeta de la acícula y de la localización basal de meristemas, se observa un incremento progresivo del porcentaje de metilación tanto en porciones apicales como basales. El incremento de metilación en porciones basales constituye un indicador de estado cronológico y de envejecimiento.

En consecuencia, el cambio de fase, que es resultado del desarrollo ontogénico, afecta de forma diferencial -metilación espacial-, a órganos que sustentan floración (ápices caulinares) y a otros órganos del mismo individuo que van a mantener desarrollo vegetativo (primordios aciculares b1).

Todo lo anteriormente expuesto queda validado por los cambios en el *estatus* de metilación que experimentan ápices caulinares tras revigorización mediante podas intensivas. En los dos tratamientos de poda se induce demetilación en regiones apicales y basales. Además, la intensidad de demetilación es función de la intensidad de tratamiento revigorizante y, al menos, se mantiene estable durante los 7 meses evaluados. Resultados similares ya han sido puestos de manifiesto al estudiar el efecto revigorizante inducido mediante macroinjerto (Fraga et al., 2002d). De los resultados comentados se puede concluir que la recuperación de la competencia morfogénica está asociada a procesos de demetilación. Al igual que durante el cambio de fase, la demetilación abre nuevas posibilidades de reprogramación, en este caso, de las posibilidades de multiplicación clonal y de enraizamiento.

Existe un aspecto de importancia y es la estabilidad del *estatus* de metilación tras la demetilación inducida por revigorización. Como se comentó anteriormente, este aspecto implica que la dinámica de metilación puede ser estable y, en consecuencia, mantendrá grados de diferenciación y competencia, pero que también es reversible cuando actúa el/los inductor/-es adecuados (fotoperiodo, edad, revigorización, etc.).

2.5. BIBLIOGRAFÍA.

Babinger, P., Kobl, I., Mages, W. & Schmitt, R. 2001. A link between DNA methylation and epigenetic silencing in transgenic *Volvox carteri*. *Nucleic Acids Research* 29(6): 1261-1271.

Baurens, F.C., Nicolleau, J., Legrave, T., Verdeil, J.L. & Monteuis, O. 2004. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiology* 24(4): 401-407.

Bird, A.P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213.

Bitonti, M.B., Cozza, R., Chiappetta, A., Giannino, D., Castiglione, M.R., Dewitte, W., Mariotti, D., Onckelen, H.V. & Innocenti, A.M. 2002. Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Journal of Experimental Botany* 53(371): 1047-1054.

Bonga, J.M. 1980. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. En: F. Sala, B. Parisi, R. Cella, & O. Cliferri (eds.), *Plant cell cultures: results and perspectives*, 253-264. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Bonga, J.M. & von Aderkas, P. 1993. Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for propagation *in vitro*. En: M.R.Ahuja & W.J.Libby (eds.), *Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology*, 182-199. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Brandeis, M., Ariel, M. & Cedar, H. 1993. Dynamics of DNA methylation during development. *BioEssays* 15: 709-713.

Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S. & Peacock, W.J. 1993. DNA methylation, vernalization and the initiation of flowering. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 90: 287-291.

Cubas, P., Vincent, C. & Coen, E. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401:157-161.

Fieldes, M.A. & Amyot, L.M. 1999. Epigenetic control of early flowering in flax lines induced by 5-azacytidine applied to germinating seed. *The Journal of Heredity* 90(1): 199-206.

Finnegan, E.J., Genger, R.K., Kovac, K., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1998. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 5824-5829.

Finnegan, E.J., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 2000. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development* 10: 217-223.

Fraga M., Cañal, M.J., Aragonés A. & Rodríguez, R. 2002a. Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. *Annals of Forest Science* 59: 155-161.

Fraga, M.F., Cañal, M.J. & Rodríguez, R. 2002b. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* D. Don trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 139-145.

Fraga, M.F., Cañal, M.J. & Rodríguez, R. 2002c. Phase- change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta* 215: 672-678.

Fraga, M.F., Rodríguez, R. & Cañal, M.J. 2002d. Genomic DNA methylation-demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology* 22: 813-816.

Fraga, M.F., Uriol, E., Diego, L.B., Berdasco, M., Esteller, M., Cañal, M.J., & Rodríguez, R. 2002e. High performance capillary electrophoresis method for the quantification of 5- methyl- 2'- deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis* 23: 1677-1681.

Genger, R.K. & Peacock, W.J. 2003. Opposing effects of reduced DNA methylation on flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 461-466.

Greenwood, M. S., Hutchinson, K., Sherman, Ch., Rebek, J., & Singer, P.1990. The molecular genetics of maturation in eastern larch (*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch). En: R. Rodríguez, R. Sánchez Tamés, & D.J. Durzan (eds.), *Plant Aging: Basic and applied approaches*, 141-146. Plenum Press, New York.

Hackett, W.P.1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Horticultural Review* 7, 109-155.

Jacobsen, S.E. & Meyerowitz, E.M. 1997. Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science* 277: 1100-1103.

Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. & Richards, E.J. 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2 like protein. *Nature Genetics* 22: 94-97.

Jones, P.A. & Takai, D. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068-1070.

Lenhard, M. & Laux, T. 1999. Shoot meristem formation and maintenance. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 44-50.

Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase genes results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.

Martienssen, R. 1998. Transposons, DNA methylation and gene control. *Trends in Genetics* 14: 263-264.

Meehan, R.R. 2003. DNA methylation in animal development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14: 53-65.

Meyerowitz, E.M. 1997. Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* 88: 299-308.

Pierik, R.L.M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. En: H. J. J. Nijkamp, L. H. W. van der Plas, & J. van Artrijk (eds.), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, 91-101. Kluwer Acad. Publ, Dordrecht.

Razin, A. & Cegar, H. 1994. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* 77: 473-476.

Razin, A. & Riggs, A. 1980. DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604-610.

Sano, H., Kamada, I., Youssefian, S., Katsumi, M. & Wabiko, H. 1990. A single treatment of rice seedlings with 5-azacytidine induces heritable dwarfism and undermethylation of genomic DNA. *Molecular Gene & Genetics* 220: 441-447.

Santos, D. & Fevereiro, P. 2002. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 155-161.

Surani, M.A. 2001. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122-128.

Yoder, J.A., Walsh, C.P. & Bestor, T.H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics* 13: 335-340.

Zluvova, j., Janousek, B. & Vyskot, B. 2001. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany* 52(365): 2265-2273.

Capítulo III

METILACIÓN DEL ADN GENÓMICO Y DISTRIBUCIÓN DE 5-METILCITOSINA COMO INDICADORES DE DIFERENCIACIÓN Y DE ADQUISICIÓN DE COMPETENCIA REPRODUCTIVA EN *Pinus radiata* D.

Don.

3.1. INTRODUCCIÓN.

La diferenciación celular y el desarrollo vegetal dependen fundamentalmente de la regulación espacial y temporal de la expresión génica, generándose patrones específicos de expresión que han de mantenerse estables durante generaciones. A diferencia del desarrollo animal, el desarrollo vegetal se caracteriza por su elevada plasticidad, lo que confiere a las plantas alta versatilidad adaptativa. Las plantas mantienen interacciones específicas entre sus programas de desarrollo y los estímulos externos, que han de ser coordinadas mediante el dinamismo de la estructura de la cromatina. El hecho de que las células vegetales manifiesten totipotencia es la indicación de que estados de cromatina silenciados pueden ser potencialmente reactivados. Ahora bien, ¿cuáles son los mecanismos que regulan la activación y la represión de los genes?. En este sentido, está ampliamente aceptado que la estructura de la cromatina y, en consecuencia, la transcripción génica está controlada por mecanismos epigenéticos. Entre los mecanismos epigenéticos que modulan estados permisivos o represivos de la cromatina deben destacarse asociaciones específicas entre proteínas de la cromatina y modificaciones post-transcripcionales de histonas, así como metilación del ADN (Reyes et al., 2002).

La metilación del ADN constituye el fenómeno epigenético más ampliamente estudiado en plantas, ejerciendo un importante papel en, al menos, dos procesos celulares:

i) la metilación del ADN es un mecanismo que regula la expresión de genes dependiente de espacio y/o tiempo. Aunque con frecuencia se hace referencia a que la “metilación del ADN bloquea la transcripción”, esto no es más que una simplificación del mecanismo. La metilación del ADN condiciona las interacciones entre proteínas y ADN, produciendo alteraciones en la estructura de la cromatina que pueden generar tanto descensos como aumentos en las tasas de transcripción génica (Jones & Takai, 2001).

ii) la metilación del ADN en plantas constituye un mecanismo de defensa del genoma, puesto que puede facilitar el silenciamiento génico de elementos móviles (Miura et al., 2001; Okamoto & Hirochika, 2001), transgenes (Mallory et al., 2001) y control de la formación de alotetraploides (Shaked et al., 2001; Madlung et al., 2002). Se ha descrito que la metilación del ADN desempeña un papel esencial en los mecanismos de imprinting genómico en mamíferos (Surani, 2001) y, recientemente, se han encontrado evidencias del papel ejercido en el silenciamiento de una copia alélica en determinados genes de expresión tardía del endospermo (Vinkenoog et al., 2000).

Puesto que la metilación del ADN es un proceso regulador de la expresión génica, se considera un factor determinante en la imposición y mantenimiento de los patrones génicos que caracterizan las fases de desarrollo ontogénico de un individuo. La metilación del ADN es esencial para que se produzca un desarrollo normal, de modo que variaciones en los perfiles de metilación del ADN conllevan pautas de desarrollo aberrantes (Finnegan et al., 1996; Richards, 1997; Finnegan et al., 1998). Además, los niveles de metilación global del ADN varían a lo largo del desarrollo vegetal, de modo que actúa como indicador molecular de procesos relacionados con envejecimiento, revigorización y maduración tanto en angiospermas (Bitonti et al., 2002; Baurens et al., 2004) como en gimnospermas (Fraga et al., 2002a,b). Aunque se han caracterizado variaciones en los niveles genómicos de metilcitosina dependientes de desarrollo, aún se desconoce si estos cambios de metilación afectan de modo preferencial a distintos tipos celulares. En este capítulo se aborda el análisis de las variaciones en los porcentajes globales de metilación y la distribución celular de 5-metilcitosina en primordios aciculares de *P. radiata* afectados por distinto desarrollo ontogénico y revigorización.

3. 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.2.1. Material vegetal.

Se seleccionaron primordios aciculares de *Pinus radiata* D. Don tomados de ramas en distintas fases del desarrollo ontogénico, madura vegetativa (MV) y madura reproductiva (MR). Los análisis se llevaron a cabo en primordios aciculares con distinto grado de desarrollo cronológico: de 10-20 (b0) y de 30-40 (b1) días de desarrollo cuyas longitudes eran exactamente de 6 y 13 mm, respectivamente. A partir de estos primordios se obtuvieron porciones basales de 3 mm (b0b) y 6 mm (b1b) que constituyeron los materiales de estudio. Los primordios aciculares se tomaron de 10 árboles de 9 años de edad con capacidad de floración y que presentaban brotes epicórmicos. Primordios aciculares b0 y b1 localizados en brotes epicórmicos (BE) fueron empleados como sistema de revigorización.

3.2.2. Análisis histológico de los primordios aciculares.

Los materiales fueron recogidos durante el crecimiento de primavera, enero de 2004 y finales de febrero de 2004 según se tratase de primordios aciculares b0 y b1, respectivamente. El material vegetal destinado a los ensayos inmunológicos y estructurales se mantuvo a 4 °C hasta la inclusión en el fijador correspondiente, mientras que el destinado a la cuantificación de metilación se introdujo directamente en nitrógeno líquido.

La fijación se realizó en vacío mediante inmersión en paraformaldehído 4% (p/v) en PBS (Phosphate Buffer Saline) a 4 °C durante toda la noche, seguida de tres lavados, de 5 min cada uno, en PBS. Las muestras se almacenaron a 4 °C en 1% (p/v) paraformaldehído en PBS hasta el momento de su utilización.

Los cortes histológicos longitudinales (30 µm) se obtuvieron con vibratomo (Leica; Viena, Austria), se recogieron sobre portaobjetos multipocillos (ICN) recubiertos con APES (Aminopropil trietoxisilano, Sigma, St Louis, MO/USA) y se almacenaron a -20 °C hasta la realización de los ensayos inmunohistoquímicos. El

recubrimiento con APES se realizó según el protocolo de Rentrop et al. (1986), consistente en inmersión de los portaobjetos en 2% (v/v) APES en acetona durante 3 min, seguido de 2 lavados consecutivos de 2 min cada uno con acetona al 100% y 2 lavados con agua destilada de 2 min cada uno.

El estudio histológico de los primordios aciculares de *P. radiata* se llevó a cabo mediante el equipo de microscopía confocal (LEICA TCS-SP2-AOBS) bajo análisis con prismas de contraste DIC (*Differential Interference Contrast*) y detección de iluminación transmitida. Los cortes se observaron con un objetivo de 20x/0,70 (HCXPLAPO CS; distancia de trabajo 0,17 mm). Las imágenes se tomaron en un equipo de captación de imágenes (Leica LCS versión 2.5) acoplado al microscopio confocal y se procesaron mediante el empleo del software Adobe Photoshop 7.0.

3.2.3. Inmunolocalización de 5-metilcitosina.

Los ensayos de inmunofluorescencia fueron llevados a cabo según el protocolo descrito por González-Melendi & Shaw (2002). La fijación de los primordios aciculares se realizó en paraformaldehído al 4%, tal y como se describe en el Apartado 3.2.2., manteniéndose a 4 °C hasta el momento de su utilización. Los cortes histológicos de aproximadamente 30 µm, obtenidos mediante el empleo del vibratomo, fueron procesados como se detalla en el Apartado 3.2.2.

La deshidratación de las muestras se llevó a cabo en series de etanol (30°- 50°- 70°-90°; 5 min en cada graduación), seguido de posterior rehidratación (70°- 50°- 30° durante 5 min en cada etanol). Tras un lavado de 5 min en PBS, se realizó la incubación durante 1 h con el enzima celulasa 2% (w/v) en PBS. Las muestras fueron sometidas a desnaturalización mediante incubación durante 45 min con HCl 2N, transcurrida la cual se realizaron 2 lavados consecutivos en agua estéril de 3 min cada uno y un lavado de 5 min en tampón TBE (Tris-Borate-EDTA). Previamente a la incubación con el anticuerpo primario, los cortes fueron lavados 5 min en PBS y 10 min en 5% (v/v) BSA (Bovine Serum Albumine) en PBS.

Como anticuerpo primario se seleccionó un anticuerpo policlonal anti 5-metilcitosina (donado por Dr. A Niveleau) (Habib et al., 1999), empleándose para el

ensayo una dilución de 1: 50 en 5% (v/v) BSA: PBS. Tras incubar durante 1 h con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados en PBS (5 min cada uno) y se incubó con el anticuerpo secundario durante 45 min en oscuridad. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo policlonal conjugado a un fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes; Leiden, The Netherlands) diluido 1:25 en 5% (v/v) BSA: PBS. El exceso de anticuerpo secundario se retiró mediante 3 lavados de 5 min cada uno en PBS. Junto con la inmunolocalización de 5-mC se trataron las muestras con un agente químico para la localización selectiva de ácidos nucleicos en el tejido. Las muestras se incubaron con una solución DAPI (4,6 Diamidino 2- fenilindol; Serva), se lavaron 3 veces con agua destilada y, tras secar, se montaron los cubreobjetos con una solución de glicerol. Los controles negativos se obtuvieron reemplazando el anticuerpo primario por PBS.

Los resultados de las pruebas de inmunohistoquímica fueron visualizados mediante el empleo de un microscopio confocal ultraespectral (LEICA TCS-SP2-AOBS-UV) con rango de excitación ultravioleta y visible. Se trabajó con objetivos de 10x/0,40 (HCPLAPO CS; distancia de trabajo 2,2 mm), 20x/0,70 (HCXPLAPO CS; distancia de trabajo 0,17 mm); 63x/1,4-0,40 (HCXPLAPO; distancia de trabajo 0,1 mm), cubos de filtro para DAPI y Alexa 488 y prismas de contraste interferencial de Nomarsky. Mediante el equipo de captación de imágenes (Leica LCS versión 2.5) acoplado al microscopio confocal se obtuvieron imágenes que, posteriormente, fueron procesadas mediante el software Adobe Photoshop 7.0.

3.2.4. Cuantificación del grado global de metilación genómica mediante HPCE.

La extracción de ADN, su hidrólisis y la cuantificación del contenido de 5-mC mediante HPCE se llevó a cabo tal y como se describe (Capítulo 2, Apartado 2.2.2).

3.3. RESULTADOS.

3.3.1. Organización de primordios aciculares.

Tanto en primordios aciculares b1 de ramas en fases MV como de fases MR se puede distinguir (Figura 3.1):

- i)* Externamente: filas de células que constituyen los tejidos epidérmicos e hipodérmicos de la acícula, presentando las células más externas de la epidermis paredes engrosadas cutinizadas.
- ii)* En regiones subepidérmicas: células del mesófilo con citoplasmas vacuolados, núcleos desplazados hacia la periferia y abundantes plastidios.
- iii)* En el eje central del primordio acicular: células parenquimáticas más diferenciadas encargadas del desarrollo y diferenciación del sistema vascular de la acícula. Estas células observadas con el microscopio de transmisión aparecen desprovistas de vacuolas citoplasmáticas, en marcado contraste con las células parenquimáticas adyacentes ricas en todo tipo de orgánulos celulares.

Esta organización tisular se repite tanto para los segmentos apicales como para los segmentos basales, aunque la parte apical del primordio contiene mayor proporción de células meristemáticas de disposición variable.

La aparición de poros cribosos con depósitos de calosa (β 1-3 glucano) en primordios de fases MR (Figura 3.1) demuestra grados más avanzados de diferenciación del órgano. Puesto que todos los primordios analizados presentan la misma longitud, los patrones específicos de diferenciación y organización celular son consecuencia del estado de desarrollo ontogénico, vegetativo o reproductivo, de la rama de la que proceden los primordios estudiados.

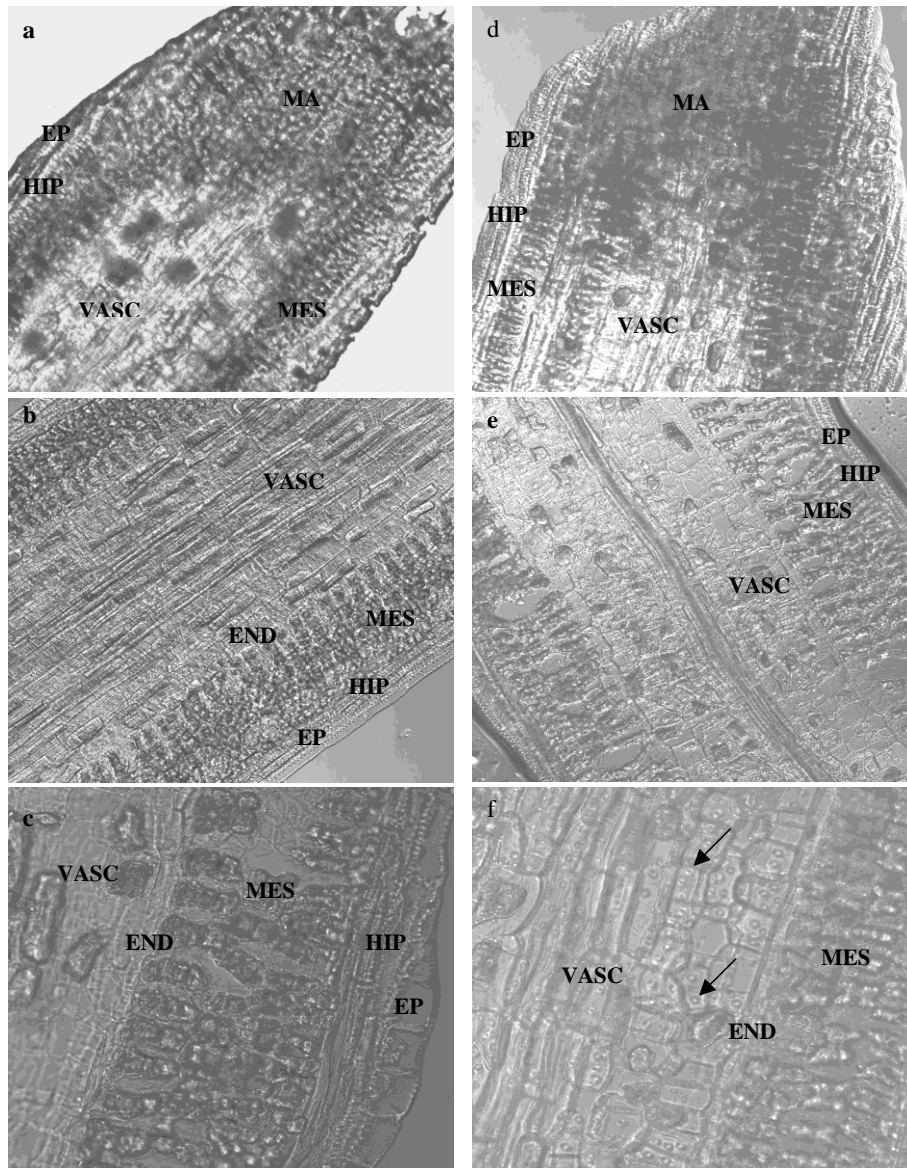


Figura 3.1. Estructura general de primordios aciculares b1 fotografiados mediante contraste DIC. Las imágenes son secciones longitudinales de primordios localizados en ramas en fases MV (a,b,c) y MR (d,e,f). Para fases vegetativas: **a**) segmento apical (20x); **b** y **c**) segmento basal (20x y 63x, respectivamente). Para fases reproductivas: **d**) segmento apical (20x); **e** y **f**) segmento basal (20x y 63x, respectivamente). END, endodermis; EP, epidermis; HIP, hipodermis; MA, meristemo apical; MES, mesófilo; VASC, sistema provascular. Las flechas negras señalan la presencia de poros cribosos.

3.3.2. Inmunolocalización de 5-mC en primordios aciculares.

La distribución de 5-mC en primordios aciculares b1 varía en función de la fase de desarrollo ontogénico de la rama de la que proceden.

Mediante inmunolocalización, se observa que los primordios aciculares b1 de fases MV presentan núcleos intensamente marcados preferentemente en regiones periféricas del primordio correspondientes a células de la epidermis e hipodermis (Figura 3.2).

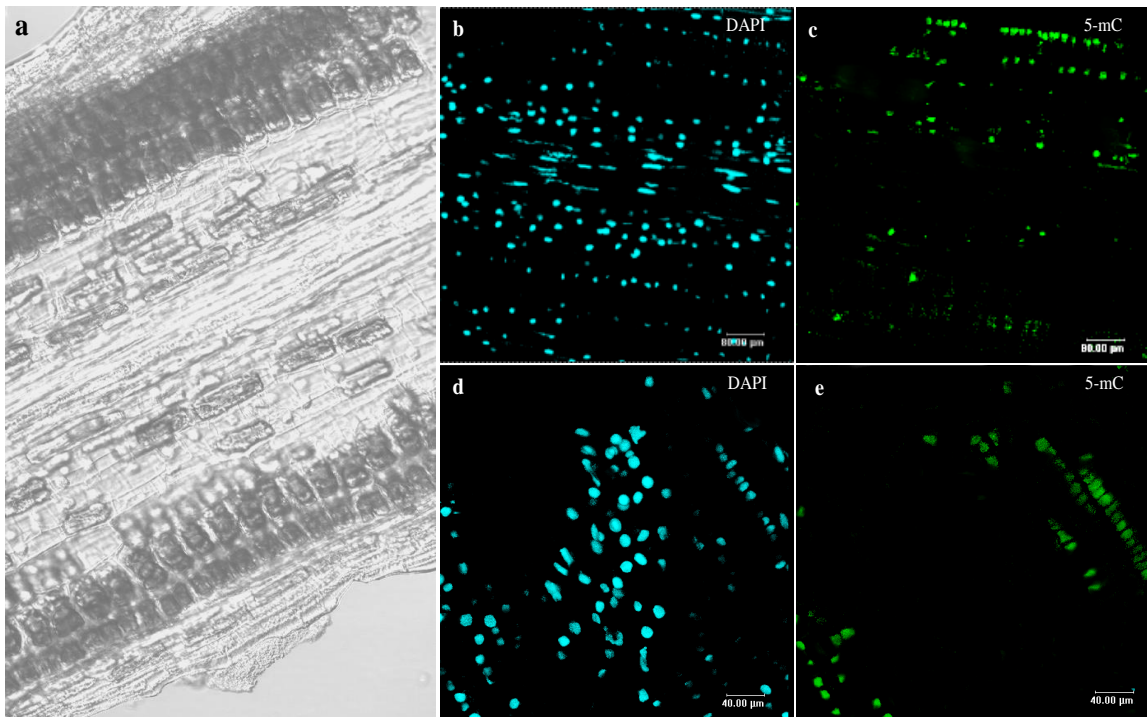


Figura 3.2. a) Estructura general de primordios aciculares b1 de ramas en fases MV (DIC, 20x). b,c) Inmunolocalización de 5-mC en segmentos basales de fascículos b1 en fases MV (20x). d,e) Detalle de la inmunolocalización de 5-mC de primordios b1 en fases MV (40x).

Sin embargo, primordios aciculares b1 de fases MR presentan señales de inmunolocalización intensas tanto en las capas dérmicas como en células pertenecientes al eje interno del primordio acicular correspondientes a células predeterminadas precursoras del sistema vascular (Figura 3.3).

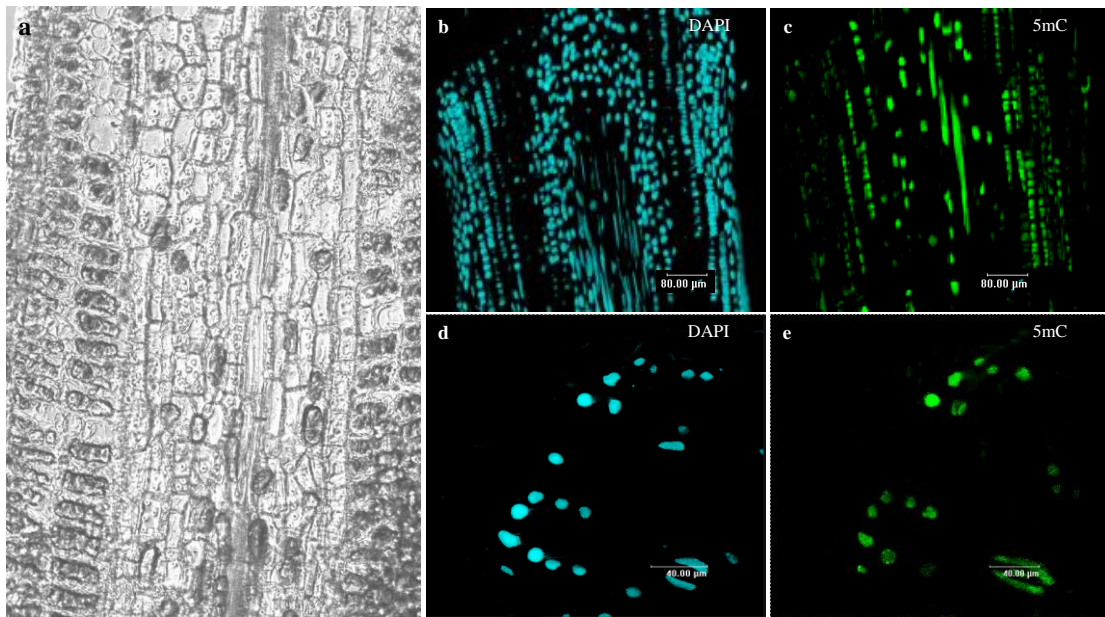


Figura 3.3. a) Estructura de primordios aciculares b1 de ramas en fases MR (DIC, 20x). b,c) Distribución histológica de 5-mC en segmentos basales de fascículos b1 en fases MR (20x). d,e) Detalle de la inmunolocalización de 5-mC de primordios b1 en fases MR (40x).

Al analizar primordios aciculares b1 de ramas revigorizadas (BE), la localización celular de 5-mC es idéntica a la observada en fases MV, con núcleos marcados en filas de células dérmicas situadas en la periferia del primordio acicular, no apareciendo en ningún caso 5-mC vinculada a las regiones centrales de los primordios aciculares b1 (Figura 3.4).

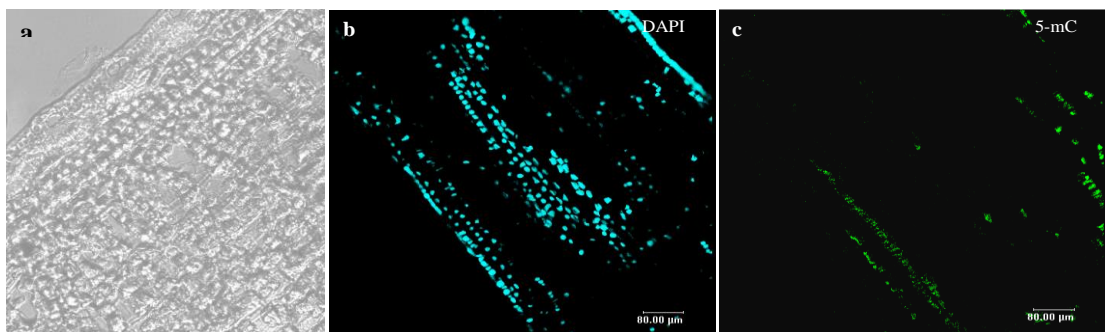


Figura 3.4. a) Estructura de primordios aciculares b1 en ramas revigorizadas (BE) (DIC, 20x). b) DAPI y c) inmunolocalización de 5-mC en porciones basales de fascículos b1 de BE (20x).

La distribución diferencial de 5-mC dependiente del estado ontogénico se pone de manifiesto independientemente de la edad cronológica del primordio acicular. Análisis en primordios b0, de menor grado de desarrollo, confirman que la evocación de la competencia floral está asociada a cambios en la distribución de 5-mC aún en fases iniciales del desarrollo del órgano. Al igual que ocurre para los primordios aciculares b1, la distribución histológica de 5-mC en primordios b0 en fases vegetativas está restringida a células dérmicas (Figura 3.5), mientras que en fases maduras reproductivas también se ven afectadas células precursoras del sistema vascular del órgano.

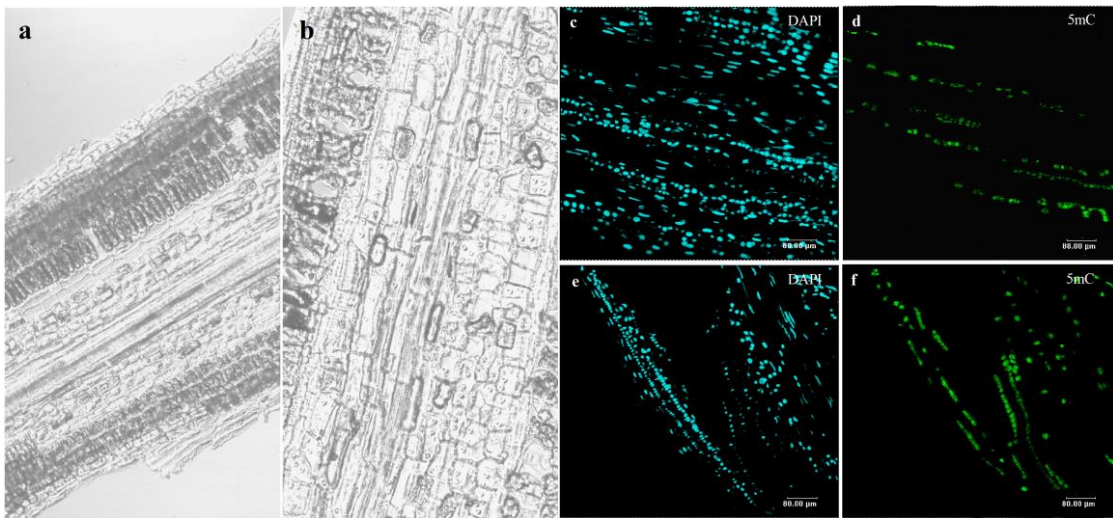


Figura 3.5. a y b) Estructura de primordios aciculares b0 de ramas en fases MV y MR, respectivamente (DIC, 20x). c,d) DAPI e inmunolocalización de 5mC en segmentos basales de fascículos b0 en MV (20x).e,f) DAPI y distribución histológica de 5mC en segmentos basales de fascículos b0 en fases MR (20x).

3.3.3. Niveles globales de metilación del ADN genómico (HPCE).

Los porcentajes relativos de metilación del ADN genómico en primordios aciculares b0 y b1 en cada una de las tres fases de desarrollo ontogénico analizadas (BE, MV y MR) cuantificados mediante HPCE se recogen en la Figura 3.6.

Dentro del mismo estado de desarrollo ontogénico, los niveles de 5-mC para primordios aciculares b0 fueron en todos los casos superiores a los detectados para primordios aciculares b1.

Independientemente del estado de desarrollo del primordio la adquisición de la competencia reproductiva implica siempre un aumento de metilación desde niveles propios del estado vegetativo, partiendo de porcentajes en torno al 30% para fases MV y alcanzando niveles del 65% en fases MR. Los niveles de metilación se revierten en estados revigorizados mediante BE hasta valores propios de fases vegetativas.

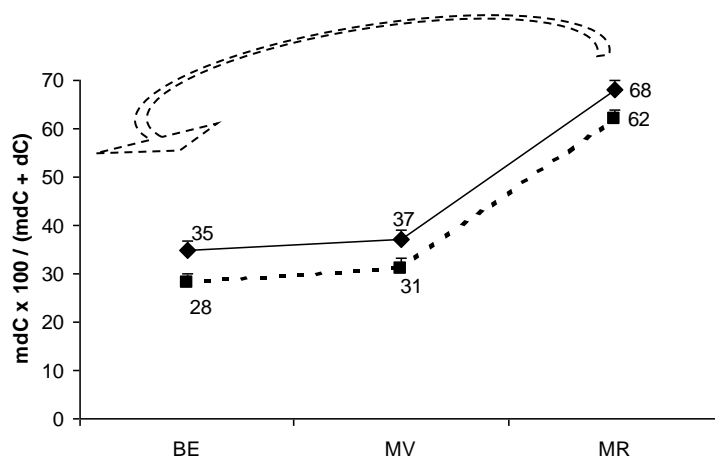


Figura 3.6. Porcentajes de metilación genómica global de segmentos basales de primordios aciculares b1 (trazado discontinuo) y primordios aciculares b0 (trazado continuo) de tejidos revigorizados (BE), ramas en fases MV y ramas en fases MR.

3.4. DISCUSIÓN.

La transición entre el desarrollo vegetativo y el desarrollo reproductivo lleva implícito cambios en los patrones de diferenciación celular y de organogénesis que están principalmente controlados mediante la expresión génica diferencial en zonas meristemáticas (Poething, 1990; Evans & Barton, 1997; Meyerowitz, 1997; Lenhard & Laux, 1999). Actualmente se conocen numerosos genes que participan en el control del cambio de fase (Martínez-Zapater et al., 1994; Weigel, 1995; Amasino, 1996; Koornneef et al., 1998; Levy & Dean, 1998), pero poco se conoce acerca de las bases moleculares de la regulación de los mismos. Aunque la metilación del ADN destaca entre los mecanismos de control génico asociados al desarrollo en *Arabidopsis* y otras especies herbáceas, en especial durante la transición floral (Burn et al., 1993; Finnegan et al., 1996; Finnegan et al., 1998; Fieldes & Amyot, 1999; Jacobsen et al., 2000; Genger & Peacock, 2003), aún continúan siendo muy escasos los datos concernientes a la regulación del cambio de fase mediada por metilación del ADN en especies forestales (Bitonti et al., 2002; Fraga et al., 2002a). Los resultados presentados en este capítulo ponen de manifiesto que la metilación del ADN desempeña un importante papel en el control del cambio de fase, tanto en términos cuantitativos como en términos de localización tisular de las metilcitosinas.

Cambios en la organización nuclear de la cromatina han sido correlacionados previamente con variaciones de 5-mC durante el cambio de fase (Bitonti et al., 2002), lo cual corrobora la hipótesis de que la metilación del ADN controla la expresión génica a través de cambios en el grado de condensación de la cromatina que, probablemente, controlen a su vez los cambios de expresión génica asociados al cambio de fase en *P. radiata*.

El aumento de 5-mC en primordios b1 con respecto a los primordios b0 parece indicar que la metilación del ADN contribuye a la diferenciación del órgano. La metilación del ADN actúa como mecanismo de silenciamiento génico en células diferenciadas, donde tan solo se produce expresión de genes implicados en el mantenimiento celular o de genes específicos de tejido (Babinger et al., 2001). En este trabajo se pone de manifiesto que la metilación del ADN, sola o en conjunción con otros factores, actúa como mecanismo a través del cual las células meristemáticas son

programadas hacia células diferenciadas del sistema vascular. Metilación del ADN adscrita a células del sistema vascular se ha descrito ya para otros estados incipientes de desarrollo del órgano, como en el caso de la germinación de semillas (Zluvova et al., 2001).

La juvenilidad de brotes epicórmicos, en términos de ganancia de competencia morfogénica, morfología foliar y niveles de poliaminas (Fraga et al., 2004), entre otros, está condicionada por variaciones en los perfiles de expresión génica en células meristemáticas. La expresión de estos genes específicos parece estar modulada, al menos en parte, por la metilación global del ADN genómico. Descensos de metilación global del ADN han sido relacionados con aumentos en las tasas de replicación de tejidos revigorizados de *Silene latifolia* (Zluvova et al., 2001), tales como brotes epicórmicos.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la metilación global del ADN genómico desempeña un papel fundamental en el control de la transición desde fases de desarrollo vegetativas hacia fases reproductivas en *P. radiata*, controlando la expresión de genes específicos de tejido (p.ej. genes implicados en la formación del sistema vascular). Además, la reversión hacia estados desdiferenciados conlleva descensos en los niveles de 5-mC, especialmente en células diferenciadas, estando la ganancia de competencia morfogénica asociada a aumentos en la composición de células meristemáticas hipometiladas.

3.5. BIBLIOGRAFÍA.

Amasino, R.M. 1996. Control of flowering time in plants. *Current Opinion in Genetics and Development* 6: 480-487.

Babinger, P., Kobl, I., Mages, W. & Schmitt, R. 2001. A link between DNA methylation and epigenetic silencing in transgenic *Volvox carteri*. *Nucleic Acids Research* 29(6): 1261-1271.

Baurens, F.C., Nicolleau, J., Legrave, T., Verdeil, J.L. & Monteuis, O. 2004. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiology* 24(4): 401-407.

Bitonti, M.B., Cozza, R., Chiappetta, A., Giannino, D., Castiglione, M.R., Dewitte, W., Mariotti, D., Onckelen, H.V. & Innocenti, A.M. 2002. Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristemos in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Journal of Experimental Botany* 53(371): 1047-1054.

Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S. & Peacock, W.J. 1993. DNA methylation, vernalization and the initiation of flowering. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 90: 287-291.

Evans, M.S. & Barton, M.K. 1997. Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 673-701.

Fieldes, M.A. & Amyot, L.M. 1999. Epigenetic control of early flowering in flax lines induced by 5-azacytidine applied to germinating seed. *The Journal of Heredity* 90(1): 199-206.

Finnegan, E.J., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93: 8449-8454.

Finnegan, E.J., Genger, R.K., Kovac, K., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1998. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 5824-5829.

Fraga, M.F., Cañal, M.J. & Rodríguez, R. 2002a. Phase- change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta* 215: 672-678.

Fraga, M.F., Rodríguez, R. & Cañal, M.J. 2002b. Genomic DNA methylation-demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology* 22: 813-816.

Fraga M.F., Berdasco, M., Diego, L.B., Rodríguez, R. & Cañal, M.J. 2004. Changes of polyamine content associated with *Pinus radiata* D. Don and *Prunus persica* [L.]Bascth "Hakuho" ageing. *Tree Physiology* 24(11): 1121-1126.

Genger, R.K. & Peacock, W.J. 2003. Opposing effects of reduced DNA methylation on flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 461-466.

González-Melendi, P. & Shaw, P. 2002. 3D gold *in situ* labelling in the EM. *Plant Journal* 29(2): 237-243.

Habib, M., Fares, F., Bourgeois, C.A, Bella, C., Bernardino, J., Plazquez-Hernandez, F., de Capoa, A. & Niveleau, A. 1999. DNA global hypomethylation in EBV-transformed interphase nuclei. *Experimental Cell Research* 249: 46-53.

Jacobsen, S.E., Sakai, H., Finnegan, E.J., Cao, X. & Meyerowitz, E.M. 2000. Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Current Biology* 10: 179-186.

Jones, P.A. & Takai, D. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068-1070.

Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M. & Soppe, W. 1998. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Genetics* 148: 885-892.

Lenhard, M. & Laux, T. 1999. Shoot meristem formation and maintenance. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 44-50.

Levy, Y.Y. & Dean, C. 1998. The transition to flowering. *The Plant Cell* 10: 1973-1990.

Madlung, A., Masuelli, R.W., Watson, B., Reynolds, S.H., Davison, J. & Comai, L. 2002. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiology* 129: 733-746.

Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V.B. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation of the mobile signal. *Plant Cell* 13: 571-583.

Martínez-Zapater, J.M., Coupland, G., Dean, C. & Koornneef, M. 1994. The transition to flowering in *Arabidopsis*. En: *Arabidopsis*, Meyerowitz, E.M. & Somerville, C.R. (Eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 403-433.

Meyerowitz, E.M. 1997. Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* 88: 299-308.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. & Kakutani, T. 2001. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* 411: 212-214.

Okamoto, H. & Hirochika, H. 2001. Silencing of transposable elements in plants. *Trends in Plant Science* 6(11): 527-534.

Poethig, R.S. 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250: 923-930.

Rentrop, M., Knap, B., Winter, H. & Schweizer, J. 1986. Aminoalkylsilene treated slides as supports for in situ hybridization of keratin cDNAs for frozen tissue sections underlying fixation and pretreatment conditions. *Histochemical Journal* 18: 271-276.

Reyes, J.C., Henning, L., Grissem, W. 2002. Chromatin-remodeling and memory factors. New regulators of plant development. *Plant Physiology* 130: 1090-1101.

Richards, E.J. 1997. DNA methylation and plant development. *Trends in Genetics* 13: 319-323.

Shaked, R., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M. & Levy, A.A. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* 13: 1749-1759.

Surani, M.A. 2001. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122-128.

Vinkenoog, R., Spielman, M., Adams, S., Fischer, R.L., Dickinson, H.G. & Scott, R.J. 2000. Hypomethylation promotes autonomous endosperm development and rescues postfertilization lethality in *fie* mutants. *Plant Cell* 12: 2271-2282.

Weigel, D. 1995. The genetics of flower development: from floral induction to ovule development. *Annual Review of Genetics* 29: 19-39.

Zluvova, J., Janousek, B. & Vyskot, B. 2001. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany* 52(365): 2265-2273.

Capítulo IV

HIPERACETILACIÓN/HIPOACETILACIÓN DE HISTONA H4 ASOCIADA A LA COMPETENCIA VEGETATIVA/REPRODUCTIVA EN *Pinus radiata* D. Don.

4.1. INTRODUCCIÓN.

Al igual que ocurre en el ciclo vital de otros organismos eucariotas superiores, la transición en plantas desde fases juveniles hasta fases adultas conlleva una serie de cambios fisiológicos y anatómicos. La adquisición de la competencia reproductiva es una etapa clave en el proceso de maduración de especies forestales, ya que desencadena una serie de respuestas asociadas tales como cambios en las tasas de crecimiento, en la eficacia fotosintética y, en general, una disminución de la competencia morfogénica. En este sentido, el desarrollo de nuevas estrategias destinadas al aumento de producción industrial de planta seleccionada está muy condicionado a la comprensión de los mecanismos moleculares y fisiológicos que determinan las fases de desarrollo ontogénico del árbol. El entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica durante los procesos de maduración y reproducción vegetal continúa en fases iniciales de estudio. En la mayor parte de los casos se desconoce cuál o cuáles son los genes responsables de las respuestas de desarrollo y aún más cuáles son los mecanismos de activación/represión de dichos genes.

Entre los mecanismos implicados en el control del crecimiento y de las fases de desarrollo en eucariotas debe destacarse el papel que desempeñan los factores epigenéticos. La metilación del ADN constituye el factor epigenético mejor caracterizado durante el desarrollo animal (Bird, 2002) y vegetal (Finnegan et al., 1998), pero debe destacarse que forma parte de una compleja maquinaria molecular que, en colaboración con modificaciones de histonas y otras proteínas cromosómicas,

constituyen un código específico (“código epigenético”) que controla la estructura de la cromatina (Strahl & Allis, 2000; Turner, 2000; Spotswood & Turner, 2002; Turner, 2002; Loidl, 2004). La acetilación de histonas, especialmente la acetilación de histona H4, se encuentra entre las modificaciones de proteínas de la cromatina mejor caracterizada en animales (Turner, 1998). Se han descrito numerosos efectos ejercidos por la acetilación de histonas sobre la formación y el mantenimiento de la cromatina (Turner, 2000; Noma et al., 2001; Suka et al., 2001; Eberharter & Becker, 2002; Richards & Elgin, 2002), regulación de la expresión génica (Wong et al., 1998; Chen et al., 2001; Klochbin et al., 2001; Roth et al., 2001) y control de otros procesos biológicos, tales como reparación del ADN, segregación cromosómica o replicación del ADN (Eberharter & Becker, 2002). La acetilación de histona H4 es esencial para que se produzcan pautas normales de desarrollo, habiéndose descrito asociaciones entre patrones aberrantes de acetilación y estados cancerígenos en humanos (Fraga et al., 2005).

En el caso de plantas, la acetilación de histona H4 y su implicación en los procesos de replicación del ADN y transcripción génica han sido estudiadas en diversas especies agronómicas (Jasencaková et al., 2000). En lo que se refiere al control de la transición desde fases vegetativas a fases reproductivas se han descrito variaciones en determinados factores responsables de la modulación de la estructura y de la conformación de la cromatina (Kinoshita et al., 2001; Wagner, 2003), pero poco se conoce acerca del papel desempeñado por la acetilación de histonas en el cambio de fase.

Variaciones en el grado de metilación del ADN genómico dependientes de cambio de fase, en concreto aumentos en los niveles de 5-mC en fases reproductivas, han sido descritos por nuestro grupo de investigación (Fraga et al., 2002), aspecto que se validó en la presente memoria (Capítulo 2, Capítulo 3) mediante el estudio de nuevos materiales y aplicación de nuevas tecnologías. Puesto que se postula una estrecha correlación entre metilación del ADN y acetilación de histonas en el control de la expresión génica (Dobosy & Selker, 2001; Li et al., 2002; Lusser, 2002), en este capítulo se analizan los niveles de histona H4 tetraacetilada (AcH4) en fases vegetativas y en fases reproductivas de *P. radiata*. Ya que no existen referencias anteriores que asocien patrones de AcH4 con fases específicas de desarrollo en especies forestales, el trabajo resulta pionero en la determinación de variaciones de AcH4 durante el cambio

de fase. En el trabajo se discuten las implicaciones que los niveles de AcH4 ejercen en el cambio de fase a través del control de la estructura de la cromatina y de la expresión génica, así como las interacciones con la metilación global del ADN genómico.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.2.1. Material vegetal.

Las muestras analizadas son porciones apicales (7 mm) y basales (6 mm) de primordios aciculares de 1 mes de edad (b1a y b1b, respectivamente). Todos los primordios aciculares analizados fueron escindidos de unidades de crecimiento anual de 10 pinos de 9 años de edad. Se seleccionaron primordios aciculares b1 localizados sobre ramas con distinto grado de desarrollo ontogénico, correspondientes a las fases de desarrollo madura vegetativa (MV), sin capacidad de floración, y madura reproductiva (MR) con desarrollo floral.

Los materiales se recogieron a principio de febrero de 2004 durante el inicio del crecimiento del año. Tras su recolección en campo el material vegetal destinado a estudios estructurales y a análisis inmunohistoquímicos, se mantuvo a 4 °C hasta inclusión en el correspondiente agente fijador. El material vegetal destinado a la extracción de proteínas y análisis *Western blotting*, se introdujo inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -70 °C hasta el momento de su utilización.

4.2.2. Análisis histológico de los primordios aciculares b1.

La estructura de los primordios b1 fue analizada mediante observación de secciones longitudinales de aproximadamente 30 µm en contraste DIC (*Differential Interference Contrast*), tal y como se describe en el Capítulo 3 (Apartado 3.2.2).

4.2.3. Inmunolocalización de histona H4 acetilada.

La fijación del material vegetal, así como la obtención de cortes histológicos para las pruebas de inmunolocalización se realizó como se describe para los estudios estructurales realizados en los mismos primordios aciculares (Apartado 4.2.2).

Los cortes histológicos fueron sometidos a deshidratación en series de etanol (30°- 50°- 70°-90°; 5 min en cada graduación de etanol) y posterior rehidratación (serie

de 70°- 50°- 30°; 5 min en cada etapa). Tras un lavado de 5 min en PBS, se realizó la incubación durante 1 h con el enzima celulasa 2% (p/v) en PBS. Previamente a la incubación con el anticuerpo primario, los cortes fueron lavados 5 min en PBS y 10 min en 5% (v/v) BSA (Bovine Serum Albumine) en PBS. Como anticuerpo primario se seleccionó un anticuerpo policlonal anti-histona H4 acetilada (Chemicon International; Single Oak Drive, Temecula, CA) que reconoce puntos de acetilación en los 4 residuos Lys (K5, K8, K12 y K16) de la histona H4 susceptibles a la adición de grupos acetilo. El resto del protocolo de inmunolocalización, así como la visualización y procesamiento de las imágenes, se describe en el Capítulo 3 (Apartado 4.2.2).

Además de los datos obtenidos mediante la imagen de microscopia confocal y, puesto que el número de núcleos en cada imagen no era excesivo, se dividió cada imagen en múltiples campos y se elaboró un índice relativo de acetilación global de histona H4 (IA).

IA (%)= (número de núcleos marcados con anti-histona H4 acetilada / número total de núcleos marcados con DAPI) x 100.

4.2.4. Western blotting.

4.2.4.1. Extracción proteica.

Primordios aciculares b1 completos (500 mg) fueron homogenizados en nitrógeno líquido en un mortero con 3 ml de tampón homogenizador 5x (100 mM tampón Tris pH 8.0, 10% (p/v) dodecil sulfato sódico (SDS), 5% (v/v) β -mercaptoetanol, 1mM Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMF; Sigma). El homogenizado se hirvió a 100 °C durante 10 min, se dejó enfriar durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 g durante 15 min. El sobrenadante, que constituyó el extracto crudo de proteínas totales presentes en el tejido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Se midió la concentración de proteína total en el extracto según Bradford (1976) usando BSA como estándar. En la mayor parte de las muestras fue necesario concentrar los extractos proteicos mediante precipitación con acetona (1:4 (v/v), muestra: acetona)

durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 15000 g durante 30 min y se resuspendió el pellet en tampón homogenizador en un volumen 4 veces menor al volumen de partida.

4.2.4.2. Separación proteica mediante electroforesis.

La separación proteica se realizó mediante electroforesis vertical en geles con gradiente de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en una cubeta para mini-geles (Mini-PROTEAN II Multi-Casting Chamber; BIO-RAD), empleándose un gel de separación del 15% de poliacrilamida (p/v) y un gel de concentración del 6% de poliacrilamida (p/v).

A cada muestra, que contenía 30 µg de extracto crudo proteico, se le añadió tampón de carga 5x (0.15% de azul de bromofenol, 50% glicerol, 35% agua destilada estéril) (v/v), se hirvió a 100 °C durante 10 min y se centrifugó a 10000 g durante 15 min. Las muestras se corrieron bajo un voltaje de 60 V a lo largo del gel de concentración y de 80 V en el gel de separación durante aproximadamente 1 h 30 min. Como controles se emplearon patrones de bajo peso molecular (Low Range, BIO-RAD).

4.2.4.3. Transferencia proteica a membrana de nylon.

La transferencia, realizada en membranas ImmobilonTM-P (Millipore Corporation; Bedford, MA) de tamaño de poro 0.45 µm, se llevó a cabo en cubeta de transferencia (Mini Trans-Blot Transfer Cell, BIO-RAD) que contenía tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina; 20% (v/v) metanol) a 100 V durante 1 h 30 min. La membrana con las proteínas transferidas se mantuvo en tampón de bloqueo (2% leche desnatada en polvo (p/v), 0.05% Tween 20 (v/v) en PBS) a 4 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se secó la membrana a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su utilización. Para comprobar si la transferencia se había desarrollado correctamente, se introdujo una tira de la membrana en una

solución de amidoblack durante 3 min, seguido de 2 lavados en solución de desteñido (45% metanol, 7% ácido acético glacial, 48% agua destilada) (v/v).

4.2.4.4. Inmunodetección de histona H4 acetilada.

La membrana proteica se incubó en agitación orbital con el anticuerpo primario policlonal anti-histona H4 acetilada (Chemicon International; Single Oak Drive, Temecula, CA) durante 1 h 30 min en una dilución 1/1000 en tampón de bloqueo. Tras 3 lavados consecutivos de 10 min cada uno en tampón de lavado (0.2% leche desnatada en polvo, 0.5% Tween 20 en PBS) (v/v), la membrana se incubó con su respectivo anticuerpo secundario (IgG de conejo) conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim; Mannheim, Germany) en una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo durante 1 h. Finalmente, las proteínas reconocidas por el anticuerpo fueron reveladas mediante exposición con una mezcla compuesta por 1% (v/v) azul de nitrotetrazolio (NBT, Sigma), 0.1% (v/v) bromocloroindolil fosfato (Bcip, Sigma) y 98,9% (v/v) tampón de revelado (0.1 M NaHCO₃; 18.5 mM NaCO₃; 3.9 mM MgCl₂. 6H₂O).

Las membranas resultado de las pruebas de inmunoblot fueron escaneadas, midiéndose la intensidad de las bandas obtenidas tras la inmunodetección mediante el empleo del software Labmage v2.62a (© 1999-2003 Kapelan GmbH). Los valores de intensidad generados se obtuvieron tomando como valor de referencia, igual a 1, la banda que presentaba mayor intensidad. Se realizaron análisis de tubulina como control de proteína de expresión constitutiva en ambos estados de desarrollo ontogénico estudiados.

4.3. RESULTADOS.

4.3.1. Inmunolocalización de histona H4 acetilada en fases vegetativas y reproductivas.

Se pone de manifiesto que los estados vegetativos y reproductivos establecen diferencias en la frecuencia de núcleos marcados con AcH4 en primordios aciculares b1.

Los niveles de AcH4 en núcleos de porciones apicales fueron siempre superiores a los de porciones basales (Figura 4.1). Primordios de ramas en fases MV presentan mayor número de núcleos marcados con AcH4 que los correspondientes a fases MR, tanto en porciones apicales como basales (Figura 4.1). En porciones apicales de fases MV se alcanzan niveles de AcH4 del 60%, mientras que en regiones basales la presencia de núcleos con AcH4 se estimó en un porcentaje cercano al 50% (Figura 4.2). En porciones apicales de fases MR se midieron niveles de AcH4 del 48% frente al 8% de regiones basales (Figura 4.3).

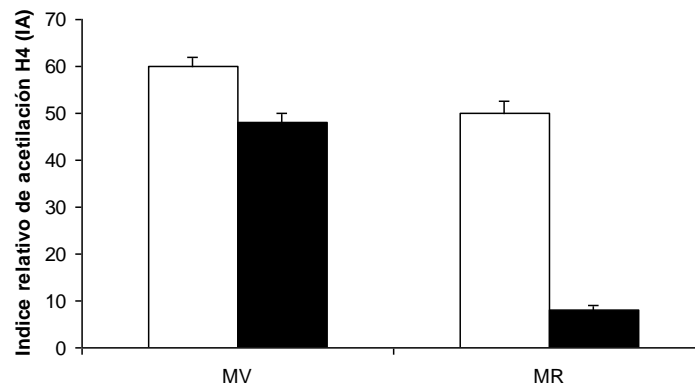


Figura 4.1. Índices relativos de acetilación para porciones apicales (barras blancas) y porciones basales (barras negras) de primordios aciculares b1 de ramas en fases MV y MR.

* Índice relativo de acetilación H4 (%): (nº de núcleos marcados con histona H4 acetilada / nº total de núcleos presentes en el tejido) x 100.

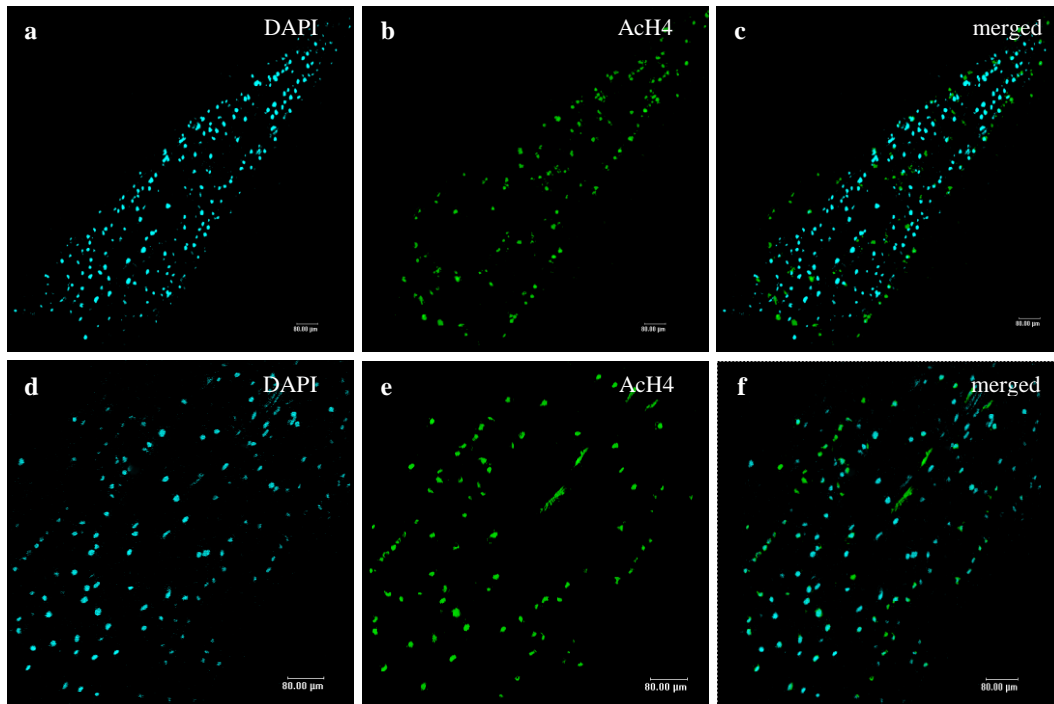


Figura 4.2. Inmunolocalización de histona H4 acetilada en fascículos aciculares b1 localizados en ramas en fases MV. **a,b,c)** segmentos apicales; **d,e,f)** segmentos basales.

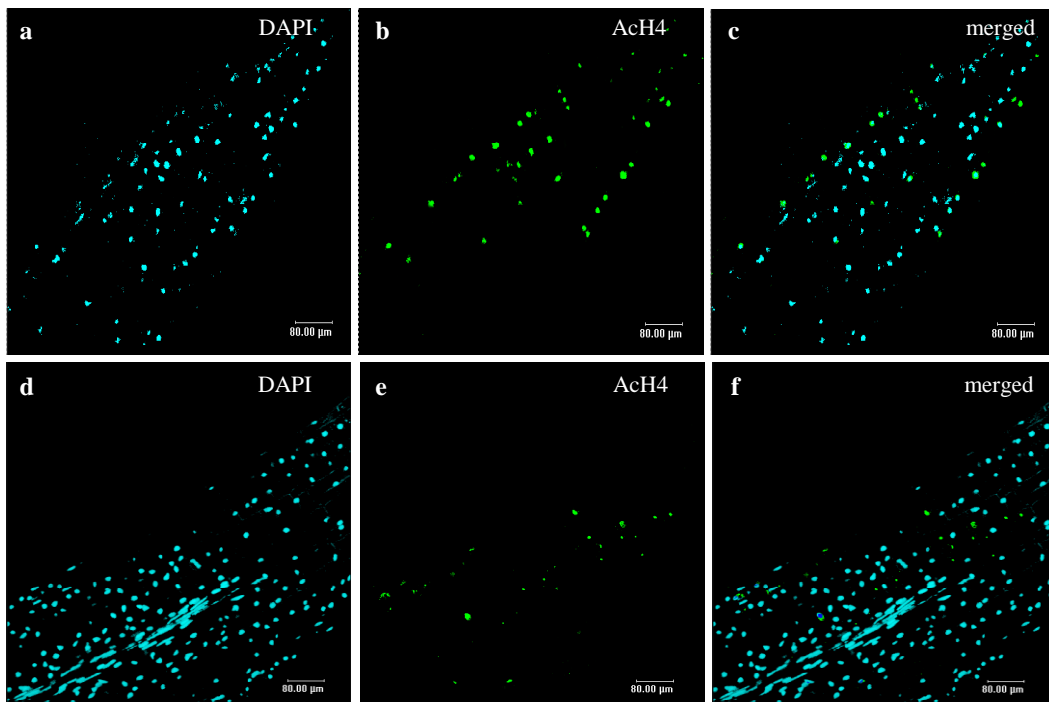


Figura 4.3. Inmunolocalización de histona H4 acetilada en fascículos aciculares b1 localizados en ramas en fases MR. **a,b,c)** segmentos apicales; **d,e,f)** segmentos basales.

4.3.2. Inmunodetección de histona H4 acetilada mediante *Western blotting* en fases vegetativas y fases reproductivas.

Los resultados del *Western blotting* confirman la especificidad del anticuerpo empleado, obteniéndose una banda única (p.m. 18.5) (Figura 4.4). La menor presencia de AcH4 detectada en primordios de fases MR fue confirmada mediante *Western blotting*. La densitometría de las bandas obtenidas reveló valores de intensidad dos veces superiores en fases MV que en MR (Figura 4.4).

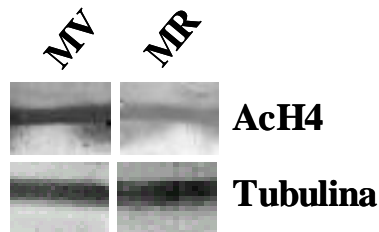


Figura 4.4. Análisis *Western blotting* de AcH4 en primordios aciculares b1 localizados en ramas en fases MV y MR. Los valores de intensidad generados se obtuvieron tomando como valor de referencia, igual a 1, la banda que presentaba mayor intensidad. Se realizaron análisis de tubulina como control de proteína de expresión constitutiva en ambos estados de desarrollo ontogénico estudiados.

4.4. DISCUSIÓN.

A pesar del papel fundamental que desempeñan las modificaciones en extremos N-terminales de las histonas, tales como acetilación, se sabe muy poco sobre su implicación en procesos de envejecimiento y maduración en plantas. En la literatura (Ogas et al., 1999; Kinoshita et al., 2001; Yoshida et al., 2001; Wagner, 2003) aparecen indicaciones sobre el papel que determinadas subfamilias de factores reguladores de la cromatina ejercen sobre el control de la transición en las fases de desarrollo en plantas. Entre estos factores se incluyen complejos multiproteicos con actividades deacetilasas, proteínas del grupo Polycomb, así como factores implicados en el silenciamiento y formación de heterocromatina. Por otra parte en *Arabidopsis* se sabe que los estados embriogénicos están controlados epigenéticamente mediante la expresión de PICKLE (PKL), una subunidad ATPasa de un complejo multiproteico HDACs (Ogas et al., 1999).

En *Arabidopsis* se demuestra que la acetilación de histonas desempeña un papel fundamental en el establecimiento de las fases de desarrollo, conclusiones que apoyan las variaciones de AcH4 en función de la capacidad reproductiva presentadas en este Capítulo. Puesto que las fases de desarrollo en *P. radiata* están caracterizadas por niveles específicos de AcH4, siendo estos niveles muy superiores en fase vegetativa que en fase reproductiva, podemos concluir que la acetilación de histona H4 desempeña un papel esencial en los procesos de diferenciación que conllevan a la adquisición de la competencia floral. Además, puesto que está ampliamente aceptado que la mayor parte del genoma de los organismos eucariotas consiste en cromatina inactiva hipoacetilada (Eberharter & Becker, 2002), parece lógico que los primordios MR, más diferenciados, contengan menor presencia de AcH4 que primordios procedentes de fases MV. Al igual que ocurre en cualquier fase del desarrollo vegetal, los patrones de expresión génica requeridos para la evocación floral están controlados por mecanismos que confieren mayor o menor accesibilidad de la maquinaria de transcripción a la cromatina. Se sabe que la diferenciación hacia órganos florales depende de la represión de genes homeóticos mediante la limitación espacial de sus patrones de expresión (Miki et al., 2002). Los resultados obtenidos en el cambio de fase de *P. radiata* sugieren que la acetilación de histona H4 se incluye entre los mecanismos que controlan la expresión génica de modo diferencial según se trate de fases vegetativas o reproductivas.

Debe considerarse que la acetilación de histonas es un mecanismo a través del cual se controla la represión génica y el silenciamiento de la cromatina, pero en conjunción con otros factores relacionados con la cromatina (Lusser, 2002). En este sentido, se ha descrito que en el control del cambio de fase en *Arabidopsis* se encuentran implicadas proteínas PcG (Kinoshita et al., 2001; Lohe & Chaudhury, 2002), proteínas que alteran la conformación/posición del nucleosoma (Wagner & Meyerowitz, 2002) y proteínas relacionadas con la formación de heterocromatina (Gaudin et al., 2001). La conformación de la cromatina se ve afectada también por la acción de mecanismos epigenéticos (Li et al., 2002), estando las variaciones en la metilación del ADN frecuentemente relacionadas con el control de las fases de desarrollo en plantas (Finnegan et al., 1996).

Desde hace varios años se conoce que tanto la metilación del ADN como la hipoacetilación de histonas contribuyen al silenciamiento génico (Tazi & Bird, 1990) y que ambos procesos están conectados a través de determinadas rutas moleculares (Chen & Pikaard, 1997; Dobosy & Selker, 2001; Lusser, 2002; Loidl, 2004). La estrecha correlación entre metilación del ADN e hipoacetilación de histonas ha sido validada en nuestro sistema experimental, puesto que los descensos en los niveles de AcH4 cuantificados en fases reproductivas se corresponden con aumentos en los niveles de metilcitosina genómica cuantificados previamente para esos mismos tejidos (Fraga et al., 2002). Los principales eventos del desarrollo en plantas, incluyendo la adquisición de la capacidad reproductiva, se producen mediante cambios en la estructura de la cromatina (Li et al., 2002) y, consecuentemente, mediante la imposición de perfiles de expresión génica específicos.

Fruto de los resultados expuestos puede concluirse que la pérdida de acetilación de histona H4, así como la ganancia de metilación del ADN genómico en tejidos en fase reproductiva con respecto a la fase vegetativa son mecanismos que cooperan en la activación/represión de genes responsables de la capacidad reproductiva en *P. radiata*.

4.5. BIBLIOGRAFÍA.

Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16(1): 6-21.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248-254.

Chen, Z.J. & Pikaard, C.S. 1997. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes & Development* 11: 2124-2136.

Chen, H., Tini, M. & Evans, R.M. 2001. HATs on and beyond chromatin. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 218-224.

Dobosy, J.R. & Selker, E.U. 2001. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 721- 727.

Eberharter, A. & Becker, P.B. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Reports* 3(31): 224- 229.

Finnegan, E.J., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93: 8449-8454.

Finnegan, E.J., Genger, R.K., Kovac, K., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1998. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 5824-5829.

Fraga, M.F., Cañal, M.J. & Rodríguez, R. 2002. Phase- change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta* 215: 672-678.

Fraga, M.F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Roperro, K. Petrie, N.G. Iyer, A. Pérez-Rosado, E. Calvo, J.A. Lopez, A. Cano, M.J. Calasanz, D. Colomer, M.A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein and M. Esteller. 2005. Loss of acetylated lysine 16 and trimethylated lysine 20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics* 37(4): 391-400.

Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D. & Grandjean, O. 2001. Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development* 128(23): 4847-4858.

Jasencaková, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B.M. & Schubert, I. 2000. Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *The Plant Cell* 12: 2087- 2100.

Kinoshita, T., Harada, J.J., Goldberg, R.B. & Fischer, R.L. 2001. Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98: 14156-14161.

Klochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. & Seigneurin-Berny, D. 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Current Opinion in Gene Development* 11: 162-166.

Li, G., Hall, T.C. & Holmes-Davis, R. 2002. Plant chromatin: development and gene control. *BioEssays* 24: 234-243.

Lohe, A.R. & Chaudhury, A. 2002. Genetic and epigenetic processes in seed development. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 19-25.

Loidl, P. 2004. A plant dialect of the histone language. *Trends in Plant Science* 9(2): 84-90.

Lusser, A. 2002. Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 437-443.

Miki, B., Brown, D., Tian, L., Malik, K. & Wu, K. 2002. The role of histone deacetylases in flowering. *Flowering Newsletter* 33: 3-6.

Noma, K., Allis, C.D. & Grewald, S.I. 2001. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 293: 1150-1155.

Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J. & Somerville, C. 1999. PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryogenic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 13839-13844.

Richards, E.J. & Elgin, S.C.R. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 106: 489-500.

Roth, S.Y., Denu, J.M. & Allis, C.D. 2001. Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 70: 81-120.

Spotswood, H.T. & Turner, B.M. 2002. An increasing complex code. *Journal of Clinical Investigation* 110: 577-582.

Strahl, B.D. & Allis, D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.

Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J. & Grunstein, M. 2001. Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Molecular Cell* 8: 473-479.

Tazi, J. & Bird, A. 1990. Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60: 909-920.

Turner, B.M. 1998. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence.. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 21-31.

Turner, B.M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* 22: 836-845.

Turner, B.M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-291.

Wagner, D. & Meyerowitz, E.M. 2002. SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Current Biology* 12: 85-94.

Wagner, D. 2003. Chromatin regulation of plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 20-28.

Wong, J., Patterton, D. Imhof, A., Shi, Y.D. & Wolffe, A.P. 1998. Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *EMBO Journal* 17: 520-534.

Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z.R. & Takahashi, S. 2001. EMBRYONIC FLOWER2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 2471-2481.

Capítulo V

¿SON LOS NIVELES DE HISTONA H4 ACETILADA INDICADORES DE FASE DE DESARROLLO?. VALIDACIÓN DE LA PROPUESTA EN INDIVIDUOS ADULTOS REVIGORIZADOS Y EN ÓRGANOS CON GRADO DE DIFERENCIACIÓN VARIABLE DE *Pinus radiata* D. Don.

5.1. INTRODUCCIÓN.

La adquisición de la capacidad reproductiva implica multitud de cambios; desde la perspectiva aplicada, además de la floración, la pérdida de competencia morfogénica es, quizás, el cambio de mayor trascendencia. En términos de propagación se han desarrollado técnicas que permiten “rejuvenecer” el material adulto, para que posteriormente pueda ser propagado con mayor facilidad (Ballester, 1995). En consecuencia, en ciertas especies, es posible revertir, al menos parcialmente, el estado de desarrollo de órganos de individuos adultos de interés, de modo que readquieran las competencias propias de los árboles juveniles y que permitan el enraizamiento y, en general, la multiplicación. Sin embargo, no todos los materiales son susceptibles de ser revigorizados de forma tan efectiva y, por supuesto, distintos genotipos, e incluso materiales procedentes del mismo árbol, no son susceptibles de experimentar la revigorización de forma eficaz (Hackett & Murria, 1993). Por ello, en un momento dado nos enfrentamos a la manipulación de materiales heterogéneos con diferentes grados de competencia morfogénica, lo cual implica en términos industriales pérdidas económicas, consecuencia de intentar propagar materiales que aún no han recuperado la competencia necesaria para ello.

La ganancia de competencia morfogénica inducida por revigorización en especies leñosas ha de implicar cambios en la expresión específica de genes, desde situaciones de expresión dependientes de fase adulta. Por tanto, puesto que la

revigorización implica reversión hacia estados menos maduros, en ocasiones juveniles, deben existir mecanismos de regulación que permitan la expresión génica de modo estable pero no estático y que podrían revertirse y determinar la pérdida/recuperación de competencia morfogénica. Como ya se ha demostrado con anterioridad (Fraga et al., 2002a,b,c), la metilación del ADN pertenece a uno de estos mecanismos de regulación reversible que actúa como marcador de estado de desarrollo, especialmente del cambio de fase y de revigorización en *P. radiata*.

Puesto que la adquisición de la capacidad reproductiva en *P. radiata* parece asociada a niveles específicos de AcH4 (Capítulo 4), en el presente Capítulo se pretende validar si la revigorización del material vegetal, mediante el empleo de cepas madre sometidas a poda intensiva, lleva implícito reversión hacia estados juveniles de los niveles de AcH4 definidos para individuos adultos.

Por otro lado, se ha visto que los niveles de metilación del ADN no sólo dependen del estado de desarrollo y revigorización, sino que el grado de diferenciación del órgano influye en los niveles de 5-mC globales (Capítulo 2). En consecuencia, en este trabajo se procede a la determinación de los estados AcH4 no solo en individuos sino también en órganos con diferenciación variable, comprendiendo el cambio de fase y estados revigorizados. Los resultados obtenidos permitirán establecer conclusiones sobre el papel de la acetilación de histona H4 en los procesos de maduración y revigorización. Análisis de la actividad de proliferación de dichos tejidos, estimados a través del análisis de la localización de ciclina B1 (Harrar et al., 2003; Himanen et al., 2003), permitirán relacionar los niveles de acetilación de H4 con la capacidad morfogénica, en términos de proliferación de los materiales estudiados.

5. 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.2.1. Material vegetal.

Las muestras objeto de análisis proceden de 10 árboles de *P. radiata* de 9 años de edad con capacidad de floración y presencia de brotes epicórmicos. En todos los casos se seleccionaron primordios aciculares en dos estados de desarrollo, b0 y b1. Los primordios aciculares b0, de 6 mm de longitud, se dividieron en porciones basales (b0b) y apicales (b0a) de 3mm cada una, mientras que los primordios aciculares b1 (13 mm) fueron escindidos en porciones apicales (b1a) y basales (b1b) de 7 y 6 mm, respectivamente.

Los primordios aciculares analizados fueron recogidos al inicio del crecimiento anual, enero-febrero de 2004. Tras su recolección en campo, el material vegetal destinado a análisis inmunohistoquímicos se conservó a 4 °C hasta su inclusión en fijador. El material vegetal destinado al análisis *Western blotting* se introdujo inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -70 °C hasta su utilización.

La validación de los niveles de Ach4 como indicadores de desarrollo se realizó en las siguientes situaciones:

- *Efecto del desarrollo cronológico.* Se utilizaron primordios aciculares de 10-20 días de desarrollo (b0), tanto de ramas con crecimiento vegetativo (MV) como de ramas con competencia floral (MR).
- *Efecto de la revigorización.* Se seleccionaron primordios aciculares localizados en brotes epicórmicos de 10-20 días de desarrollo (b0), así como de 1 mes de edad (b1).

5.2.2. Organización de primordios aciculares.

El análisis histológico de primordios aciculares b0 se realizó mediante tres técnicas: *i*) la estructura general se estudió mediante inclusión en Epon y contraste DIC (Contraste Diferencial de Interferencia); *ii*) la localización de ácidos nucleicos y de

almidón se realizó mediante tinción DAPI y tinción IIK en secciones incluidas en Lowicryl; *iii*) la presencia de rubisco se detectó mediante inmunocitoquímica.

La organización de primordios aciculares b1 se estudió mediante contraste DIC, exclusivamente.

5.2.2.1. Inclusión en Epon de primordios b0.

La fijación se realizó mediante inmersión a vacío en Karnovsky (4% paraformaldehído, 5% glutaraldehído en 25 mM tampón cacodilato pH 7.0) durante 4 h a temperatura ambiente, seguida de tres lavados, de 5 min, en tampón cacodilato 25 mM. Las muestras se almacenan a 4 °C en tampón cacodilato 10 mM hasta su utilización.

La deshidratación de las muestras se realizó mediante la serie etanólica (Tabla 5.1).

AGENTE DESHIDRATANTE	TRATAMIENTO
Etanol 30%	30' a temperatura ambiente
Etanol 50%	30' a temperatura ambiente
Etanol 70%	Toda la noche a 4 °C
Etanol 90%	60' a temperatura ambiente
Etanol 100%	3 lavados de 60' a temperatura ambiente
Etanol/Óxido de propileno (1:1)(v:v)	5' a temperatura ambiente
Óxido de propileno	3 lavados de 10' a temperatura ambiente

Tabla 5.1. Serie etanólica utilizada para la deshidratación de las muestras.

La resina Epon 812 (Serva) se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando DDAS (anhídrido 2-dodecenil succínico) y MNA (anhídrido metil nadic) como agentes endurecedores y DMP-30 (2,4,6-tris (dimetil aminometil fenol) como agente catalizador. La infiltración e inclusión en la resina se realizó según el protocolo descrito (Tabla 5.2).

AGENTE DE INFILTRACIÓN	TRATAMIENTO
Óxido de propileno: Epon (1:1) (v:v)	45' a temperatura ambiente en agitación
Epon	60' a temperatura ambiente en agitación
Epon	toda la noche a 4 °C en agitación

Tabla 5.2. Etapas de infiltración en resina Epon 812.

Las muestras se secaron a 37 °C durante 2 h. Las muestras se orientaron en cápsulas de gelatina rellenas de resina Epon 812. La polimerización se realizó a 70 °C durante 24 h.

Los cortes semifinos (2 µm) longitudinales de los primordios aciculares b0 se obtuvieron en piramitomo (LKB Bromma, 11800). Tras tinción con azul de toluidina al 0,075% y montaje con Eukit los cortes se observaron con microscopio Zeiss Axiophot. Las imágenes fueron procesadas con el software Adobe Photoshop 7.0.

5.2.2.2. Inclusión en Lowicryl de primordios b0.

La crioinclusión en Lowicryl se realizó sobre muestras previamente fijadas y deshidratadas en series crecientes de disolvente, disminuyendo progresivamente la temperatura durante la deshidratación hasta la temperatura de infiltración e inclusión en la resina Lowicryl (PLT, *Progressive Lowering of Temperature*) mediante el empleo de un equipo AFS (Leica, Viena).

La fijación de las muestras se realizó en 4% paraformaldehído en PBS (p:v) pH 7.3 durante toda la noche a 4 °C, seguida de tres lavados (5 min) en tampón PBS. Las muestras se almacenaron a 4 °C en 0,1% paraformaldehído en PBS (p:v) hasta su utilización.

Las muestras depositadas en cápsulas de plástico perforadas en su base (13 mm de diámetro x 18 mm de altura) fueron deshidratadas e infiltradas en resina Lowicryl K4M (TAAB) según se indica (Tabla 5.3, Tabla 5.4).

AGENTE DESHIDRATANTE	TRATAMIENTO	
	T ₁ = 0°C	t ₁ = 30'
(ninguno)	S ₁ = -150°C	t _{s1} = 6'
Metanol 50%	T ₂ = -15°C	t ₂ = 30'
	S ₂ = -150°C	t _{s2} = 6'
Metanol 70%	T ₃ = -30°C	t ₃ = 30'
Metanol 100%	3 lavados a -30° de 30' cada uno	

Tabla 5.3. Etapas de deshidratación de las muestras. T₁, T₂, T₃: temperatura en la que se realiza cada tratamiento con el alcohol; S₁, S₂, S₃: temperaturas de cambios entre tratamientos; t₁, t₂, t₃, t_{s1}, t_{s2}, t_{s3}: tiempos de cada etapa.

REACTIVOS	TRATAMIENTOS
Metanol /Lowicryl K4M (1:1) (v/v)	30' a -30°C
Metanol /Lowicryl K4M (1:2) (v/v)	30' a -30°C
Lowicryl K4M	60' a -60°C
Lowicryl K4M	Toda la noche a -30°C
Lowicryl K4M	24 h a -30°C

Tabla 5.4. Infiltración en resina Lowicryl K4M.

La inclusión se realizó en cápsulas de gelatina (Poliscience) de 0,5 mm de diámetro no perforadas. Se emplearon tubos TW6W (Philips, Bélgica) como fuente de luz ultravioleta necesaria para el transcurso de la polimerización de la resina (Tabla 5.5).

TEMPERATURA	DURACIÓN
T ₁ = -30°C	t ₁ = 64 h
S ₁ = 10°C/H	t _{s1} = 3h
T ₂ = 0°C	t ₂ = 1 h
S ₂ = 11°C/H	t _{s2} = 2h
T ₃ = 22°C	t ₃ = 24 h

Tabla 5.5. Crioinclusión en resina Lowicryl K4M. T₁, T₂, T₃: temperatura en la que se realiza cada etapa; S₁, S₂: temperaturas de cambio entre tratamientos; t₁, t₂, t₃, t_{s1}, t_{s2}: tiempos de cada etapa.

La obtención de cortes semifinos (2 μ m) de primordios aciculares b0 se realizó con ultratomo (LKB 4804 A, Sweeden) y, a continuación se trataron para:

- *Tinción de almidón.* Los cortes se incubaron con solución IIK (0,12 M KI, 0,09 M I en agua destilada) durante 10 min, se lavaron 3 veces en agua destilada y se montaron con Eukit.
- *Tinción de ácidos nucleicos.* La tinción de ácidos nucleicos se realizó añadiendo a los cortes 2,8 mM DAPI (4,6, diamino 2- fenilindol, Serva) en 1% Triton. Transcurridos 3 min se realizaron 3 lavados con agua destilada y se montaron con Eukit. Las imágenes fueron observadas en un microcopio Zeiss Axiophot bajo irradiación ultravioleta.
- *Pruebas inmunocitoquímicas para rubisco.* Los cortes semifinos se recogieron sobre portaobjetos multipocillo (ICN) recubiertos con APES y se incubaron durante 10 min en 5% BSA en PBS (v/v). El anticuerpo primario, un anticuerpo policlonal anti-rubisco se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en una dilución 1:50 en 5% BSA/PBS (v/v). Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS. El anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro coloidal de 5 nm (Bio Cell, Cardiff, UK) diluido 1:25 (v/v) en PBS se incubó durante 45 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados en PBS de 5 min cada uno, así como 3 lavados con agua destilada de 5 min cada uno. El revelado de la señal se produjo mediante técnicas de amplificación con plata (*"Silver Enhancing Kit"*; Cat. SEKL15, BBInternational), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras detener la reacción de amplificación mediante lavado con agua destilada, las imágenes se observaron en un microscopio Phillips EM 300 a 80 kV, se recogieron en una cámara fotográfica digital y se procesaron con Adobe Photoshop 7.0.

Con el objetivo de confirmar la especificidad del anticuerpo empleado para el reconocimiento de rubisco se realizaron pruebas de *Western blotting*. El protocolo seguido para la extracción proteica, separación en SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas rubisco fue el descrito para

la inmunodetección de histona H4 acetilada (Capítulo 4, Apartado 4.2.4). El anticuerpo primario, policlonal anti-rubisco se diluyó 1:1000 en tampón de bloqueo (v/v).

5.2.2.3. *Análisis de la estructura general de primordios b0 y b1 mediante contraste DIC.*

El procesamiento de las muestras, así como su visualización mediante contraste de interferencia diferencial se realizó según se describe en el Capítulo 3 (Apartado 3.2.2).

5.2.3. Determinación de la actividad proliferativa mediante inmunolocalización de Ciclina B1.

La distribución inmunohistoquímica de ciclina B1 (CycB1) se analizó en primordios aciculares b0 y b1 de fases de desarrollo MV, MR y también BE. Las muestras vegetales para el estudio inmunohistoquímico anti-ciclina B1 se trataron de acuerdo con el método descrito (Capítulo 3; Apartado 3.2.3). Se empleó como primario un anticuerpo monoclonal anti-ciclina B1 (Oncogene, Boston, MA) en dilución 1: 50 en 5% (v/v) BSA: PBS con un periodo de incubación de 1 h. Como anticuerpo secundario se seleccionó un anticuerpo policlonal conjugado a fluorocromo Alexa Fluor 546 (Molecular Probes; Leiden, The Netherlands) diluido 1: 25 en 5% (v/v) BSA: PBS manteniéndose la incubación durante 45 min. Las muestras fueron tratadas con solución 2.85 mM de DAPI (4,6 Diamidino 2- fenilindol; Serva).

La especificidad del anticuerpo anti-CycB1 empleado en tejidos de *P. radiata* fue confirmada mediante *Western blotting* (Capítulo 4; Apartado 4.2.4). El anticuerpo primario, anti-ciclina B1 (Oncogene, Boston, MA) se mantuvo durante 1 h 30 min en una dilución 1/300 en tampón de bloqueo.

5.2.4. Inmunolocalización de histona H4 acetilada.

Las pruebas de inmunolocalización de histona H4 acetilada se realizaron sobre segmentos apicales y basales correspondientes tanto a primordios b0 como b1 según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (Apartado 3.2.3).

5.2.5. *Western blotting* para la detección de histona H4 acetilada.

La extracción y cuantificación de proteínas totales presentes en primordios aciculares enteros b0 y b1, la separación electroforética, transferencia a membrana y condiciones del inmunoblot para la histona H4 acetilada se realizó según la descripción del Capítulo 4 (Apartado 4.2.4).

5.3. RESULTADOS.

5.3.1. Organización de primordios aciculares durante las fases del desarrollo ontogénico.

Los primordios aciculares b0 MV (Figura 5.1) y MR (Figura 5.2) comparten la siguiente organización: a) capas dérmicas, b) zonas internas de mesófilo donde se localizan células con citoplasma vacuolado y núcleos periféricos; c) eje central con células en progresiva diferenciación vascular. En regiones apicales existen células meristemáticas que conforman una población predominante.

Los primordios aciculares MR presentan, además, trazas de mayor diferenciación. En regiones superficiales se localizan vesículas citoplasmáticas periféricas, que no contienen almidón, pues no reaccionan con IIK (Figura 5.2e-f), pero que sí manifiestan tinción positiva a ácidos nucleicos (Figura 5.2h). La inmunolocalización de rubisco, certificada por *Western blotting*, permitió la identificación de estas vesículas como plastidios pre-granales y cloroplastos (Figura 5.2g).

Los resultados ponen de manifiesto que el desarrollo ontogénico, vegetativo o reproductivo, de la rama que contiene los primordios aciculares condiciona la diferenciación de los mismos, incluso desde fases muy iniciales de tan solo 10-20 días.

5.3.2. Organización de la estructura de primordios aciculares de ramas revigorizadas (brote epicórmico).

La estructura de primordios b0 procedentes de brote epicórmico (BE) está constituida por células meristemáticas (Figura 5.3a-g), no visualizándose diferenciación tisular. Ocasionalmente, aparece formación inicial de estomas, así como trazas de elementos vasculares y de tubos resiníferos. Cuando se analizan primordios b1 de brotes epicórmicos (Figura 5.3h-j) y teniendo en cuenta la organización de primordios de fases MV y MR, la reversión hacia estados menos diferenciados es patente.

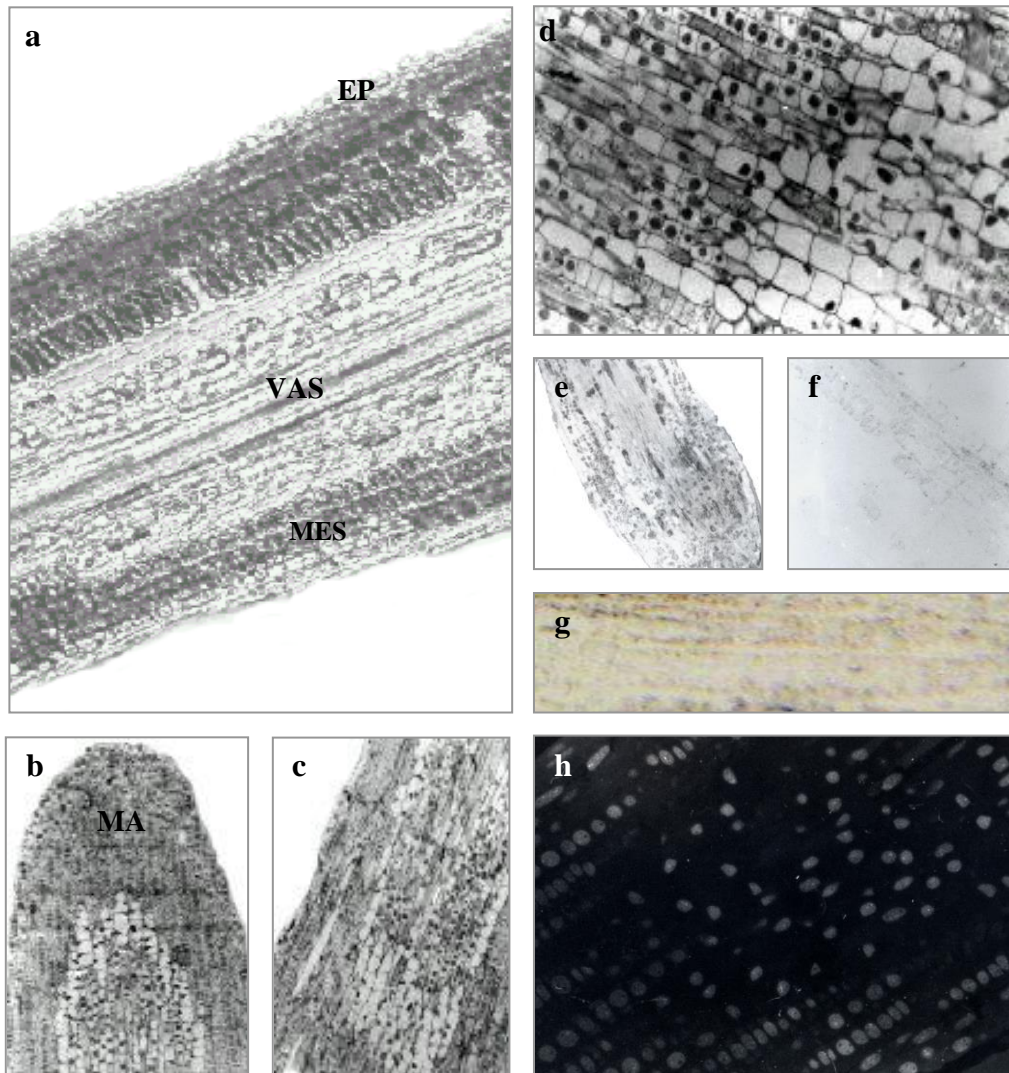


Figura 5.1. Secciones longitudinales de primordios aciculares b0 de ramas en fases MV. **a)** región basal (Nomarsky, 20x); **b y c)** porciones apicales y basales, respectivamente (Epon, 25x); **d)** detalle de la zona central del primordio acicular (Epon, 40x); **e,f)** control y tinción IIK, respectivamente (Lowicyrl, 10x); **g)** inmunodetección de rubisco (40x); **h)** tinción DAPI (Lowicyrl, 16x). EP, epidermis; MA, meristemo apical; MES, mesófilo; VAS, sistema vascular.

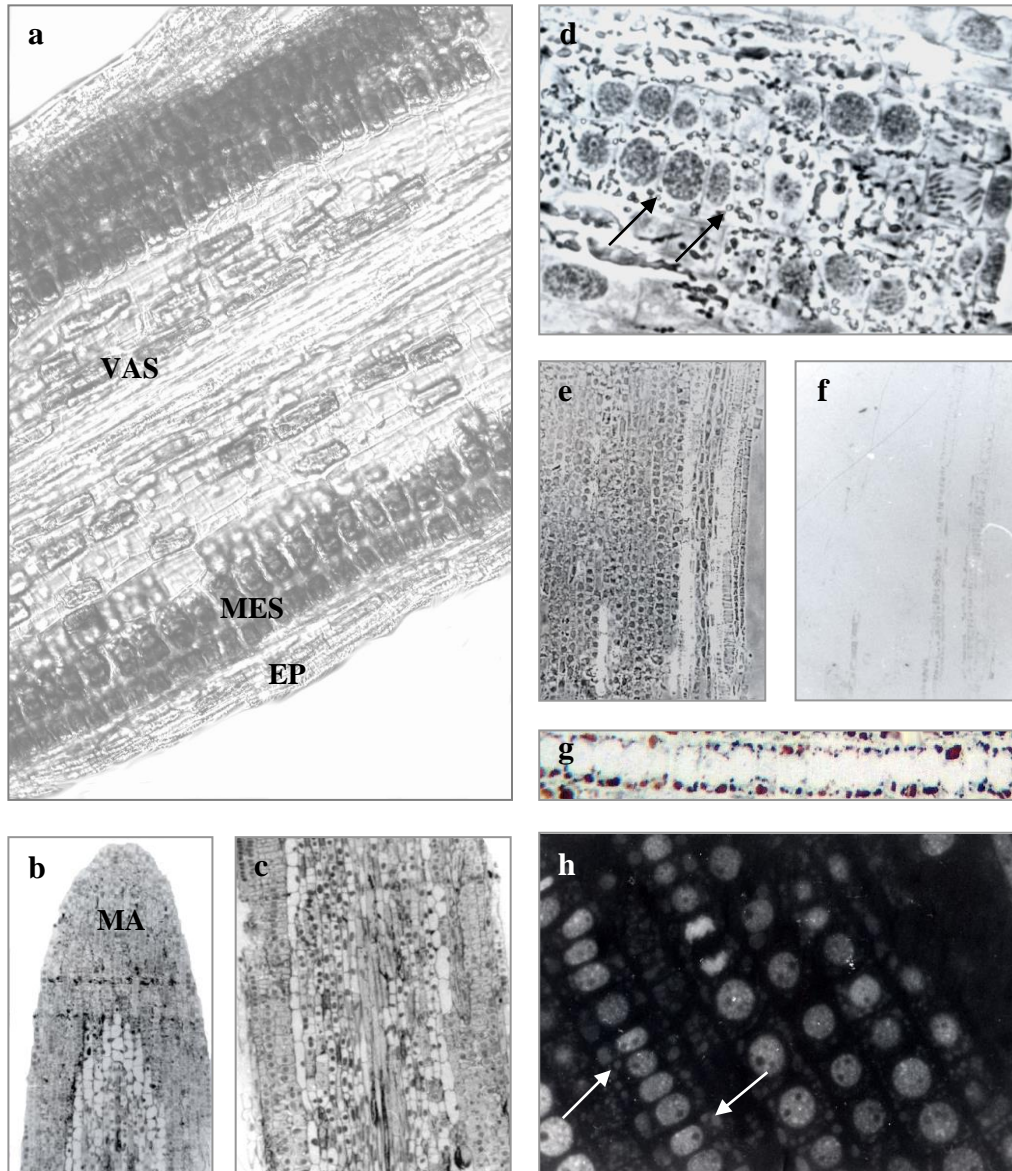


Figura 5.2. Secciones longitudinales de primordios aciculares b0 de ramas en fases MR. **a)** región basal (Nomarsky, 20x); **b y c)** porciones apicales y basales, respectivamente (Epon, 25x); **d)** detalle de la zona central del primordio acicular (Epon, 40x); **e,f)** control y tinción IIC, respectivamente (Lowicryl, 10x); **g)** detección de rubisco (40x); **h)** tinción DAPI (Lowicryl, 40x). EP, epidermis; MA, meristemo apical; MES, mesófilo; VAS, sistema vascular. Las flechas indican presencia de cloroplastos y plastidios pre-granales.

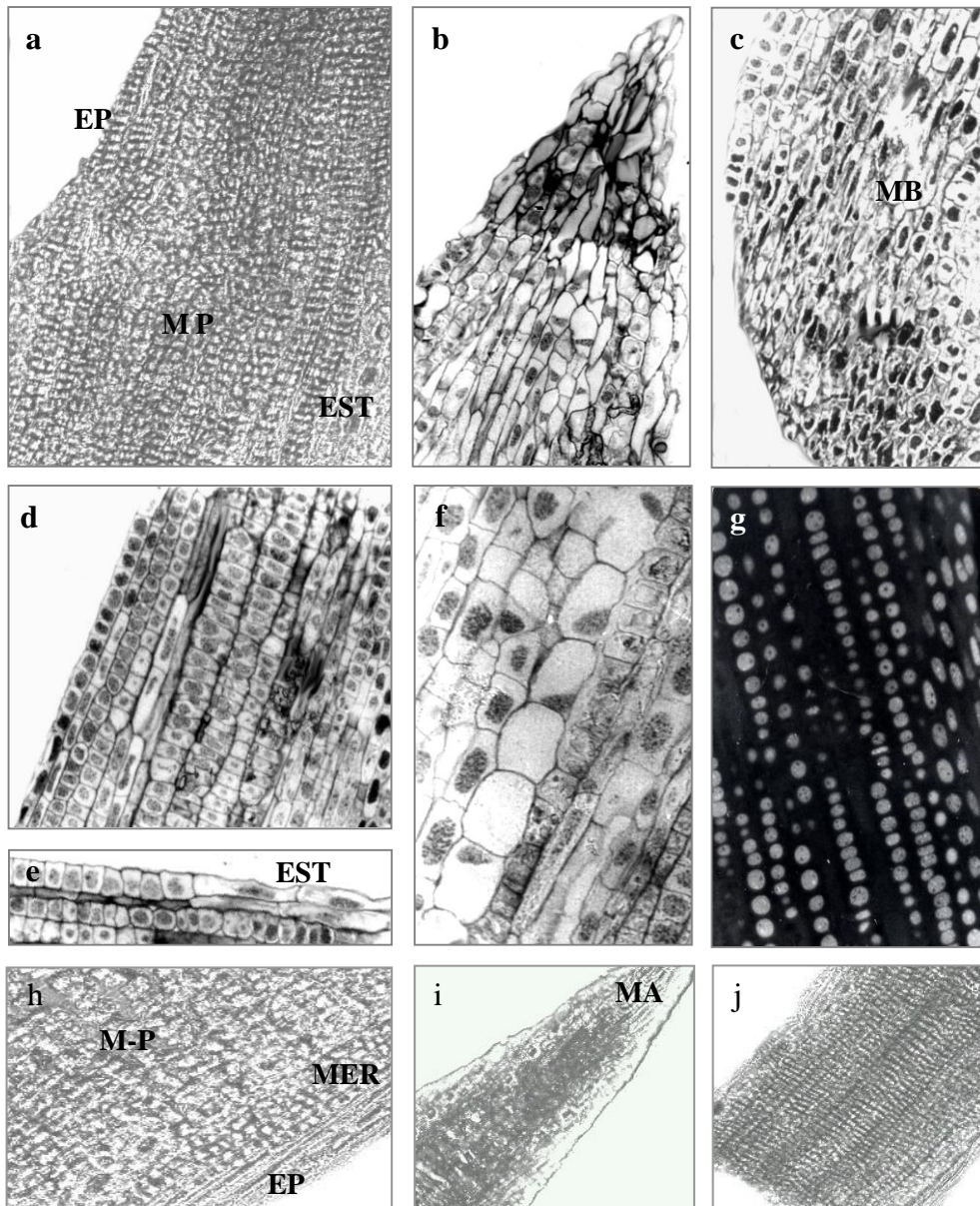


Figura 5.3. Secciones longitudinales de primordios aciculares de brote epicórmico (BE). Análisis estructurales generales de primordios aciculares b0: **a)** Segmento basal (Nomarsky, 20x); **b y c)** segmento apical y basal (Epon, 25x); **d)** detalle del eje central del primordio (Epon, 25x); **e)** detalle de la epidermis del primordio acicular mostrando dos células oclusivas del estoma (Epon, 25x); **f)** detalle de la zona central del primordio mostrando (Epon, 40x); **g)** tinción DAPI (Lowicryl, 16x). Análisis estructurales generales de primordios aciculares b1: **h)** Detalle del segmento basal (Nomarsky, 63x); **i y j)** segmentos apical y basal, respectivamente (20x, Nomarsky). EP, epidermis; EST, células estomáticas; MA, meristemo apical; MB, meristemo basal; MER, meristemo; M-P, transición meristemo-parénquima.

5.3.3. Cambios en la actividad proliferativa dependientes de edad ontogénica y de revigorización.

La inmunolocalización de CycB1 establece diferencias importantes entre los tres tipos de primordios: BE, MV, MR. La presencia de CycB1 fue superior en primordios aciculares BE, localizándose la señal mayoritariamente en citoplasmas y ocasionalmente en ciertos núcleos de células meristemáticas (Figura 5.4). En primordios no revigorizados, MV y MR, se reduce la presencia de CycB1, localizándose la señal preferentemente en citoplasmas. La menor presencia de CycB1 se identifica en primordios MR (Figura 5.4c), presentando los primordios en fases MV niveles de CycB1 intermedios entre BE y MR (Figura 5.4b). Además en células meristemáticas de fases MV y MR también se inmunolocalizó CycB1 en células provasculares (Figura 5.5). Los análisis *Western blotting* certificaron la especificidad del anticuerpo anti-ciclina B1 empleado (Figura 5.6).

Existe, pues, descenso de CycB1 asociado a la adquisición de competencia floral, desde fases MV hasta fases MR, lo cual coincide con el incremento de diferenciación del primordio durante el cambio de fase y con los cambios de organización tisular anteriormente descritos. Los primordios procedentes de ramas revigorizadas (BE), constituidos mayoritariamente por células meristemáticas, presentan las señales de CycB1 más elevadas.

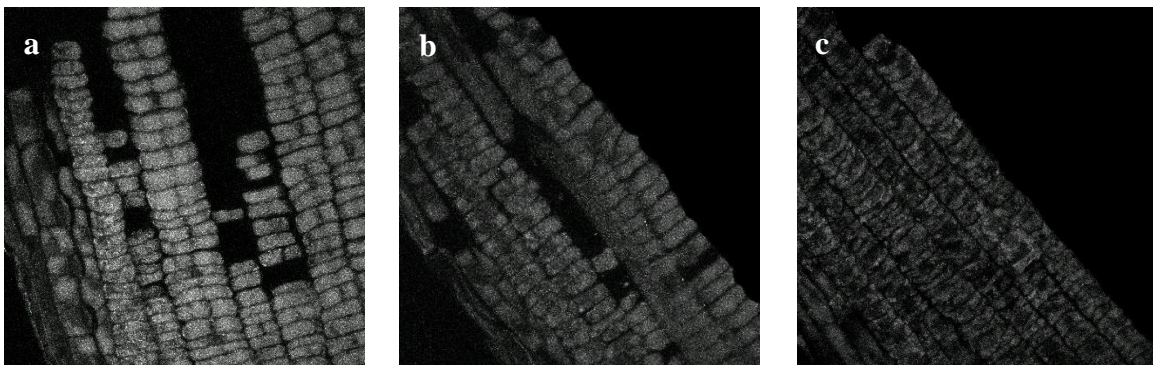


Figura 5.4. Inmunolocalización de ciclina B1 (CycB1) en regiones superficiales de primordios aciculares b0 de: **a)** BE; **b)** ramas en fases MV y **c)** ramas en fases MR.

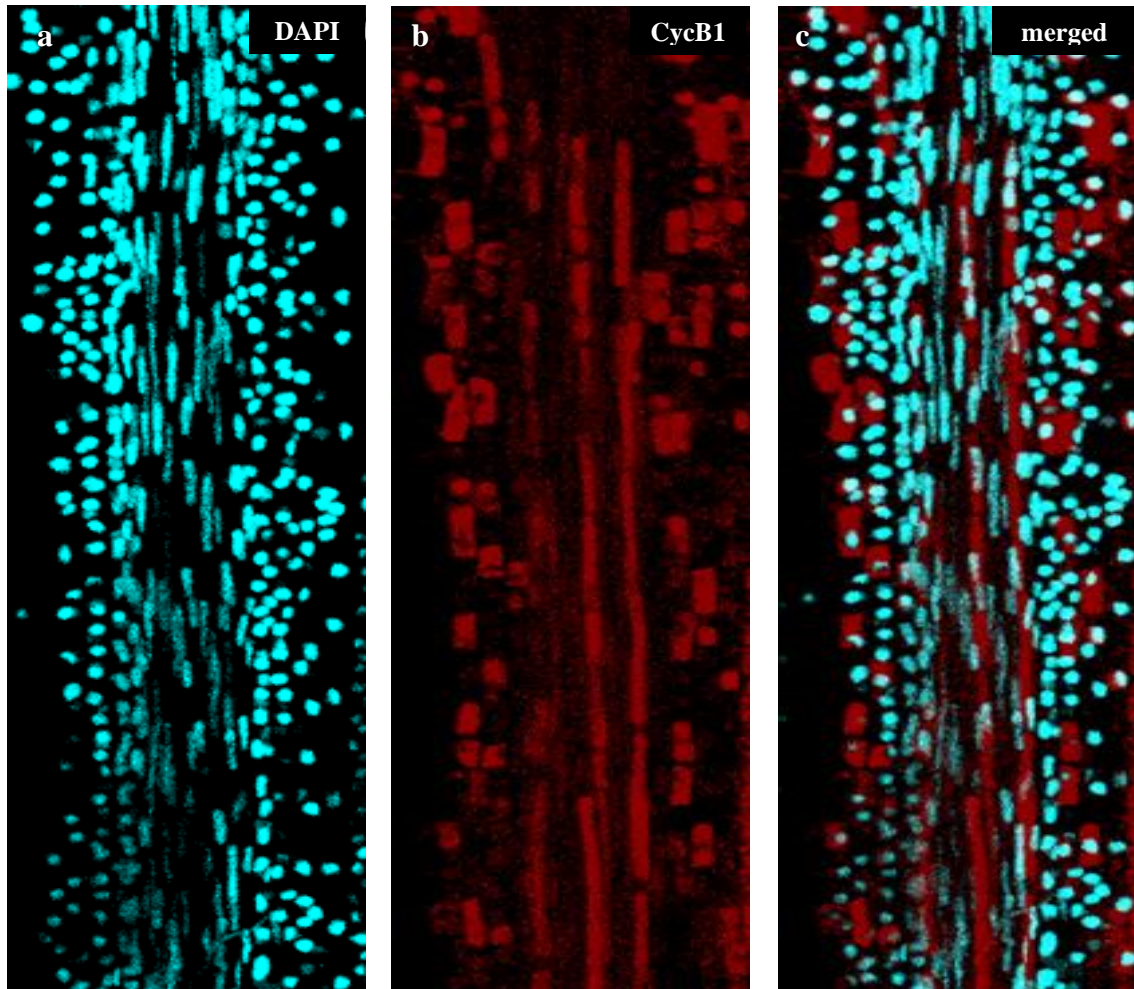


Figura 5.5. Immunolocalización de ciclina B1 (CycB1) en la región del eje central de primordios aciculares b1 en fases MR. Nótese la inmunodetección de CycB1 en los elementos provasculares. **a)** DAPI; **b)** inmunolocalización de CycB1; **c)** superposición de las imágenes de DAPI e inmunolocalización de CycB1.

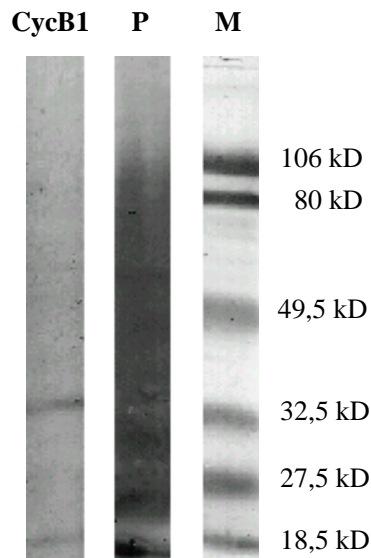


Figura 5.6. *Western blotting* de CycB1 en primordios aciculares b0. M, marcadores proteicos; P, proteína total.

5.3.4. Variaciones de histona H4 acetilada dependientes de desarrollo ontogénico.

Se observa distribución diferencial de AcH4 dependiente de tejido y de fase de desarrollo ontogénico. Los niveles detectados en fases MV (Figura 5.7a-f) son superiores a los presentes en fases MR (Figura 5.7g-l). Los índices de acetilación cuantificados en primordios aciculares MV fueron del 28% para porciones apicales y del 19% en porciones basales (Figura 5.8a). Se identifican descensos más acusados en primordios aciculares MR, donde los niveles de AcH4 son del 25% y 10% para porciones apicales y basales, respectivamente (Figura 5.8). La cuantificación mediante *Western blotting* (Figura 5.8b) valida los índices relativos de acetilación obtenidos del análisis de las imágenes de inmunofluorescencia confocal. Así, los niveles de proteína estimados para los tejidos correspondientes a ramas MR fueron siempre inferiores (0.45) a los obtenidos para primordios aciculares de ramas MV (1).

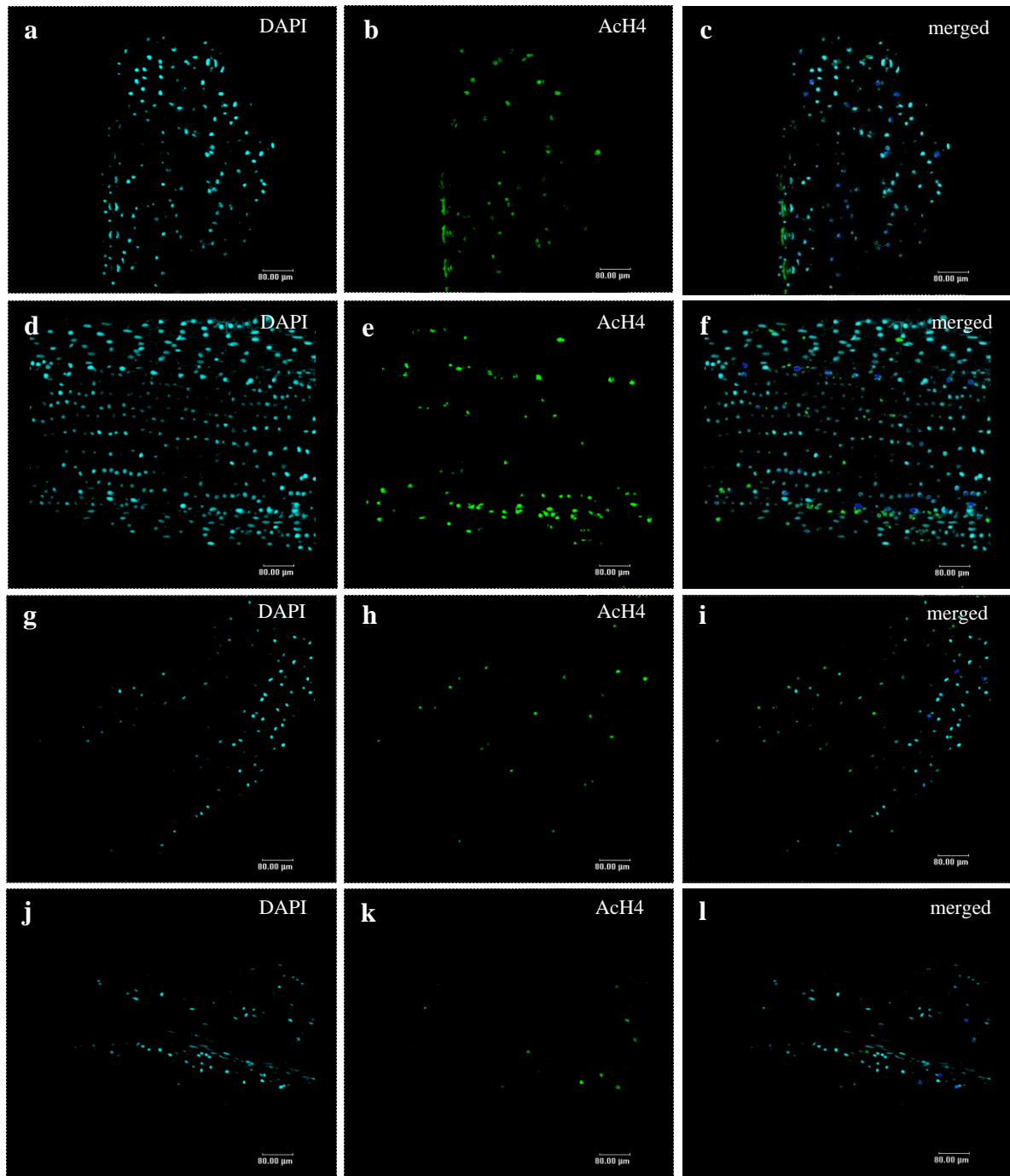


Figura 5.7. Inmunolocalización de AcH4 en fascículos aciculares b0 de ramas en las fases de desarrollo que se indican. Fases MV: **a,b,c**) porciones apicales; **d,e,f**) porciones basales. Fases MR: **g,h,i**) porciones apicales; **j,k,l**) porciones basales.

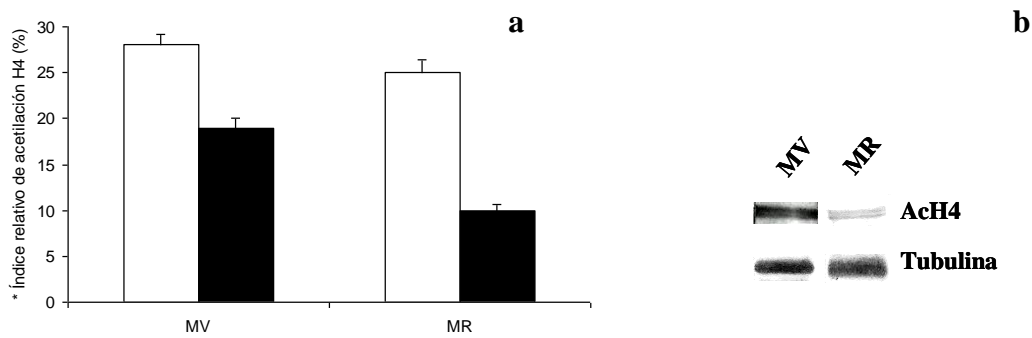


Figura 5.8. a) Índices relativos de acetilación en porciones apicales (barras blancas) y porciones basales (barras negras) de primordios aciculares b0 tomados de ramas en fases MV y MR. **b)** Análisis *Western blot* de histona H4 acetilada en primordios aciculares b0 de ramas en fases MV y MR. La tubulina se tomó como control.

* Índice relativo de acetilación H4 (%): (nº de núcleos marcados con histona H4 acetilada / nº total de núcleos presentes en el tejido) x 100.

5.3.5. Efecto de la revigorización sobre los niveles de histona H4 acetilada en primordios aciculares.

Independientemente de su estado cronológico, los primordios aciculares BE manifiestan incremento de AcH4 respecto a estados no revigorizados MV y MR.

No existen diferencias apical (40%) / basal (39%) en la localización de AcH4 de primordios aciculares de la misma edad (Figura 5.9, Figura 5.10). Además, se detectó mayor presencia de AcH4 en primordios aciculares b1 (Figura 5.9a-f) que en primordios aciculares b0, con menor grado de desarrollo (Figura 5.9g-l). Aumentos considerables en el índice de acetilación se observaron en primordios aciculares b1, detectándose AcH4 de forma mayoritaria en núcleos de tejidos revigorizados. En este sentido, para los segmentos apicales se obtuvieron porcentajes de AcH4 del 100% y del 93% en los segmentos basales (Figura 5.10a). Los resultados del *Western blotting* confirmaron la menor presencia de proteína modificada en los extractos obtenidos a partir de primordios aciculares b0 respecto a los primordios aciculares de mayor edad (Figura 5.10b).

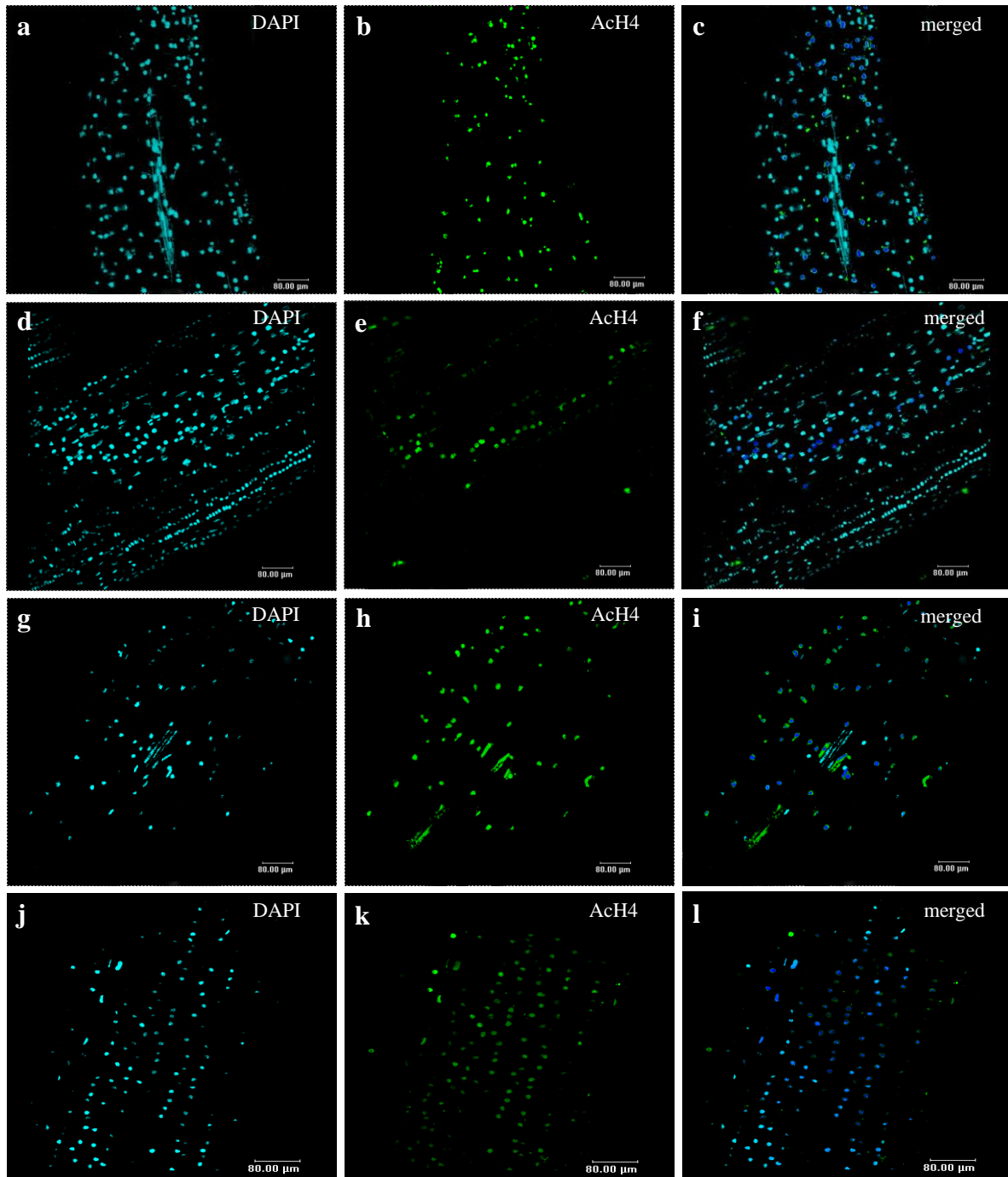


Figura 5.9. Inmunolocalización de AcH4 en fascículos aciculares de BE correspondientes a dos estados de desarrollo ontogénico. Primordios aciculares b0: **a,b,c** porciones apicales; **d,e,f** porciones basales. Primordios aciculares b1: **g,h,i** porciones apicales; **j,k,l** porciones basales.

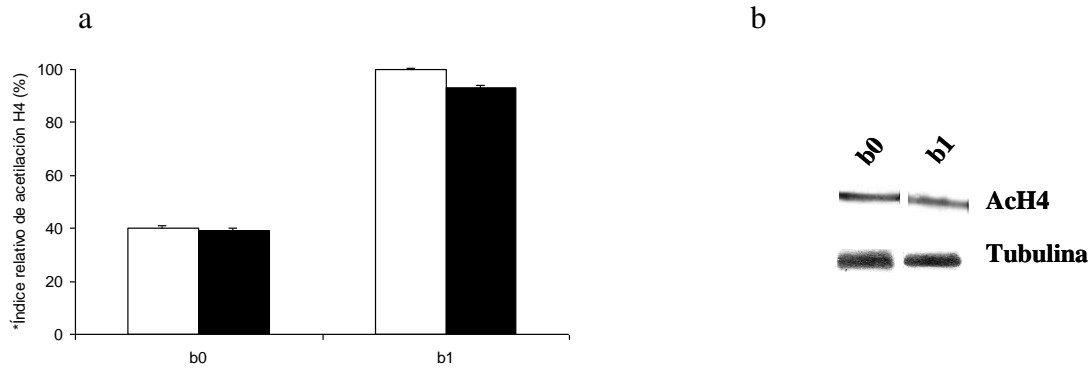


Figura 5.10. a) Índices relativos de acetilación en porciones apicales (barras blancas) y porciones basales (barras negras) correspondientes a primordios aciculares b0 y b1, después de la revigorización. **b)** Análisis *Western blotting* de histona H4 acetilada en primordios aciculares b0 y b1 localizados en brotes epicórmicos. La tubulina se tomó como control.

* Índice relativo de acetilación H4 (%): $(n^{\circ} \text{ de núcleos marcados con histona H4 acetilada} / n^{\circ} \text{ total de núcleos presentes en el tejido}) \times 100$.

5.4. DISCUSIÓN.

Las fases del desarrollo vegetal, consecuencia de la activación/represión selectiva de genes, son reguladas a través de cambios en la accesibilidad de los factores de transcripción a la cromatina (Li et al., 2002). Avances en las investigaciones sobre el papel de la cromatina en plantas han permitido establecer una conexión entre factores reguladores de la estructura, conformación de la cromatina y fases del desarrollo vegetal. Entre los factores implicados, cabe citarse los complejos proteicos asociados a cromatina, tales como proteínas del grupo Polycomb (PcG) (Grossniklaus et al., 1998; Ohad et al., 1999), factores de ensamblaje a la cromatina (CAF, *Chromatin Assembly Factor*) (Kaya et al., 2001) o proteínas de complejos silenciadores (SWI/SNF) (Jeddeloh et al., 1999; Wagner & Meyerowitz, 2002). Los múltiples cambios en la estructura de la cromatina durante el desarrollo vegetal están controlados epigenéticamente mediante metilación del ADN y modificaciones de histonas (Li et al., 2002). La especificación de las fases de desarrollo en plantas está dictada por pautas de expresión génica, principalmente genes homeóticos, en células meristemáticas que sufren rediferenciación celular (Miki et al., 2002; Tian et al., 2003).

La capacidad de rediferenciación celular o totipotencia celular es solo posible si los mecanismos de control de la expresión génica ejercen acciones reversibles, tal y como es el caso de los niveles de acetilación de histonas que resultan del balance entre la acción de enzimas HATs y HDACs (Legube & Trouche, 2003). Está aceptado (Wu et al., 2000a,b; Li et al., 2002; Jang et al., 2003) que alteraciones que afectan a HATs y HDACs conllevan una serie de aberraciones pleiotrópicas que incluyen cambios en las pautas de crecimiento y desarrollo en plantas. Entre los datos existentes hay que destacar que en *Arabidopsis thaliana* la no expresión de AtHD1 (HDAC) conlleva retrasos del cambio de fase (Tian et al., 2003), mientras que en maíz existen niveles de expresión de ZmRpd3 (HDAC) superiores en dominios celulares destinadas a funciones reproductivas que en dominios potencialmente vegetativos (Varotto et al., 2003). Ambos resultados apuntan a que las enzimas HDACs son esenciales para que se produzca el cambio de fase, datos que apoyan los descensos drásticos de AcH4 obtenidos en primordios b0 de *P. radiata* con capacidad reproductiva respecto a las correspondientes vegetativos.

Los resultados obtenidos para primordios b0 de brotes epicórmicos certifican que la reversión hacia estados revigorizados implica recuperación de los niveles de AcH4, lo cual apoya la hipótesis de que la acetilación de histonas está implicada en la definición y control de destinos celulares, posiblemente silenciando la expresión de aquellos genes cuya presencia es específica de fases reproductivas en *P. radiata*. El proceso de diferenciación de primordios b0 en *P. radiata* tiene lugar al provocar la acetilación, -restricción de la expresión, selectiva de genes específicos de tejido.

La mayor parte del genoma de células diferenciadas de eucariotas consiste en cromatina inactiva hipoacetilada (Eberharther & Becker, 2002), hecho que explica los descensos de AcH4 en fases de desarrollo más diferenciadas y maduras. Como se ha descrito, los tejidos MR poseen el grado de diferenciación superior, caracterizándose por la presencia de células con cloroplastos y plastidios pre-granales, que generan respuesta positiva a los ensayos de inmunolocalización de rubisco, y que se encuentran ausentes en otras fases del desarrollo. En el otro extremo se encuentran los primordios procedentes de BE constituidos por células no diferenciadas, principalmente células meristemáticas. De modo que, en base a los resultados obtenidos, podemos concluir que los descensos en los niveles de AcH4 observados desde fases BE hasta MV y, finalmente MR, se corresponden con aumentos en el grado de diferenciación de los primordios en ese mismo orden.

Por otro lado, los descensos de AcH4 en la transición desde fases vegetativas hasta fases reproductivas, así como los aumentos de AcH4 en materiales revigorizados se corresponden con cambios en los niveles de CycB1 de los correspondientes primordios. Las CYCs y las CDKs son las proteínas que controlan de forma decisiva la progresión del ciclo celular (Ito, 2000) y, en concreto, CycB1 se considera un marcador para la detección de actividad mitótica (Harrar et al., 2003; Himanen et al., 2003). Se encuentra ampliamente descrito que altos niveles de transcritos de ciclinas se adscriben predominantemente a órganos meristemáticos, siendo la representación en órganos no meristemáticos muy escasa (Kouchi et al., 1995; Berger et al., 1998; Boissard-Lorig et al., 2001; Himanen et al., 2003). Entre las células de carácter no meristemático, se ha detectado presencia de CycB1 en células diferenciadas constituyentes del complejo que dará lugar a estomas maduros (Boudolf et al., 2004). Parece que en estos casos la CycB1 contribuye a la orientación de las células en órganos en formación (Ferreira et al., 1994; Fuerts et al., 1996; Jelenská et al., 2000), asegurando una correcta

interconexión entre células adyacentes y participando más en los procesos de elongación celular que en la división celular. De estos datos podemos concluir que los niveles de CycB1 en primordios aciculares en formación están asociados a la proporción de células meristemáticas que contengan, constituyendo un indicador de la actividad proliferativa de ese primordio. Además, los primordios aciculares estudiados son órganos en proceso de formación en los que la correcta diferenciación depende del control de las pautas de división. Todo parece indicar que la CycB1 está implicada en la elongación-diferenciación de los elementos celulares del sistema vascular, asegurando una interconexión celular adecuada que conlleve a la formación de los tubos del sistema vascular del primordio acicular en *P. radiata*.

En plantas, la acetilación de histona H4 ha sido relacionada con procesos de replicación del ADN (Jasencaková et al., 2000) y ciclo celular (Houben et al., 1997; Vyskot et al., 1999; Wako et al., 2002) más que con procesos de regulación de la transcripción génica. Si la acetilación global de histona H4 en plantas está preferentemente relacionada con el fenómeno de replicación, es esperable que en células donde la tasa de replicación sea mayor los niveles de acetilación también sean altos. En primordios aciculares procedentes de fases maduras (MV y MR) la presencia de células diferenciadas reduce la proporción de meristemos activos y de CycB1, de modo que las tasas de replicación son menores y los niveles de AcH4 disminuyen. En suma, mediante las validaciones realizadas en este capítulo con primordios b0 se puede concluir que a lo largo del desarrollo ontogénico y del proceso de revigorización en *P. radiata* se producen variaciones en los niveles de AcH4 que están condicionados por las tasas de replicación del tejido.

Ahora bien, los resultados obtenidos para distintos estados cronológicos en brote epicórmico (b0 y b1) nos permiten concluir que los niveles de AcH4 son superiores en estados cronológicos más avanzados. Debe considerarse que en cada una de las fases del desarrollo del órgano no solo intervienen células y tejidos específicos, sino que los cambios se rigen por cinéticas distintas. Nuestros resultados parecen indicar que cada eslabón o fase de esta etapa responde a unos estímulos y puede estar regulada diferencialmente por diversos mecanismos de control. Aunque las investigaciones realizadas no son muy abundantes, se ha descrito que la contribución relativa de cada factor epigenético, tal como la hipacetilación de histonas, varía para cada momento y espacio (Dobosy & Selker, 2001). Podemos concluir que en los procesos de desarrollo y

diferenciación de los primordios aciculares de *P. radiata* la acetilación de histona H4 desempeña un papel primordial que se acentúa en estados de desarrollo del órgano más avanzados, es decir, a medida que las pautas de diferenciación del órgano se hacen más restrictivas.

En la Tabla 5.6 se recogen las principales conclusiones obtenidas en los primeros estudios realizados acerca del papel de la acetilación de histonas como indicador epigenético de los procesos de envejecimiento, maduración y revigorización en *P. radiata*.

EDAD CRONOLÓGICA	SEGMENTO	INDICADOR	PROCESO	
<i>Primordio Acicular b0</i>	Apical	HISTOLÓGICO	-	-
		EPIGENÉTICO	SI	Rev
	Basal	HISTOLÓGICO	SI	CF, Rev
		EPIGENÉTICO	SI	CF, Rev
<i>Primordio Acicular b1</i>	Apical	HISTOLÓGICO	-	-
		EPIGENÉTICO	SI	Rev
	Basal *	HISTOLÓGICO	SI	CF, Rev
		EPIGENÉTICO	SI	CF, Rev

Tabla 5.6. Validación de los indicadores estructurales y epigenéticos propuestos para los procesos de envejecimiento y revigorización en primordios aciculares. Los indicadores histológicos se establecen en función de los análisis estructurales realizados en secciones longitudinales de los primordios aciculares bajo microscopía óptica y bajo contraste DIC. Los indicadores epigenéticos hacen referencia a los cambios de acetilación global de histona H4 detectados mediante inmunofluorescencia confocal y análisis *Western blotting* de los primordios aciculares. CF, cambio de fase; Rev, Revigorización.

* Los niveles de acetilación global de histona H4 en porciones basales de primordios aciculares b1 constituyen el mejor candidato como indicador epigenético de los estados descritos.

Sin embargo, deben realizarse más estudios en este campo para poder asegurar el papel “indicador” de la acetilación de histona H4 y de los análisis estructurales de los primordios aciculares, quedando pendiente la confirmación de estos resultados en más puntos del desarrollo ontogénico “normal” del individuo, así como en otros sistemas experimentales de revigorización del material vegetal. Las líneas de investigación futuras, una vez certificada la asociación entre desarrollo vegetal y niveles específicos de AcH4, consisten en el análisis del estado de acetilación de genes específicos de los

procesos de envejecimiento y procesos relacionados. Sin embargo, debe destacarse que los resultados presentados son pioneros en este campo, ya que nunca antes se habían descrito cambios de acetilación de histonas en plantas relacionados con el fenómeno del envejecimiento.

5.5. BIBLIOGRAFÍA.

Ballester, A. 1995. Molecular and morphological markers for juvenility, maturation and rejuvenation in woody plant species. The biotechnological approach. Abstracts of Workshop on: Molecular and morphological markers for juvenility, maturation, rejuvenation and somatic embryogenesis in woody species - The biotechnological approaches, 1-1. Swedish University of agricultural sciences.

Berger, F., Hung, C.Y., Dolan, L. & Schiefelbein, J. 1998. Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Biology* 194: 235-245.

Boisnard-Lorig, C., Colon-Carmona, A., Bauch, M., Hodge, S., Doemer, P., Bancharel, E., Dumas, C., Haseloff, J. & Berger, F. 2001. Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *The Plant Cell* 13: 495-509.

Boudolf, V., Barroco, R., Engler, J.A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudst, M., Inzé, D. & De Veylder, L. 2004. B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 945-955.

Dobosy, J.R. & Selker, E.U. 2001. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 721- 727.

Eberharter, A. & Becker, P.B. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Reports* 3(31): 224- 229.

Ferreira, P., Hemerly, A., de Almeida Engler, J., Bergounioux, C., Burssens, S., Montagu, M.V., Engler, G. & Inzé, D. 1994. Three discrete classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 11313-11317.

Fraga, M.F., Cañal, M.J. & Rodríguez, R. 2002a. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* D. Don trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 139-145.

Fraga, M.F., Cañal, M.J. & Rodríguez, R. 2002b. Phase- change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta* 215: 672-678.

Fraga, M.F., Rodríguez, R. & Cañal, M.J. 2002c. Genomic DNA methylation-demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology* 22: 813-816.

Fuerts, R.A.U.A., Soni, R., Murray, J.A.H. & Lindsey, K. 1996. Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 112: 1023-1033.

Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.P., Hoepfner, M.A. & Gagliano, W.B. 1998. Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280: 446-450.

Hackett, W.P. & Murray, J.R. 1993. Maturation and rejuvenation in woody species. En: M.R. Ahuja (ed.), *Micropropagation of woody plants*, 93-105. Kluwer Adac. Publ., Dordrecht.

Harrar, Y., Bellec, Y., Bellini, C. & Faure, J-D. 2003. Hormonal control of cell proliferation requires PASTICCINO genes. *Plant Physiology* 132 : 1217-1227.

Himanen, K., Reuzeau, C., Beeckman, T., Melzer, S., Grandjean, O., Corben, L. & Inzé, D. 2003. The *Arabidopsis* locus *RCB* mediates upstream regulation of mitotic gene expression. *Plant Physiology* 133: 1862-1872.

Houben, A., Belyaev, N.D., Leach, C.R. & Timmis, J.N. 1997. Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma Research* 5: 233-237.

Ito, M. 2000. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Molecular Biology* 43: 677-690.

Jang, I.C., Pahk, Y.M., Song, S.I., Kwon, H.J., Nahm, B.H. & Kim, J.K. 2003. Structure and expression of the rice class-I type histone deacetylase genes *OsHDAC1-3*: *OsHDAC1* overexpression in transgenic plants leads to increased growth rate and altered architecture. *The Plant Journal* 33: 531- 541.

Jasencakova, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B.M. & Schubert, I. 2000. Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *The Plant Cell* 12: 2087- 2100.

Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. & Richards, E.J. 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genetics* 22: 94-97.

Jelenská, J., Deckert, J., Kondorosi, E. & Legocki, A.B. 2000. Mitotic B-type cyclins are differentially regulated by phytohormones and during yellow lupine nodule development. *Plant Science* 150: 29-39.

Kaya, H., Shibahara, K.I., Taoka, K.I., Iwabuchi, M., Stillman, B. & Araki, T. 2001. *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104: 131-142.

Kouchi, H., Sekine, M. & Hata, S. 1995. Distinct classes of mitotic cyclins are differentially expressed in the soybean shoot apex during the cell cycle. *The Plant Cell* 7: 1143-1155.

Legube, G. & Trouche, D. 2003. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Reports* 4: 944- 947.

Li, G., Hall, T.C. & Holmes-Davis, R. 2002. Plant chromatin: development and gene control. *BioEssays* 24: 234-243.

Miki, B., Brown, D., Tian, L., Malik K. & Wu, K. 2002. The role of histone deacetylases in flowering. *Flowering Newsletter* 33: 3-6.

Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Lannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B. & Fisher, R.L. 1999. Mutations in FIE, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* 11: 407-416.

Tian, L., Wang, J., Fong, M.P., Chen, M., Cao, H., Gelvin, S.B. & Chen, Z.J. 2003. Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis* histone deacetylase 1 (*AtHDI*) expression. *Genetics* 165: 399-409.

Varotto, S., Locatelli, S., Canova, S., Pipal, A., Motto, M. & Rossi, V. 2003. Expression profile and cellular localization of maize Rpd3-type histone deacetylases during plant development. *Plant Physiology Preview* 133: 606-617.

Vyskot, B., Siroky, J., Hladilova, R., Belyaev, N.D. & Turner, B.M. 1999. Euchromatic domains in plant chromosomes as revealed by H4 histone acetylation and early DNA replication. *Genome* 42: 343-350.

Wagner, D. & Meyerowitz, E.M. 2002. SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Current Biology* 12: 85-94.

Wako, T., Fukuda, M., Furushima-Shimogawara, R., Belyaev, N.D. & Fukui, K. 2002. Cell cycle-dependent and lysine residue-specific dynamic changes of histone H4 acetylation in barley. *Plant Molecular Biology* 49: 645-653.

Wu, K., Malik, K., Tian, L., Brow, D. & Miki, B. 2000a. Functional analysis of a RPD3 histone deacetylase homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 44: 167-176.

Wu, K., Tian, L., Malik, K., Brow, D. & Miki, B. 2000b. Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 22: 19-27.

Capítulo VI

DETECCIÓN MEDIANTE MICROARRAYS DE LOS CAMBIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDOS POR TRATAMIENTOS CON 5-AZA 2' - DEOXCITIDINA EN SUSPENSIONES CELULARES DE *Arabidopsis thaliana*.

6.1. INTRODUCCIÓN.

Los procesos de demetilación son eventos frecuentes durante las fases de desarrollo y diferenciación vegetal. No solo descensos de metilación del ADN preceden el establecimiento de fases de desarrollo, sino que también son concomitantes a la ganancia de competencia morfogénica durante la revigorización (Fraga et al., 2002). En esta memoria se puso de manifiesto que los procesos de demetilación se asocian a la reprogramación celular que permite la evocación y manifestación floral, así como a los efectos de revigorización (Capítulo 2; Capítulo 3). Los efectos de la demetilación del ADN sobre el desarrollo y la diferenciación vegetal deben ejercerse a través del control de la expresión génica. Ahora bien, ¿cuáles son los genes que están controlados a través de la metilación específica de sus elementos reguladores?.

La correcta progresión del ciclo celular resulta fundamental para el crecimiento y desarrollo de los organismos, constituyendo un fenómeno altamente conservado en eucariotas (Shaul et al., 1996), si bien es cierto, que las plantas exhiben ciertas características exclusivas debido a la totipotencia vegetal que confiere mayor versatilidad a los procesos de desarrollo y diferenciación (Loidl & Loidl, 1996). La identificación de las moléculas implicadas en el ciclo celular de plantas, así como de los mecanismos de control, resulta de vital interés para la mejor comprensión de los procesos productivos vegetales y aporta conocimientos que pueden hacerse extensibles a otros organismos.

El empleo de sistemas vegetales como herramientas de estudio reporta una serie de ventajas respecto al uso de modelos animales, principalmente debido entre otras ventajas a la mayor facilidad de obtención de cultivos vegetales, tiempos de regeneración más cortos, genomas más pequeños, mayor plasticidad genómica o mayor capacidad de transformación. Aunque es obvio que existen pautas metabólicas distintas entre animales y vegetales, las plantas pueden proporcionar sistemas experimentales aptos para el estudio de rutas metabólicas más conservadas en términos evolutivos. Tal ha sido el caso del avance en el conocimiento de la mayor parte de factores epigenéticos como acetilación de histonas o metilación del ADN, donde importantes investigaciones en organismos eucariotas inferiores, por ejemplo en *Neurospora crassa* (Tamaru & Selker, 2001; Selker et al., 2002, Tamaru et al., 2003) o en especies modelo de plantas, entre ellas *Arabidopsis thaliana* (Bartee et al., 2001; Mathieu et al., 2003; Tariq et al., 2003), han contribuido al descubrimiento de la maquinaria enzimática y, en general, de mecanismos básicos de actuación. Conocimientos que han sido de gran utilidad en investigaciones en organismos eucariotas superiores animales siendo, incluso, extensibles al campo de la oncología.

En este Capítulo se afronta la identificación de genes vegetales regulados por metilación del ADN mediante el empleo como sistema experimental de células en suspensión de *A. thaliana*, donde la pérdida del control del crecimiento es comparable con tumores animales. Para analizar el papel de la metilación del ADN sobre determinados genes implicados en este proceso, se empleó una técnica de “desenmascaramiento químico” consistente en la aplicación exógena de una droga demetilante directamente a las suspensiones celulares. Los genes cuyas variaciones de expresión son inducidos por la demetilación de sus promotores, analizados mediante microarrays, son candidatos a regulación epigenética mediante metilación del ADN. La metilación del ADN en estos genes puede producirse de modo natural, en procesos normales de desarrollo, o bien participar en la aparición de pautas aberrantes de proliferación. En suma, en este Capítulo se aborda la determinación de genes candidatos implicados en procesos de proliferación celular cuya expresión, presumiblemente, esté controlada, al menos en parte, por la metilación del ADN.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.

Las suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* (Columbia O) se obtuvieron según el protocolo descrito por Mathur et al. (1998). Las células se mantuvieron en medio de crecimiento Murashige & Skoog (1962) a pH 5.8, complementado con 3% (p/v) sacarosa, 0,5 mg L ácido naftalenacético y 0.05 mgL kinetina. Los cultivos celulares se mantuvieron en agitación (110 rpm) en recipientes Erlenmeyer de 250 ml en cámara de crecimiento a 22 °C, con fotoperiodo de 16 horas de luz fría. Cada 7 días una cuarta parte del cultivo se diluyó en 3 volúmenes de medio fresco hasta alcanzar un volumen final de 120 ml.

6.2.2. Tratamiento de cultivos celulares con 5-Aza 2'-deoxicitidina.

El tratamiento demetilante se aplicó tres días después de cada subcultivo mediante adición de 5-Aza 2'-deoxicitidina 5 µM (Aza-dC). El tratamiento control se realizó mediante la adición de agua a las cultivos celulares. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. La extracción del ADN genómico y del ARN total se realizó a partir de 100 mg de células, 96 h después de la aplicación de Aza-dC mediante procedimientos estándar.

6.2.3. Análisis de la expresión génica mediante microarrays (GeneChip® de Affymetrix®).

El ARN total fue sometido a tratamiento con TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, California) y purificado mediante el empleo de columnas Rneasy (Qiagen, GMBH), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ARN purificado fue estimada mediante análisis de una alícuota (1 µl) en un gel denaturalizante de agarosa en 1X MOPS. El ARNc biotinilado se sintetizó a partir de 5 µg de ARN total de cada muestra siguiendo el protocolo del manual de Affymetrix. Los ADNc de doble cadena se prepararon a partir de ARN templado empleando un cebador oligo-dT que contiene la

secuencia promotora de la 5' T7 ARN polimerasa incluido en el Kit SuperScript Choice System (Invitrogen, Carlsberg, California). A partir de este ADNc se sintetizó ARNc mediante una reacción de transcripción *in vitro*, empleándose el Kit GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, Santa Clara, California) para la recuperación del ARNc biotinilado. Una vez purificado, el ARNc biotinilado fue fragmentado e hibridado con aproximadamente 22500 transcritos en el GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome array (Affymetrix, Santa Clara, California). Las reacciones de hibridación fueron procesadas y escaneadas de acuerdo a los protocolos estandar de Affymetrix. La estimación del factor de escalado, del ruido y los porcentajes de la intensidad de la señal fueron calculados de acuerdo con los protocolos de Affymetrix Data Mining Tool (Affymetrix, Santa Clara, California). El conjunto de datos fue seleccionado manejando valores métricos absolutos (presente o ausente) en el software informático Microsoft Access (Microsoft Corporation, Redmond, Washington). La selección de genes cuya expresión varía tras la aplicación de Aza-dC se realizó en base al análisis de los p-valores en procedimientos estadísticos ANOVA de múltiple comparación. Paralelamente se compararon los perfiles de expresión de los controles y de los tratamientos con Aza-dC mediante representaciones gráficas de dispersión de las distintas secuencias génicas contenidas en el array.

6.2.4. Cuantificación de la metilación global del ADN genómico mediante HPCE.

La estimación de la metilación global del ADN se realizó mediante la cuantificación de los niveles de 5-mdC por HPCE, tal y como se describió en el Capítulo 2 (Apartado 2.1).

6.2.5. Metilación en dinucleótidos CpG (ensayo de actividad de SssI metilasa).

La digestión completa de 2 µg de ADN genómico se realizó mediante incubación con el enzima de restricción *Xba* I (30 U/µg) durante 2 h a 37 °C, en presencia de los tampones suministrados por el fabricante (Takara Bio Inc, Japan). El ADN fragmentado fue purificado mediante el empleo del kit Phase Lock Gel™ Light (Eppendorf AG, Germany), precipitado con etanol y resuspendido en agua a una

concentración de 0.05 µg/µl. Las digestiones con *SssI* metilasa (*CpG methylase*, New England BioLabs® Inc) fueron realizadas por triplicado en un volumen total de 21 µl, conteniendo: 0.25 µg de ADN fragmentado, 8 U *SssI* metilasa, 2 µM [³H]-SAM (S-adenosyl-L- [methyl-³H] methionine, 15 Ci/mmol, Amersham Biosciences), 1 ηM Tris-HCl pH 8.0 , 10X tampón NEB suministrado con el enzima (New England BioLabs® Inc) y 6 µl de agua destilada. Paralelamente, se realizaron digestiones con *dam* metilasa (New England BioLabs® Inc), también en un volumen total de 21 µl, conteniendo: 0.25 µg de ADN fragmentado, 12 U *dam* metilasa, 2 µM [³H]-SAM (S-adenosyl-L- [methyl-³H] methionine, 15 Ci/mmol, Amersham Biosciences), 10X tampón NEB suministrado con el enzima (New England BioLabs® Inc) y 6.5 µl de agua destilada. Ambas mezclas de reacción fueron incubadas durante 4 h a 37 °C, deteniéndose la reacción mediante choque térmico a 80 °C durante 20 min. El ADN digerido, precipitado mediante protocolos convencionales de etanol y resuspendido en 10 µl de agua destilada, se recogió sobre papel Whatman 17 Chr y se introdujo en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo (Ready Safe scintillation mixture, Beckman). Como control se empleó una reacción conteniendo agua destilada. Los valores de metilación en islas CpG fueron extrapolados a partir de los datos obtenidos en el contador de centelleo, mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CpG metiladas} = [1 - (\text{ratio } s/d / 3.2)] \times 100 , \text{ siendo}$$

ratio *s/d*= valor DPM obtenido para la digestión con *SssI* metilasa / valor DPM obtenido para la digestión con *dam* metilasa.

6.3. RESULTADOS.

6.3.1. Efecto de Aza-dC sobre las tasas de proliferación de suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana*.

La incubación de las suspensiones celulares de *A. thaliana* con 5 μ M Aza-dC durante 96 h indujo un descenso de la tasa de proliferación celular. El peso fresco estimado para células control fue de 38.56 g /200 ml, mientras que en las células tratadas con Aza-dC fue de 29.67 g /200 ml.

6.3.2. Hipometilación global del ADN genómico inducida por tratamiento con Aza-dC.

El tratamiento con 5 μ M Aza-dC durante 96 h promovió un descenso de los niveles de metilación global en células tratadas de *A. thaliana*. El porcentaje de 5-mdC genómica total cuantificado por HPCE para suspensiones celulares control fue de 5.89 ± 0.45 , mientras que el porcentaje de metilación en células tratadas se estimó en 2.93 ± 0.33 (Figura 6.1a).

Los resultados obtenidos en el ensayo *SssI* metilasa ponen de manifiesto que un 66% de las secuencias CpG presentes en el genoma de células control se encuentra metiladas, mientras que en células tratadas solo un 54% de los dinucleótidos CpG contienen citosinas metiladas (Figura 6.1b).

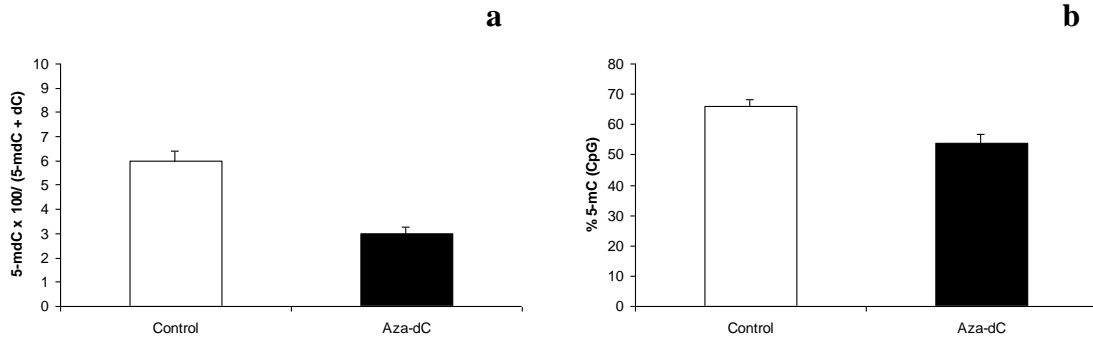


Figura 6.1. a) Porcentajes relativos de metilación global del ADN genómico cuantificados mediante HPCE en suspensiones celulares de *A. thaliana* mantenidas en medios de crecimiento control y en medios con agente demetilante (Aza-dC 5 μ M). b) Porcentajes de 5-metilcitosina (5-mC) en dinucleótidos CpG cuantificados en el ensayo de SssI metilasa en suspensiones celulares control y tratadas.

6.3.3. Determinación mediante microarrays de los cambios en los niveles de expresión génica.

El tratamiento con el inhibidor de la metilación de citosinas Aza-dC afecta a la expresión de 313 genes variando sus niveles en, al menos, 2 veces su expresión normal (*Signal Low Ratio* (S.L.R.) ≥ 1). El número de genes cuya expresión cambia en respuesta a la inducción con Aza-dC supone un 2% del total de genes analizados en el array. Si aumentamos el nivel de significación del cambio (S.L.R. ≥ 2), encontramos que 41 secuencias se encuentran sobreexpresadas en células tratadas con Aza-dC frente a las células no tratadas (Figura 6.2a), mientras que solo 14 secuencias se encuentran reprimidas tras el tratamiento con la droga demetilante (Figura 6.2a). Esto supone que, bajo este valor de tasa de cambio, el número de genes cuya expresión aumenta tras el tratamiento con Aza-dC se triplica respecto a los genes cuyos niveles de expresión disminuyen (75% frente al 25%, respectivamente). En la Figura 6.2b se representa la gráfica de dispersión (*Scatter graph*) que permitió corroborar la consistencia de los datos obtenidos, ya que se observó una distribución normal en forma de cohete (“*rocket layout*”) en la que un alto porcentaje de genes están expresándose a niveles muy bajos

y, a medida que aumenta la señal de expresión, el número de transcritos baja de forma exponencial.

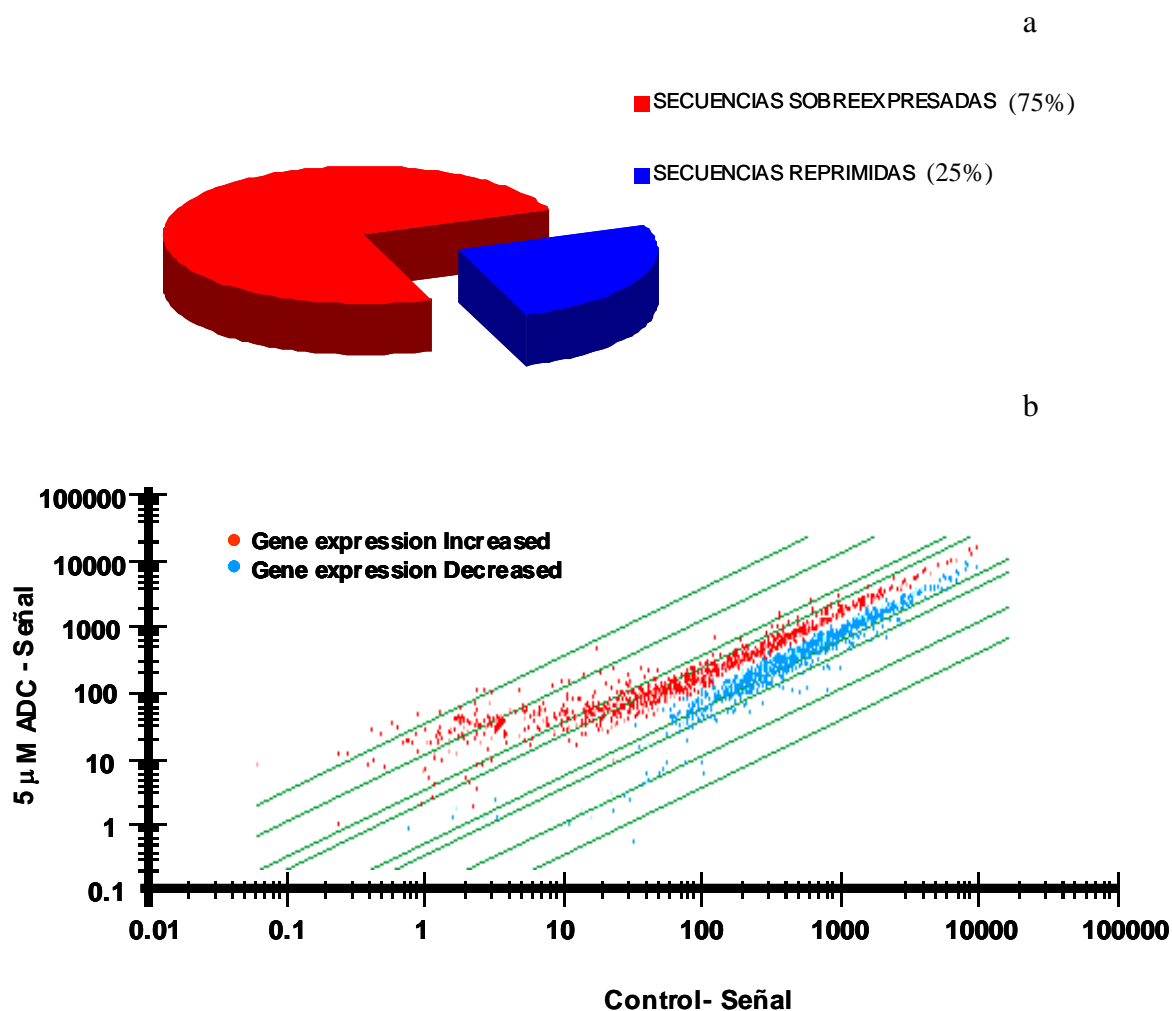


Figura 6.2. **a)** Porcentajes de secuencias sobreexpresadas (rojo) frente a las secuencias reprimidas (azul) tras el tratamiento con 5 μ M Aza-dC. **b)** Representación gráfica de la dispersión de los datos obtenidos en el microarray en escala logarítmica. Los puntos rojos se corresponden con los valores de señal obtenidos para sondas sobreexpresadas. Los puntos azules con los valores de señal de sondas reprimidas. Las líneas verdes se corresponden con las tasas de cambio, siendo las más externas las representativas de cambios de expresión mayores. En el eje de abscisas se representan los valores de señal del control, mientras que en el eje de ordenadas se representan los valores obtenidos para las muestras tratadas con Aza-dC.

La demetilación inducida por tratamiento con Aza-dC afecta preferentemente a familias proteicas concretas (Figura 6.3).

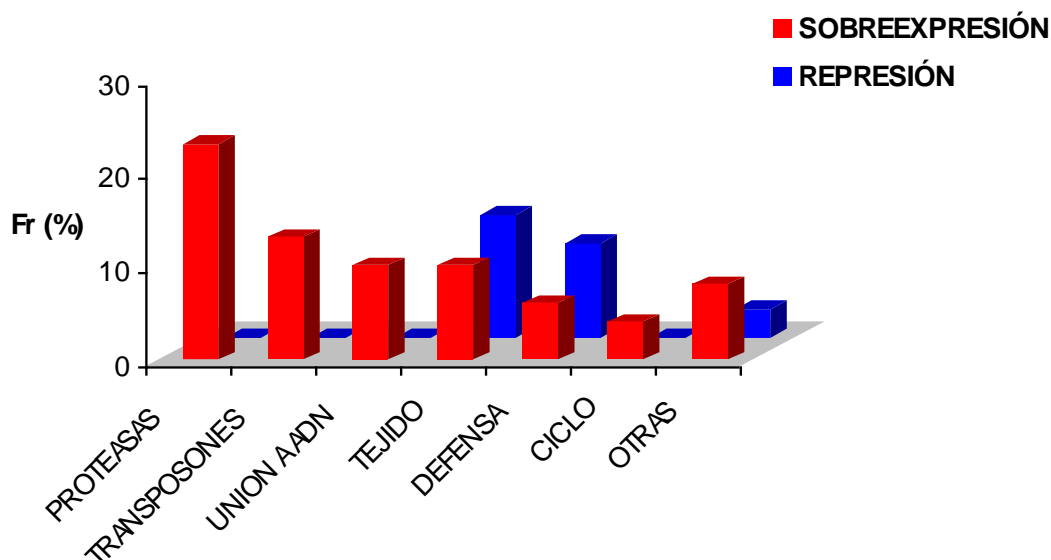


Figura 6.3. Secuencias génicas cuyos niveles de expresión varían tras el tratamiento con Aza-dC (S.L.R. ≥ 2) agrupadas por categorías funcionales. En el eje de categorías se recogen las siguientes categorías: proteasas (Ulp1 proteasas); transposones (CACTA-like); proteínas de unión al ADN (dominios de unión bHLH, zinc-finger, WD-40, entre otras); proteínas específicas de tejido; componentes del sistema de defensa; proteínas que intervienen en el ciclo celular y proteínas pertenecientes a otras categorías con representación minoritaria. En el eje de series se representan las secuencias que se sobreexpresan (barras rojas) y las secuencias génicas cuyos niveles de expresión son reprimidos (barras azules). En el eje de valores se recogen los datos numéricos (%) correspondientes a la frecuencia relativa (Fr) de cada categoría en relación con el número de secuencias génicas totales con cambios de expresión (sobreexpresadas y reprimidas).

De entre las 41 secuencias sobreexpresadas, 35 se corresponden con genes de copia única y 6 a elementos repetitivos del genoma (transposones). De entre las secuencias de copia única las más afectadas se corresponden con actividades proteasas, seguida de proteínas con dominios de unión al ADN y secuencias codificantes de genes específicos de tejido. Con menor frecuencia se encuentran sobreexpresadas proteínas relacionadas con mecanismos de defensa y de detoxificación, así como elementos del ciclo celular y, en general, de proliferación celular. Por sus mayores cambios de expresión caben destacar las siguientes secuencias génicas:

- Proteasas. Todas se corresponden con Ulp1 proteasas (*Ubiquitin-like protein*; At2g15140, At1g35650, At2g14130, At2g02210, At3g47260, At3g29210, At4g04010, At1g32840, At3g30440, At3g44500).
- Transposones. Todos contienen elementos CACTA (*CACTA-like transposase family*; At1g43840, At2g13160, At2g12980).
- Proteínas de unión al ADN, tales como bromodominios (*DNA-binding bromodomain-containing protein*; At1g58025), dedos de zinc (*zinc-finger (CCCH-type) family protein*; At1g68200), repeticiones WD-40 (At5g24520, At4g02660) o dominios de unión a la doble hélice (*basic helix-loop-helix (bHLH) family proteins*; At1g73830).
- Proteínas específicas de tejido. Entre ellas, componentes del fotosistema (*Oxygen evolving enhancer 3 (PsbQ)*; At3g01440) o proteínas F-box (At2g02300, At1g49790).
- Proteínas de defensa/detoxificación, tales como elementos con dominios TIR (*Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein*; At5g44910), kinasas (At3g20480) o enzimas de detoxificación vacuolares (*Alpha-VPE*; At2g25940).
- Elementos relacionados con ciclo celular. Entre ellos genes relacionados con proliferación de meristemos (*CLAVATA1 receptor kinase*; At1g08590), Glutation-S-transferasa (GST5, At1g02940), proteínas con dominios SET (*SUVH8*; At2g24740), ciclinas mitóticas

(*CYCB1*, At4g37490) o proteínas de control del ciclo celular (*CDC6b*, At1g07270).

- Otras categorías con menor representación, donde se incluyen enzimas dioxigenasas (At2g44990), proteínas de transporte (At4g24570) o secuencias de función desconocida (At2g20500, At3g01960).

En la Tabla Suplementaria 6.1 se recogen en detalle las secuencias génicas cuya expresión se ve reactivada, al menos duplicando la expresión respecto al control (S.L.R. ≥ 1), tras tratamiento con Aza-dC.

Por el contrario, la represión génica inducida por demetilación tan solo afecta a dos categorías funcionales (Figura 6.3) correspondientes a genes específicos de tejido y proteínas de sistemas de defensa/detoxificación. Como se puede observar en la Tabla Suplementaria 6.2, cabe destacar que no aparecen reprimidas proteínas con actividad proteasa, elementos transposables del genoma o proteínas de ciclo celular. Las secuencias cuya expresión se ve más reducida tras el tratamiento con Aza-dC codifican las siguientes proteínas:

- Proteínas específicas de tejido, principalmente componentes del fotosistema (At4g13770, At3g14440, At4g10500) o proteínas implicadas en la síntesis de la pared celular (At1g21310, At5g44400).
- Elementos de defensa/detoxificación, entre ellos hidrolasas (At3g57260), proteínas de resistencia a ataque de patógenos (At3g05660, At2g02120), inhibidores de tripsina (At2g43535) o peroxidasas (At4g36430).

6.4. DISCUSIÓN.

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético de control de la expresión génica (Bird et al., 1981; Cedar & Razin, 1990; Neves et al., 1995; Jacobsen & Meyerowitz, 1997; Finnegan et al., 1998), de modo que la metilación de citosinas en islas CpG localizadas en los promotores del 60% de los genes está directamente asociada a la represión de estos genes (Cubas et al., 1999; Wolffe & Matzke, 1999; Kaeppler et al., 2000). Por tanto, es factible que la reactivación de genes en suspensiones celulares de *A. thaliana* tratadas con Aza-dC se deba a la demetilación selectiva de sus promotores, permitiéndose así la expresión de dichos genes. Desde este punto de vista se entiende que el tratamiento de suspensiones celulares de *A. thaliana* con Aza-dC produzca reactivación génica en mayor grado que represión selectiva de genes (3:1, respectivamente).

Ahora bien, el porcentaje de secuencias génicas reactivadas tras tratamiento con Aza-dC resultó muy inferior al descrito para el mismo tratamiento en células animales (Yamashita et al., 2002). Este comportamiento diferencial puede ser debido a que las condiciones del tratamiento, en términos de concentración y tiempo de exposición, no se encuentran totalmente optimizadas. Aunque no se debe descartar que el porcentaje de genes regulados por metilación de sus promotores en plantas sea inferior al de animales.

Mientras que los niveles de citosinas totales en el genoma de suspensiones celulares tratadas con Aza-dC, cuantificados por HPCE, descienden a la mitad con respecto a los cultivos control, la reducción de dinucleótidos CpG metilados fue solo del 21.2%. En animales, la mayor parte de las citosinas metiladas se encuentran en el contexto del dinucleótido CpG. Sin embargo, en plantas es frecuente encontrar citosinas metiladas en otras secuencias, tales como trinucleótidos CpNpG o en secuencias no simétricas (Meyer et al., 1994; Martienssen & Colot, 2001; Okamoto & Hirochika, 2001; Bird 2002; Rabinowicz, 2003). En conjunto, los resultados de HPCE y SssI indican que la pérdida de 5-mC en los tratamientos de suspensiones celulares de *A. thaliana* con Aza-dC ocurren mayoritariamente en dianas diferentes a CpG.

Como era de esperar, la demetilación mediante Aza-dC provoca la reactivación de numerosos transposones (CACTA-like), datos que concuerdan con la mayor

demetilación de secuencias CpNpG y con el hecho de que la mayor parte de las citosinas metiladas (> 45%) se encuentren en secuencias repetitivas (San Miguel et al., 1996).

El descenso en las tasas de crecimiento de los cultivos tratados con Aza-dC puede estar generado, al menos en parte, por la pérdida de represión de la movilidad de los transposones ejercida por la metilación del ADN (Hirochika et al., 2000; Miura et al., 2001; Zhou et al., 2001). Si se descontrola el silenciamiento génico de los transposones, puede producirse inserciones de los mismos en regiones cromosómicas codificantes e interrumpir las pautas de transcripción de genes específicos (Bureau & Wessler, 1994; Kumpatla et al., 1997). Reducciones en las tasas de crecimiento y proliferación celular, animal y vegetal, asociadas a procesos de demetilación inducida por tratamientos drásticos con agentes químicos ya han sido descritas (Adams et al., 1982; Murfett et al., 2001), consecuencias que no pueden ser atribuidas a los procesos de demetilación “fisiológica” observada, por ejemplo, en situaciones de revigorización.

El tratamiento con Aza-dC supuso la reactivación de numerosos genes específicos de tejido. Entre estos destaca la familia de las “Ulp1 proteasas” que catalizan dos reacciones críticas en la vía de actuación del complejo SUMO/Smt3 (Hotson et al., 2003; Innes, 2003) y que regulan la proteólisis de proteínas implicadas en transporte nuclear, transducción de señales, progresión del ciclo celular y respuesta al estrés (Melchoir, 2000; Stevenson et al., 2001). Esta familia de proteasas también está implicada en la regulación de genes supresores de tumores y oncogenes.

Los genes que resultan reprimidos tras el tratamiento de Aza-dC, principalmente genes de defensa/detoxificación, se corresponden con familias de proteínas en las que otros componentes también resultan sobreexpresados. Estos resultados parecen indicar que las variaciones de expresión de estos genes está inducidas más por el propio efecto de estrés al que se someten las células que por cambios en las pautas de metilación.

Debido a su implicación en los procesos de proliferación celular, las secuencias codificantes de proteínas de ciclo celular o proteínas de unión al ADN y que resultan reactivadas con Aza-dC, son analizadas en profundidad en el Capítulo 7 de la presente Tesis Doctoral.

GENE ID	AGI	S.L.R.	ANNOTATION
At3g01440	AT3G01440	5,2	oxygen evolving enhancer 3 (PsbQ) family protein
At1g73270	AT1G73270	4,9	serine carboxypeptidase S10 family protein
At1g43840	AT1G34530	4,7	CACTA-like transposase family (Ptta/En/Spm)
At5g25280	AT5G25280	4,6	serine-rich protein-related
At5g24520	AT5G24520	4,5	transparent testa glabra 1 protein (TTG1)
At2g15140	AT4G04010	4,2	Ulp1 protease family protein
At2g02300	AT2G02300	4,1	F-box family protein / SKP1 interacting partner 3-related
At2g13160	AT1G34530	4,1	CACTA-like transposase family (Ptta/En/Spm)
At1g35650	AT1G35650	4,1	Ulp1 protease family protein
At2g12980	AT1G36260	3,9	CACTA-like transposase family (Ptta/En/Spm)
At2g14130	AT4G04010	3,8	Ulp1 protease family protein
At2g02210	AT4G04010	3,6	Ulp1 protease family protein
At2g44990	AT2G44990	3,6	dioxygenase-related
At1g36190	AT3G32230	3,4	CACTA-like transposase family (Ptta/En/Spm)
At1g58025	AT1G58025	3,4	DNA-binding bromodomain-containing protein
At1g28030	AT1G28030	3,2	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
At2g20500	AT2G20500	3,1	expressed protein
At2g04480	AT2G04480	3,1	hypothetical protein
At5g44910	AT5G44910	3,1	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain-containing protein
At2g13870	AT2G13870	2,9	CACTA-like transposase family (Ptta/En/Spm)
At1g08590	AT1G08590	2,8	CLAVATA1 receptor kinase (CLV1)
At1g33130	AT1G43840	2,6	CACTA-like transposase family (Ptta/En/Spm)
At3g01960	AT3G01960	2,6	expressed protein
At1g35880	AT1G35880	2,6	hypothetical protein
At3g45490	AT3G45490	2,6	hypothetical protein
At3g47260	AT4G04010	2,6	Ulp1 protease family protein
At3g29210	AT4G04010	2,5	Ulp1 protease family protein
At4g04010	AT4G04010	2,5	Ulp1 protease family protein
At5g35050	AT5G35050	2,3	pseudogene, hypothetical protein
At4g25330	AT4G25330	2,3	expressed protein
At1g32840	AT4G04010	2,3	Ulp1 protease family protein
At4g02660	AT4G02660	2,3	WD-40 repeat family protein / beige-related
At5g06630	AT2G24980	2,3	proline-rich extensin-like family protein
At3g30440	AT4G04010	2,2	Ulp1 protease family protein
At1g68200	AT1G68200	2,1	zinc finger (CCCH-type) family protein
At1g49790	AT1G49790	2,1	F-box family protein-related
At3g20480	AT3G20480	2,1	tetraacyldisaccharide 4'-kinase family protein
At1g73830	AT1G73830	2,1	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
At2g25940	AT2G25940	2	vacuolar processing enzyme alpha / alpha-VPE
At3g44500	AT4G04010	2	Ulp1 protease family protein
At5g34830	AT5G34830	2	expressed protein
At2g04980	AT4G04010	1,9	Ulp1 protease family protein
At3g05950	AT3G05950	1,9	germin-like protein, putative
At3g31320	AT3G31320	1,9	hypothetical protein
At1g33080	AT1G33080	1,9	MATE efflux family protein
At4g24570	AT4G24570	1,8	mitochondrial substrate carrier family protein
At4g27652	AT4G27652	1,8	expressed protein
At1g02940	AT1G02940	1,8	glutathione S-transferase, putative

At3g63060	AT3G63060	1,8	circadian clock coupling factor, putative
At3g47330	AT2G23710	1,8	hypothetical protein
At1g49150	AT1G49150	1,7	hypothetical protein
At4g27654	AT4G27654	1,7	expressed protein
At2g47140	AT2G47140	1,7	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
At1g06580	AT1G06580	1,7	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
At5g25140	AT5G25140	1,7	cytochrome P450 family protein
At4g21070	AT4G21070	1,6	BRCT domain-containing protein (BRCA1)
At3g44260	AT3G44260	1,6	CCR4-NOT transcription complex protein, putative
At3g21600	AT3G21600	1,6	senescence/dehydration-associated protein-related
At3g14640	AT3G14640	1,6	cytochrome P450, putative
At5g66590	AT5G66590	1,6	allergen V5/Tpx-1-related family protein
At1g66400	AT1G66400	1,5	calmodulin-related protein, putative
At4g29780	AT4G29780	1,5	expressed protein
At1g76740	AT1G76740	1,5	expressed protein
At5g26080	AT5G26080	1,5	proline-rich family protein
At1g22590	AT1G22590	1,5	MADS-box family protein
At5g34900	AT4G04010	1,5	Ulp1 protease family protein
At3g06280	AT3G06280	1,5	hypothetical protein
At4g33666	AT4G33670	1,5	L-galactose dehydrogenase (L-GalDH)
At1g32570	AT1G32570	1,4	hypothetical protein
At2g30020	AT2G30020	1,4	protein phosphatase 2C, putative
At1g51310	AT1G51310	1,4	tRNA methyl transferase family protein
At3g07800	AT3G07800	1,4	thymidine kinase, putative
At3g31955	AT3G42720	1,4	CACTA-like transposase family (Ptta/En/Spm)
At4g29170	AT4G29170	1,4	Mnd1 family protein
At2g13940	AT2G13940	1,4	copia-like retrotransposon family
At2g04750	AT2G04750	1,4	fimbrin-like protein, putative
At2g06430	AT4G04010	1,4	Ulp1 protease family protein
At1g07270	AT1G07270	1,4	cell division control protein CDC6b, putative (CDC6b)
At1g20310	AT1G20310	1,4	expressed protein
At3g60390	AT3G60390	1,4	homeobox-leucine zipper protein 3 (HAT3)
At5g14210	AT5G14210	1,4	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
At5g64550	AT5G64550	1,4	loricrin-related
At1g72800	AT1G72800	1,4	nuM1-related
At2g19960	AT2G19960	1,3	hAT dimerisation domain-containing protein
At1g03920	AT1G03920	1,3	protein kinase, putative
At2g18870	AT2G18876	1,3	expressed protein /// hypothetical protein
At1g63530	AT1G63530	1,3	hypothetical protein
At1g07610	AT1G07610	1,3	metallothionein-like protein 1C (MT-1C)
At1g05805	AT1G05805	1,3	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
At1g44060	AT3G30765	1,3	CACTA-like transposase family (Ptta/En/Spm)
At5g17350	AT5G17350	1,3	expressed protein
At3g27730	AT3G27730	1,3	ATP-dependent DNA helicase, putative
At1g64590	AT1G64590	1,3	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
At3g17130	AT3G17130	1,3	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein
At4g04500	AT4G04500	1,3	protein kinase family protein
At4g29560	AT4G29560	1,3	expressed protein
At4g39500	AT4G39500	1,3	cytochrome P450, putative
At5g39860	AT5G39860	1,3	bHLH protein
At3g09160	AT3G09160	1,3	RNA recognition motif (RRM)-containing protein

At3g04200	AT3G04200	1,3	germin-like protein, putative
At2g18530	AT2G18530	1,2	protein kinase family protein
At1g10070	AT1G10070	1,2	branched-chain amino acid aminotransferase 2 (BCAT2)
At2g25250	AT2G25250	1,2	expressed protein
At1g15180	AT1G15180	1,2	MATE efflux family protein
At1g15010	AT1G15010	1,2	expressed protein
At1g63080	AT1G63080	1,2	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
At3g23080	AT3G23080	1,2	expressed protein
At5g03780	AT5G03780	1,2	expressed protein
At5g22250	AT5G22250	1,2	CCR4-NOT transcription complex protein, putative
At5g57510	AT5G57510	1,2	hypothetical protein
At5g64905	AT5G64905	1,2	expressed protein
At1g35730	AT1G35730	1,2	pumilio/Puf RNA-binding domain-containing protein
At1g69610	AT1G69610	1,2	expressed protein
At4g30450	AT4G30450	1,2	glycine-rich protein
At2g44590	AT2G44590	1,2	dynammin-like protein D (DL1D)
At2g47780	AT2G47780	1,2	rubber elongation factor (REF) protein-related
At2g47770	AT2G47770	1,2	benzodiazepine receptor-related
At2g18680	AT2G18680	1,2	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
At3g18560	AT3G18560	1,2	expressed protein
At4g28960	AT2G23710	1,2	hypothetical protein
At4g37900	AT4G37900	1,2	glycine-rich protein
At3g56330	AT3G56330	1,2	N2,N2-dimethylguanosine tRNA methyltransferase family protein
At3g60570	AT3G60570	1,2	beta-expansin, putative (EXPB5)
At5g36000	AT5G36000	1,2	expressed protein
At5g62230	AT5G62230	1,2	leucine-rich repeat family protein
At5g25810	AT5G25810	1,2	AP2 domain-containing transcription factor TINY (TINY)
At1g09750	AT1G09750	1,2	chloroplast nucleoid DNA-binding protein-related
At5g54420	AT5G54420	1,2	hypothetical protein
At2g35460	AT2G35460	1,1	harpin-induced family protein
At1g16220	AT1G16220	1,1	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family protein
At1g71770	AT1G71770	1,1	polyadenylate-binding protein 5 (PABP5)
At1g74150	AT1G74150	1,1	kelch repeat-containing protein
At3g25890	AT3G25890	1,1	AP2 domain-containing transcription factor, putative
At3g27060	AT3G27060	1,1	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain
At4g10580	AT1G42320	1,1	gypsy-like retrotransposon family
At5g01080	AT5G01080	1,1	hypothetical protein
At5g24410	AT5G24410	1,1	glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related
At5g48170	AT5G48170	1,1	F-box family protein
At1g73540	AT1G73540	1,1	MutT/nudix family protein
At1g07390	AT1G07390	1,1	leucine-rich repeat family protein
At2g41210	AT2G41210	1,1	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase family protein
At1g51210	AT1G51210	1,1	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
At1g15580	AT1G15580	1,1	auxin-responsive protein (IAA5) (AUX2-27)
At3g25830	AT3G25820	1,1	myrcene/ocimene synthase, putative
At1g20750	AT1G20750	1,1	helicase-related
At3g60160	AT3G60160	1,1	ABC transporter family protein
At5g36120	AT5G36120	1,1	YGGT family protein
At5g52740	AT5G52740	1,1	heavy-metal-associated domain-containing protein
At4g36880	AT4G36880	1,1	cysteine proteinase, putative
At4g01450	AT4G01450	1,1	nodulin MtN21 family protein

At5g52975	AT5G52975	1,1	expressed protein
At2g18700	AT2G18700	1	glycosyl transferase family 20 protein
At2g18590	AT2G18590	1	transporter-related
At1g24520	AT1G24520	1	anther-specific protein agp1
At1g09380	AT1G09380	1	integral membrane family protein / nodulin MtN21-related
At1g04150	AT1G04150	1	C2 domain-containing protein
At1g02050	AT1G02050	1	chalcone and stilbene synthase family protein
At2g24740	AT1G17770	1	SET domain-containing protein (SUVH7) (SUVH8)
At1g64770	AT1G64770	1	expressed protein
At1g20180	AT1G20180	1	hypothetical protein
At1g11070	AT1G11070	1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
At1g52910	AT1G52910	1	expressed protein
At1g42980	AT1G42980	1	formin homology 2 domain-containing protein
At3g15450	AT3G15450	1	expressed protein
At3g15210	AT3G15210	1	ethylene-responsive element-binding factor 4 (ERF4)
At4g05640	AT4G06564	1	gypsy-like retrotransposon family (Athila)
At4g20120	AT4G20130	1	ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase
At4g22960	AT4G22960	1	hypothetical protein
At4g37490	AT4G37490	1	G2/mitotic-specific cyclin (CYC1) / B-like cyclin (CYC1)
At4g37610	AT4G37610	1	TAZ zinc finger family protein
At3g47340	AT3G47340	1	asparagine synthetase 1 (glutamine-hydrolyzing) (ASN1)
At5g07570	AT5G07570	1	glycine/proline-rich protein
At5g42380	AT5G42380	1	calmodulin-related protein, putative
At5g47950	AT5G47950	1	transferase family protein
At5g51390	AT5G51390	1	expressed protein
At5g59340	AT5G59340	1	homeobox-leucine zipper transcription factor family protein
At5g28770	AT5G28770	1	bZIP transcription factor family protein
At4g14970	AT4G14970	1	hypothetical protein
At2g25510	AT2G25510	1	expressed protein
At2g16110	AT2G16110	1	putative AP endonuclease/reverse transcriptase
At3g11150	AT3G11150	1	expressed protein
At3g29500	AT5G25615	1	copia-like retrotransposon family
At4g27657	AT4G27657	1	expressed protein
At3g42140	AT3G42140	1	hypothetical protein
At3g42820	AT3G42820	1	hypothetical protein
At5g07620	AT5G07620	1	protein kinase family protein
At5g12910	AT5G12910	1	histone H3, putative
At5g14340	AT5G14340	1	myb family transcription factor (MYB40)
At5g39610	AT5G39610	1	no apical meristem (NAM) family protein

Tabla Suplementaria 6.1. Lista parcial de genes de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresados tras tratamiento con 5'- Aza 2' deoxicidina (Aza-dC). AGI: número de acceso de la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*); Gene ID: número de acceso de la secuencia nucleotídica; S.L.R: (*Signal Log Ratio*) cambio en el nivel de expresión del transcrito en la muestra tratada con Aza-dC respecto a la muestra control estimada en Genechip® by Affymetryx®..

GENE ID	AGI	S.L.R.	DESCRIPCIÓN
At1g21310	AT1G21310	-4,2	proline-rich extensin-like family protein
At1g62540	AT1G62540	-3,4	flavin-containing monooxygenase family protein / FMO family protein
At4g13770	AT4G13770	-3,4	cytochrome P450 family protein
At3g57260	AT3G57260	-3,3	glycosyl hydrolase family 17 protein
At3g05660	AT3G05660	-3,2	disease resistance family protein
At3g19710	AT3G19710	-2,7	branched-chain amino acid aminotransferase, putative(BCAT4)
At3g14440	AT3G14440	-2,7	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, putative
At4g34950	AT4G34950	-2,6	nodulin family protein
At2g02120	AT2G02120	-2,5	plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.1)
At2g43535	AT2G43535	-2,2	trypsin inhibitor, putative
At4g10500	AT4G10500	-2	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
At5g44400	AT5G44400	-2	FAD-binding domain-containing protein
At4g36430	AT4G36430	-2	peroxidase, putative
At1g05770	AT1G05770	-2	jacalin lectin family protein
At2g43530	---	-1,9	---
At3g49120	AT3G49110	-1,9	peroxidase 33 (PER33) (P33) (PRXCA) / neutral peroxidase C (PERC)
At1g76430	AT1G76430	-1,9	phosphate transporter family protein
At5g22570	AT5G22570	-1,8	WRKY family transcription factor
At5g14920	AT5G14920	-1,8	gibberellin-regulated family protein
At4g39510	AT4G39510	-1,8	cytochrome P450 family protein
At3g21770	AT3G21770	-1,7	peroxidase 30 (PER30) (P30) (PRXR9)
At5g60950	AT5G60950	-1,7	phytochelatin synthetase-related
At2g34810	AT2G34810	-1,6	FAD-binding domain-containing protein
At2g18660	AT2G18660	-1,6	expansin family protein (EXPR3)
At1g76930	AT1G76930	-1,6	proline-rich extensin-like family protein
At2g38540	AT2G38540	-1,6	nonspecific lipid transfer protein 1 (LTP1)
At2g46650	AT2G46650	-1,6	cytochrome b5, putative
At2g39700	AT2G39700	-1,5	expansin, putative (EXP4)
At1g55210	AT1G55210	-1,5	disease resistance response protein-related/ dirigent protein-related
At4g12880	AT4G12880	-1,5	plastocyanin-like domain-containing protein
At3g47480	AT3G47480	-1,5	calcium-binding EF hand family protein
At5g04080	AT5G04080	-1,5	expressed protein
At5g53370	AT5G53370	-1,5	pectinesterase family protein
At5g62350	AT5G62350	-1,5	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein (FL5-2I22)
At5g64000	AT5G64000	-1,5	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase, putative
At1g75110	AT1G75110	-1,5	expressed protein
At1g76040	AT1G76040	-1,4	calcium-dependent protein kinase, putative / CDPK, putative
At1g68290	AT1G68290	-1,4	bifunctional nuclease, putative
At4g39030	AT4G39030	-1,4	enhanced disease susceptibility 5 (EDS5) / salicylic acid deficient 1 (SID1)
At3g46280	AT3G46280	-1,4	protein kinase-related
At3g51450	AT3G51450	-1,4	strictosidine synthase family protein
At5g44380	AT5G44380	-1,4	FAD-binding domain-containing protein
At1g44130	AT1G44130	-1,4	nucellin protein, putative
At2g35860	AT2G35860	-1,4	beta-Ig-H3 domain-containing protein / fasciclin domain-protein
At3g21620	AT3G21620	-1,4	early-responsive to dehydration protein-related / ERD protein-related
At2g23300	AT2G23300	-1,4	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
At1g28400	AT1G28400	-1,3	expressed protein
At2g43620	AT2G43620	-1,3	chitinase, putative

At3g14570	AT3G14570	-1,3	glycosyl transferase family 48 protein
At4g29260	AT4G29260	-1,3	acid phosphatase class B family protein
At3g43720	AT3G43720	-1,3	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At3g50570	---	-1,3	---
At3g61820	AT3G61820	-1,3	aspartyl protease family protein
At5g39720	AT5G39720	-1,3	avirulence-responsive / avirulence induced gene (AIG) protein-related
At1g56600	AT1G56600	-1,3	galactinol synthase, putative
At4g14010	AT4G14010	-1,3	rapid alkalization factor (RALF) family protein
At1g05610	AT1G05610	-1,3	glucose-1-phosphate adenyltransferase, putative (APS2)
At5g22460	AT5G22460	-1,3	esterase/lipase/thioesterase family protein
At2g39210	AT2G39210	-1,2	nodulin family protein
At2g38530	AT2G38530	-1,2	nonspecific lipid transfer protein 2 (LTP2)
At1g65500	AT1G65500	-1,2	expressed protein
At2g46440	AT2G46430	-1,2	cyclic nucleotide-regulated ion channel (CNGC3) (CNGC11)
At1g78060	AT1G78060	-1,2	glycosyl hydrolase family 3 protein
At1g80240	AT1G80240	-1,2	expressed protein
At1g71695	AT1G71695	-1,2	peroxidase 12 (PER12) (P12) (PRXR6)
At1g41830	AT1G41830	-1,2	multi-copper oxidase type I family protein
At1g69930	AT1G69930	-1,2	glutathione S-transferase, putative
At4g27730	AT4G27730	-1,2	oligopeptide transporter OPT family protein
At3g43670	AT3G43670	-1,2	copper amine oxidase, putative
At5g02780	AT5G02780	-1,2	In2-1 protein, putative
At4g14630	AT4G14630	-1,2	germin-like protein (GLP9)
At2g39350	AT2G39350	-1,1	ABC transporter family protein
At2g06050	AT2G06050	-1,1	12-oxophytodienoate reductase (OPR3) / delayed dehiscence1 (DDE1)
At2g21560	AT2G21560	-1,1	expressed protein
At1g62310	AT1G62310	-1,1	transcription factor jumonji (jnjC) domain-containing protein
At3g07540	AT3G07540	-1,1	formin homology 2 domain-containing / FH2 domain-containing protein
At1g51680	AT1G51680	-1,1	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)
At4g10280	AT4G10280	-1,1	expressed protein
At4g19390	AT4G19390	-1,1	expressed protein
At4g22730	AT4G22730	-1,1	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
At4g23670	AT4G23670	-1,1	major latex protein-related / MLP-related
At4g24780	AT4G24780	-1,1	pectate lyase family protein
At4g30020	AT4G30020	-1,1	subtilase family protein
At3g47510	AT3G47510	-1,1	expressed protein
At5g24655	AT5G24655	-1,1	expressed protein
At5g40780	AT5G40780	-1,1	lysine and histidine specific transporter, putative
At5g60470	AT5G60470	-1,1	zinc finger (C2H2 type) family protein
At5g65870	AT5G65870	-1,1	phytosulfokines 5 (PSK5)
At1g19960	AT1G19960	-1,1	expressed protein
At3g02170	AT3G02170	-1,1	expressed protein
At3g29250	AT3G29250	-1,1	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
At3g58990	AT3G58990	-1,1	aconitase C-terminal domain-containing protein
At2g26650	AT2G26650	-1	potassium channel protein 1 (AKT1)
At2g14860	AT2G14860	-1	peroxisomal membrane protein 22 kDa, putative
At2g14900	AT2G14900	-1	gibberellin-regulated family protein
At2g43100	AT2G43100	-1	aconitase C-terminal domain-containing protein
At1g68620	AT1G68620	-1	expressed protein
At1g74710	AT1G74710	-1	isochorismate synthase 1 (ICS1) / isochorismate mutase
At1g55120	AT1G55120	-1	beta-fructosidase, putative / beta-fructofuranosidase, putative
At4g10120	AT4G10120	-1	sucrose-phosphate synthase, putative

At4g18930	AT4G18930	-1	cyclic phosphodiesterase
At4g25870	AT4G25870	-1	expressed protein
At3g51440	AT3G51440	-1	strictosidine synthase family protein
At3g52500	AT3G52500	-1	aspartyl protease family protein
At3g60330	AT3G60330	-1	ATPase, plasma membrane-type, putative / proton pump, putative
At3g61200	AT3G61200	-1	thioesterase family protein
At5g03090	AT5G03090	-1	hypothetical protein
At5g10180	AT5G10180	-1	sulfate transporter
At5g10380	AT5G10380	-1	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
At5g38170	AT5G38170	-1	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At5g50790	AT5G50790	-1	nodulin MtN3 family protein
At1g51850	AT1G51850	-1	leucine-rich repeat protein kinase, putative
At4g30090	AT4G30090	-1	expressed protein
At1g30560	AT1G30560	-1	transporter, putative
At3g23610	AT3G23610	-1	dual specificity protein phosphatase (DsPTP1)
At3g28540	AT3G28540	-1	AAA-type ATPase family protein
At3g49760	AT3G49760	-1	bZIP transcription factor family protein

Tabla Suplementaria 6.2. Lista parcial de genes de *Arabidopsis thaliana* reprimidos tras tratamiento con 5'- Aza 2' deoxicidina (Aza-dC). AGI: número de acceso de la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*); Gene ID: número de acceso de la secuencia nucleotídica; S.L.R: (*Signal Log Ratio*) cambio en el nivel de expresión del transcrito en la muestra tratada con Aza-dC respecto a la muestra control estimada en Genechip® by Affymetryx®.

6.5. BIBLIOGRAFÍA.

Adams, R.L., Fulton, J. & Kirk, D. 1982. The effect of 5-azadeoxycytidine on cell growth and DNA methylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 697(3): 286-294.

Bartee, L., Malagnac, F. & Bender, J. 2001. *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes & Development* 15: 1753-1758.

Bird, A., Taggart, M. & Macleod, D. 1981. Loss of rDNA methylation accompanies the onset of ribosomal gene activity in early development of *X. laevis*. *Cell* 26: 381-390.

Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16: 6-21.

Bureau, T.E. & Wessler, S.R. 1994. Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell* 6: 907-916.

Cedar, H. & Razin, A. 1990. DNA methylation and development. *Biochemistry et Biophysica Acta* 1049: 1-8.

Cubas, P., Vincent, C. & Coen, E. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157-161.

Finnegan, E.J., Genger, R.K., Kovac, K., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 1998. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 5824-5829.

Fraga, M.F., Rodríguez, R. & Cañal, M.J. 2002d. Genomic DNA methylation-demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology* 22: 813-816.

Hirochika, H., Okamoto, H. & Kakutani, K. 2000. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. *Plant Cell* 12: 357-368.

Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. & Mudgett, M.B. 2003. *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins *in planta*. *Molecular Microbiology* 50(2): 377-389.

Innes, R. 2003. New effects of type III effects. *Molecular Microbiology* 50(2): 363-365.

Jacobsen, S.E. & Meyerowitz, E.M. 1997. Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science* 277: 1100-1103.

Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. & Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179-188.

Kumpatla, S.P., Teng, W., Buchholz, W.G. & Hall, T.C. 1997. Epigenetic transcriptional silencing and 5-azacytidine-mediated reactivation of a complex transgene in rice. *Plant Physiology* 115: 361-373.

Loidl, A. & Loidl, P. 1996. Oncogene- and tumor-suppressor gene-related proteins in plants and fungi. *Critical Reviews in Oncogenesis* 7(1-2): 49-64.

Martienssen, R.A. & Colot, V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293: 1070- 1074.

Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A.V., Colot, V., Schubert, I. & Tourmente, S. 2003. Changes in 5S chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15: 2929-2939.

Mathur, J., Szabados, L., Schaefer, S., Grunenber, B., Lossow, A., Jonas-Straube, E., Schell, J., Koncz, C., Koncz-Kalman, Z. 1998. Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Journal* 13(5): 707-16.

Melchoir, F. 2000. SUMO-nonclassical ubiquitin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 591-626.

Meyer, P., Niedenhof, I. & ten Lohuis, M. 1994. Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *EMBO Journal* 13: 2084-2088.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. & Kakutani, T. 2001. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* 411: 212-214.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Murfett, J., Wang, X.J., Hagen, G. & Guilfoyle, T.J. 2001. Identification of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *The Plant Cell* 13: 1047- 1061.

Neves, N., Heslop-Harrison, J.S. & Viegas, W. 1995. rRNA gene activity and control of expression mediated by methylation and imprinting during embryo development in wheat x rye hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 529-533.

Okamoto, H. & Hirochika, H. 2001. Silencing of transposable elements in plants. *Trends in Plant Science* 6(11): 527-534.

Rabinowicz, P.D., Palmer, L.E., May, B.P., Hemann, M.T., Lowe, S.W., McCombie, W.R. & Martienssen, R.A. 2003. Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals. *Genome Research* 13: 2658-2664.

San Miguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskain, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z. & Bennetzen, J.L. 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765-768.

Selker, E.U., Freitag, M., Kothe, G.O., Margolin, B.S., Rountree, M.R., Allis, C.D. & Tamaru, H. 2002. Induction and maintenance of nonsymmetrical DNA methylation in *Neurospora*. Proceedings of the National Academic of Science USA 99(4): 16485-16490.

Shaul, O., Van Montagu, M. & Inzé, D. 1996. Regulation of cell division in *Arabidopsis*. Critical Review in Plant Science 15: 97-112.

Stevenson, L.F., Kennedy, B.K. & Harlow, E. 2001. A large-scale overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cycle genes. Proceedings of the National Academy of Sciences 98(7): 3946-3951.

Tamaru, H. & Selker, E.U. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. Nature 414: 277-283.

Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, d., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewald, S.I., Allis, C.D., Cheng, X. & Selker, E.U. 2003. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. Nature Genetics 34: 75-79.

Tariq, M., Saze, H., Probst, A.V., Lichota, J., Habu, Y. & Paszkowski, J. 2003. Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. Proceedings of the National Academic of Science USA 100(15): 8823-8827.

Wolffe, A.P. & Matzke, M.A. 1999. Epigenetics: Regulation through repression. Science 286: 481-486.

Yamashita, K., Upadhyay, S., Osada, M., Hoque, M.O., Xiao, Y., Mori, M., Sato, F., Meltzer, S.J. & Sidransky, D. 2002. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Cell 2(6):485-95.

Zhou, Y., Cambareri, E.B. & Kinsey, J.A. 2001. DNA methylation inhibits expression and transposition of the *Neurospora Tad* retrotransposon. Molecular Genetics and Genomics 265: 748-754.

Capítulo VII

REPRESIÓN EPIGENÉTICA EN SUSPENSIONES CELULARES DESDIFIRENCIADAS DE *Arabidopsis thaliana*.

7.1. INTRODUCCIÓN.

La implicación de la metilación del ADN en el control del desarrollo y crecimiento celular han sido objeto de investigación tanto en animales como en plantas (Finnegan et al., 2000; Meehan, 2003). La metilación aberrante de genes asociados a cáncer es uno de los mecanismos epigenéticos más importantes en la pérdida del control del crecimiento en células animales. La hipermetilación de islas CpG localizadas en las regiones promotoras de genes supresores de tumores ha sido asociada a la inactivación de dichos genes en la mayor parte de los tipos de cáncer (Fraga et al., 2004). A través de la metilación aberrante de promotores se inactivan numerosas vías celulares implicadas en procesos de reparación del ADN (hMLH1, MGMT), progresión del ciclo celular (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p14^{ARF}), apoptosis (DAPK), adherencia celular (CDH1, CDH13) o detoxificación (GSTP1), entre otros (Esteller, 2003).

En plantas, la regulación de la expresión génica por metilación del ADN tan solo se ha analizado durante procesos de diferenciación. En este sentido, cambios de metilación en el ADN genómico que tengan efecto sobre la expresión génica, solo han sido descritos para genes específicos de floración, tales como *AGAMOUS* y *SUPERMAN* (Jacobsen & Meyerowitz, 1997; Jacobsen et al., 2000). Sin embargo, no existen referencias que asocien patrones epigenéticos aberrantes con la pérdida del control del crecimiento y diferenciación celular, quizás debido a que en plantas las consecuencias de esta pérdida de control no resulta crítica para el desarrollo del ciclo vital.

El control del crecimiento y diferenciación vegetal debe ejercerse a través de mecanismos de control muy precisos que regulen la actividad meristemática y que permitan ajustar las tasas de proliferación celular según las características ambientales y/o los estados de desarrollo y de diferenciación en los que se encuentra la planta (Potuschak & Doerner, 2001; Stals & Inzé, 2001). El crecimiento celular en plantas debe dirigir los procesos de morfogénesis a lo largo de todo el ciclo vital del organismo, mientras que en animales las divisiones celulares en estados adultos tan solo se producen para sustituir células muertas o reemplazar células diferenciadas (Loidl, 2004). A pesar de estas diferencias, se ha visto que los mecanismos básicos de control del ciclo celular están altamente conservados en eucariotas, así como también lo están los genes clave que controlan la progresión celular (Potuschak & Doerner, 2001).

En este Capítulo tratamos de determinar si en plantas, al igual que en mamíferos, existen mecanismos epigenéticos implicados en el control del desarrollo y diferenciación de tejidos y cuyo funcionamiento aberrante pueda asociarse a procesos de desdiferenciación celular.

Para ello, se analizaron patrones de metilación del ADN y de acetilación de histonas en los genes candidatos obtenidos mediante tratamiento con drogas demetilantes de suspensiones celulares de *A. thaliana* (Capítulo 6). Como controles se utilizaron tejidos con patrones normales de desarrollo.

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.2.1. Material vegetal.

Como material vegetal control, con pautas de proliferación normales, se emplearon rosetas basales de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Columbia 0) cultivadas en medios de cultivos convencionales. Las muestras correspondientes a patrones de proliferación celular aberrantes son suspensiones celulares de *A. thaliana* mantenidas en medio de crecimiento Murashige & Skoog (1962) a pH 5.8, complementado con 3% (p/v) sacarosa, 0,5 mg/l ácido naftalenacético y 0.05 mg/l kinetina, tal y como se describe en el Capítulo 6.

7.2.2. Secuencias analizadas en los estudios de metilación sitio específica.

La selección de secuencias candidatas se realizó en base a los resultados obtenidos en los estudios de expresión génica mediante microarrays (Capítulo 6), atendiendo a su papel en los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación. Se analizaron secuencias correspondientes a:

- transposones con elementos CACTA (At1g43840, At2g13160, At2g12980).
- genes específicos de tejido: *Oxygen evolving enhancer 3 (PsbQ) family protein* (At3g01440); *Transparent Testa Glabra 1 protein (TTG1)* (At5g24520); *F-box family protein/SKP1 interacting partner 3 –related* (At2g02300); *Dynammin-like protein D (DL1D)* (At2g44590).
- genes de ciclo celular: *CLAVATA1 receptor kinase (CLV1)* (At1g08590); *Glutathione S-transferase* (At1g02940); *BRCT domain-containing protein/zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein (BRCA1)* (At4g21070); *SET domain-containing protein (SUVH7)/// SET domain-containing protein (SUVH8)* (At2g24740); *Cell division control protein CDC6b, putative (CDC6b)* (At1g07270); *G2/mitotic-specific Cyclin (CYC1)/ B-like cyclin (CYC1)* (At4g37490).

- genes con dominios de unión al ADN: *DNA-binding bromodomain-containing protein* (At1g58025); *CCR4-NOT transcription complex protein*, putative (At3g44260).

7.2.3. Análisis del estado de metilación de islas CpG en promotores de genes específicos mediante secuenciación genómica de bisulfito.

7.2.3.1. Modificación del ADN genómico con bisulfito sódico.

La modificación de ADN genómico con bisulfito sódico se realizó según el protocolo descrito por Herman et al. (1998) a partir de 1 µg de ADN genómico resuspendido en 50 µl de agua destilada y desnaturalizado mediante tratamiento con NaOH 3 M durante 15 min a 37 °C. Al ADN desnaturalizado se añadió 33 µl de hidroquinona 20 mM (Sigma) y 530 µl de bisulfito sódico 4.3 M pH 5.0 (Sigma), manteniéndose a 50 °C durante 16-17 h en oscuridad. El ADN modificado fue recuperado mediante elución de la solución a través de columnas de purificación (Wizard DNA Clean-up System, Promega), incubado con 5.7 µl de NaOH 0.3 M durante 10 min para terminar la reacción de conversión de la citosina a uracilo y precipitado mediante tratamientos convencionales con alcoholes. El ADN precipitado final fue resuspendido en 25 µl de agua destilada.

7.2.3.2. Amplificación selectiva de genes candidatos modificados con bisulfito sódico mediante PCR.

Las reacciones de amplificación por PCR, en un volumen final de 15 µl, contenían: tampón de PCR EcoStart 10x (Ecogen), MgCl₂ 50mM (Ecogen), dNTPs 2mM; 1 µM cebadores específicos de la secuencia génica a amplificar y 3 U del enzima ADN polimerasa (EcoStart DNA polimerasa, Ecogen). Los cebadores fueron diseñados para amplificar secuencias cercanas al inicio de la transcripción ricas en islas CpG y CpNpG. La secuencia de los cebadores empleados para la amplificación de los genes candidatos se recoge en la Tabla Suplementaria 7.1. Cada reacción de PCR se analizó

directamente en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo iluminación ultravioleta.

7.2.3.3. Secuenciación del ADN modificado con bisulfito sódico.

Las secuencias génicas amplificadas por PCR fueron extraídas del gel de agarosa mediante el empleo del Kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen). El ADN extraído fue clonado en bacterias competentes de *Escherichia coli* (NovaBlue Singles™) empleando el vector pGEM-T®. La estimación del estado de metilación de cada secuencia CpG y CpXpG se realizó mediante secuenciación automática de 12 colonias de cada secuencia de estudio.

7.2.4. Análisis de los niveles de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa.

7.2.4.1. Síntesis de ADNc.

Se realizó una reacción de transcripción reversa a partir de 2 µg de ARN total tratado con DNase (Ambion), utilizando un cebador oligo (dT)₂₀ en presencia del enzima transcriptasa reversa suministrados en el kit “ThermoScript™ RT-PCR System” (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.2.4.2. Amplificación selectiva mediante PCR.

Las reacciones de PCR, en un volumen final de 15 µl, contenían: tampón de PCR EcoStart 10x (Ecogen), MgCl₂ 50mM (Ecogen), dNTPs 2mM; 1 µM cebadores específicos de la secuencia génica a amplificar y 3 U del enzima ADN polimerasa (EcoStart DNA polimerasa, Ecogen). Se amplificaron 100 ng de ADNc, a varios ciclos entre 25 y 27, para determinar las condiciones óptimas de visualización de diferencias semicuantitativas en los niveles de expresión. Los cebadores para la RT-PCR fueron diseñados para el reconocimiento de secuencias entre diferentes exones, evitando la amplificación del ADN genómico. Bajo las mismas condiciones se realizaron reacciones de amplificación PCR del gen *Actina2/7* (25 y 27 ciclos) que constituyeron

el control interno de la reacción. Las secuencias de los cebadores y las condiciones de la RT-PCR semicuantitativa se recogen en la Tabla Suplementaria 7.1.

7.2.5. Ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina fueron llevados a cabo tal y como se describe en Fraga et al. (2005). Se emplearon anticuerpos comerciales (Upstate Biotechnologies) anti-histona H4 acetilada (AcH4), anti- histona H3 acetilada (AcH3) y anti- trimetilK4 histona H3 (3mK4H3). El entrecruzamiento entre proteínas y ADN se llevó a cabo mediante incubación en 1% formaldehído durante 15 min a temperatura ambiente, deteniéndose la reacción mediante la adición de glicina 125 mM. Un vez lavadas con PBS, las células se lisaron con tampón de lisis-SDS (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.1) suplementado con un inhibidor de proteasas (Complete, Roche). La sonicación se optimizó para la obtención de fragmentos de cromatina de entre 300 y 1000 pares de bases. El análisis de ChIP se realizó con 125-250 µg de cromatina unida a agarosa-proteína A (Upstate Biotechnologies) en tampón de dilución de ChIP (SDS 0.01%, Triton X-100 1%, EDTA 1.2 mM, Tris-HCl pH 8.1 16.7 mM, NaCl 167 mM) en presencia de 5 µg de antisuero. La precipitación del complejo cromatina-anticuerpo se realizó mediante el empleo de bolas de sefarosa-proteína A (Upstate Biotechnologies), seguida de lavados exhaustivos y posterior elusión con SDS 1% y NaHCO₃ 100 mM. Las reacciones de PCR, en un volumen final de 25 µl, contenían: tampón de PCR EcoStart 10x (Ecogen), MgCl₂ 50mM (Ecogen), dNTPs 2mM; 1 µM cebadores específicos de la secuencia génica a amplificar y 3 U del enzima ADN polimerasa (EcoStart DNA polymerasa, Ecogen). Se realizaron tres ensayos de ChIP independientes para cada línea celular. En cada ensayo, se tomaron muestras de las fracciones de ADN total (*input* o ADN precipitado tras la sonicación), de la fracción de control precipitado sin anticuerpo (*unbound*), así como de las fracciones de anticuerpo unido (*bound*). Se empleó Actina 2/7 como control del ensayo de ChIP.

7.3. RESULTADOS.

7.3.1. Análisis de la metilación de islas CpG en promotores de genes específicos.

De las 12 secuencias de copia única analizadas, 6 contienen islas CpG densas cercanas al inicio de transcripción definidas por porcentajes de C+G > 45% y presencia de CpG >6. Las regiones de ADN seleccionadas para secuencias génicas con baja densidad de islas CpG alrededor del inicio de transcripción contienen al menos 7 CpG. Las densidades de CpG y CpNpG muestran una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.005$).

Tras la secuenciación de las 12 secuencias génicas seleccionadas de copia única se identificaron 3 genes cuyas secuencias promotoras se encuentran fuertemente hipermetiladas en suspensiones celulares pero no en tejidos procedentes de roseta basal de *A. thaliana*. La metilación diferencial fue encontrada para los promotores de *TTG1*, *GSTF5* y *SUVH8*, estando todas las metilcitosinas incluidas en dinucleótidos CpG (Tabla 7.1). En la Figura 7.1 se muestra la secuenciación del ADN modificado con bisulfito obtenida para 12 clones de cada uno de los genes diferencialmente metilado.

Por otro lado, todos los transposones con elementos CACTA analizados presentaron hipermetilación de promotores, tanto en muestras procedentes de hojas de roseta basal como en suspensiones celulares (Tabla 7.1; Figura 7.2). De estos análisis es especialmente interesantes el hecho de que las citosinas que se encuentran metiladas no están exclusivamente adscritas a dinucleótidos CpG, como ocurría en los promotores de *TTGA*, *GST5* y *SUVH8*, sino que también forman parte de trinucleótidos CpNpG (Figura 7.2).

No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0.005$) entre la presencia de citosinas metiladas dentro de las secuencias analizadas con el porcentaje de C+G contenido en la secuencia ni con la frecuencia de dianas susceptibles de metilación (CpG y CpNpG).

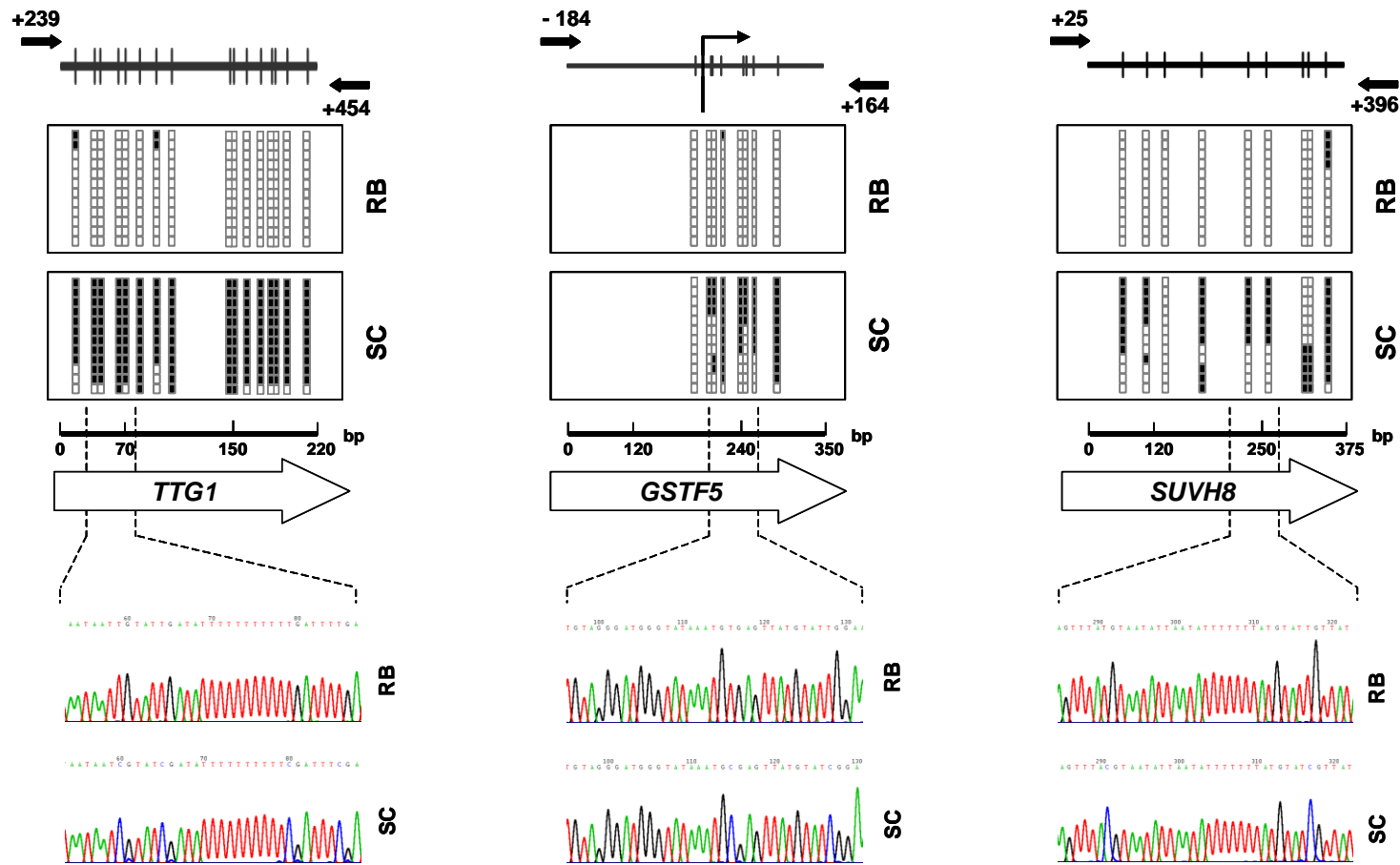


Figura 7.1. Estado de metilación genómica de ADN procedente de roseta basal (RB) y de suspensiones celulares (SC) de secuencias cuyos niveles de expresión aumentaron tras el tratamiento con Aza-dC. Secuenciación del ADN genómico modificado con bisulfito en 12 clones de los promotores de *TTG1* (a), *GSTF5* (b) y *SUVH8* (c) en ambos tejidos. Arriba, representación esquemática del estado de metilación de cada nucleótido CpG. Los recuadros blancos y negros representan citosinas no metiladas y metiladas, respectivamente. Abajo, reacciones de secuenciación de ADN modificado con bisulfito. Se muestran dos electroferogramas indicativos de las diferencias de metilación de promotores entre RB y SC.

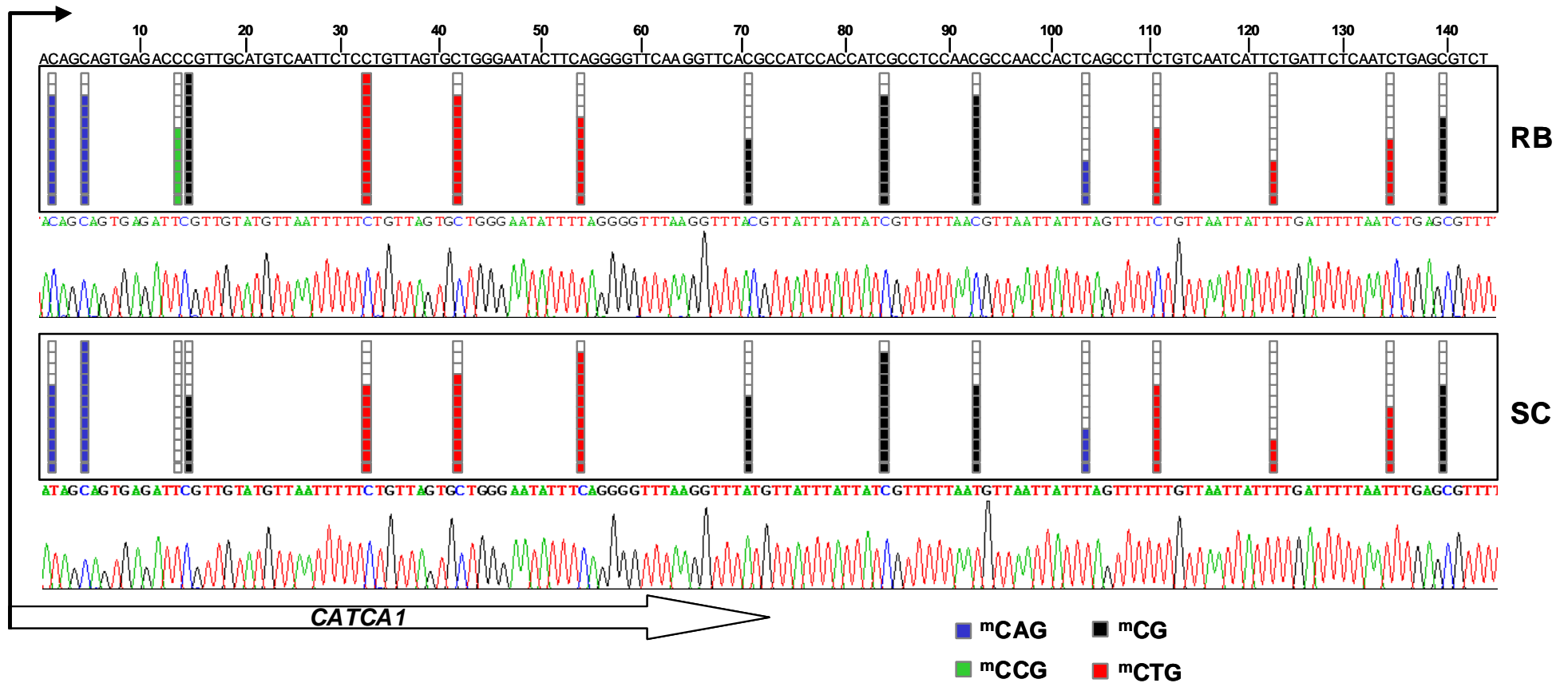


Figura 7.2. Estado de metilación específica de secuencias correspondientes a elementos repetitivos del genoma (transposón CACTA) en tejidos de roseta basal (RB) y en suspensiones celulares (SC) de *A. thaliana*. La representación esquemática indica el estado de metilación de cada nucleótido dentro de contextos CpG (recuadros negros), CpApG (recuadros azules), CpCpG (recuadros verdes) y CpTpG (recuadros rojos) para 12 clones de cada secuencia y muestra. Los electroferogramas se corresponden con las secuenciaciones de bisulfito obtenidas para ambos tejidos.

Tipo secuencia	Locus	Longitud fragmento (bp)	^m CG			^m CCG			^m CAG			^m CTG		
			Nº dianas	% metiladas		Nº dianas	% metiladas		Nº dianas	% metiladas		Nº dianas	% metiladas	
				RB	SC		RB	SC		RB	SC		RB	SC
Promotores	<i>TTG1</i>	213	16	2.1	92.2	8	0	0	1	0	0	0	0	0
	<i>GSTF5</i>	304	8	1.04	55.2	1	0	0	1	0	0	1	0	0
	<i>SUVH8</i>	371	9	3.70	56.5	7	0	0	4	0	0	7	0	0
Repeticiones	<i>CATCA1</i>	159	5	73.1	68.3	1	66.6	0	3	66.6	66.6	6	65.2	62.5
	<i>CATCA2</i>	170	8	90.0	83.3	2	33.3	18.8	3	38.8	33.3	7	64.3	37.1
	<i>CATCA3</i>	263	11	98.5	63.6	2	75.0	0	6	38.4	8.3	4	77.8	16.6

Tabla 7.1. Distribución parcial de metilcitosinas en dinucleótidos CpG y en trinucleótidos CpCpG, CpApG y CpTpG del ADN genómico en *A. thaliana*. Se representa el estado de metilación específica de secuencias correspondientes a promotores génicos (*TTG1*, *GSTF5* y *SUVH8*) y a secuencias repetitivas del genoma (transposones CACTA). Los datos fueron extrapolados a partir de secuenciación de bisulfito de 12 clones de cada secuencia y muestra. RB: roseta basal; SC: suspensiones celulares.

7.3.2. Represión génica asociada a hipermetilación de promotores.

La hipermetilación de los promotores de los genes *TTG1*, *GSTF5* y *SUVH8* está directamente asociada a la represión de la expresión de dichos genes. Mediante retrotranscripción y posterior amplificación sistemática por PCR de los extremos 3' de los mRNAs celulares (RT-PCR semi-cuantitativa) se puso de manifiesto que, mientras que tejidos de roseta basal expresan abundantemente las proteínas codificadas por estos genes, no se detectó expresión génica en suspensiones celulares (Figura 7.3a). Los niveles de expresión de *TTG1*, *GSTF5* y *SUVH8* de suspensiones celulares son restaurados mediante tratamiento con el agente demetilante Aza-dC (Figura 7.3a).

7.3.3. Cambios en la acetilación y metilación de histonas dependientes de tejido.

Se observaron descensos en los niveles de histona H4 acetilada y de histona H3 acetilada dentro de las regiones hipermetiladas de los promotores de *TTG1*, *GSTF5* y *SUVH8*, correspondientes a suspensiones celulares (Figura 7.3b). Por el contrario, regiones del promotor con islas CpG no metiladas, procedentes de roseta basal, se

corresponden con zonas ricas en las mencionadas modificaciones de histonas (Figura 7.3b).

Los promotores de *TTG1* y *SUVH8* que se encuentran demetilados y transcripcionalmente activos en roseta basal, se encuentran asociados a niveles altos de histona H3 trimetilada (3mK4H3), no detectándose esta modificación en tejidos hipermetilados de suspensiones celulares (Figura 7.3b). Para los niveles de 3mK4H3 en el promotor de *GSTF5* se detectó mayor dinamismo: en roseta basal altos niveles de 3mK4H3 se asocian a promotores no metilados activos transcripcionalmente, mientras que en suspensiones celulares promotores enriquecidos en esta modificación se encuentran hipermetilados y silenciados (Figura 7.3b).

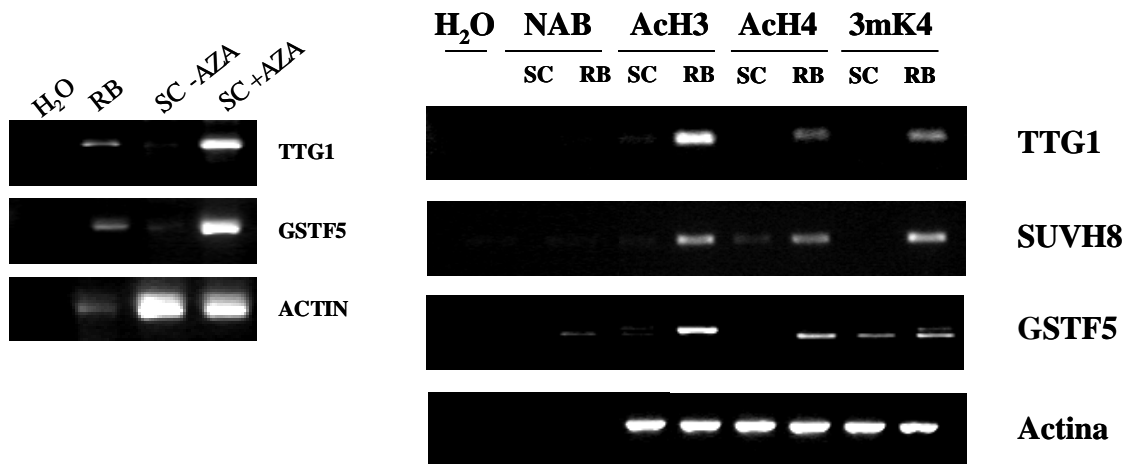


Figura 7.3. a) Análisis de los niveles de transcripción génica mediante RT-PCR de *TTG1*, *GSTF5* y *SUVH8* en roseta basal (RB) y suspensiones celulares (SC) de *A. thaliana*. En todos los casos las secuencias génicas presentan mayor expresión en tejidos de RB que en SC sin tratar con el agente demetilante (SC -Aza), aumentando los niveles de expresión tras tratamientos con Aza-dC (SC +Aza). La actina se utiliza como control de expresión constitutiva. **b)** Análisis del estado de acetilación y metilación de histonas en los promotores de *TTG1*, *SUVH8* y *GSTF5* mediante ChIP en RB y en SC. NAB, control sin anticuerpo; AcH3, histona H3 acetilada; AcH4, histona H4 acetilada; 3mK4, trimetil-Lys4-histona H3. La región promotora de la *Actina2/7* es utilizada como control.

7.4. DISCUSIÓN.

La hipermetilación de promotores detectada en suspensiones celulares de *A. thaliana* afecta principalmente a genes de copia única relacionados con el control del ciclo celular y los procesos de crecimiento, así como a secuencias génicas de múltiple copia correspondientes a elementos transposables del genoma. El hecho de que ninguno de los genes específicos de tejido analizados se encontrase diferencialmente regulado por metilación en tejidos de roseta basal o de suspensiones celulares parece deberse al sistema experimental empleado en el “desenmascamiento” realizado, puesto que en el microarray se compararon materiales poco diferenciados y cuya característica más destacable es la pérdida del control de división celular.

La hipermetilación de transposones es un proceso de regulación habitual, puesto que tanto tejidos de roseta basal como tejidos de suspensiones celulares se encuentran metilados en el mismo grado. En estos casos, se encuentra ampliamente descrito que la metilación de estas secuencias participa en el silenciamiento génico de transposones, evitando su movilidad a lo largo del genoma (Miura et al., 2001; Cui & Fedoroff, 2002; Kubis et al., 2003; Fukuda et al., 2004).

Particularmente interesante resulta el hecho de que, solo en estos casos, la metilación de citosinas esté adscrita tanto a CpG como a CpNpG, mientras que la metilación aberrante de promotores de genes de copia única se produce exclusivamente en el contexto de CpG. La metilación de citosinas en CpG es llevada a cabo mediante la acción de enzimas metiltransferasas de la familia de METI (Genger et al., 1999; Finnegan & Kovac, 2000), mientras que se han identificado ADN metilasas, denominadas cromometiltransferasas, encargadas de la adición de grupos metilo a citosinas incluidas en secuencias CpNpG (Henikoff & Comai, 1998; Bartee et al., 2001; Lindroth et al., 2001; Papa et al., 2001). Según esto, nuestros resultados podrían estar indicando que la metilación aberrante de promotores en suspensiones celulares de *A. thaliana* podría ser un mecanismo que depende de forma específica del reclutamiento erróneo de metiltransferasas de la familia de METI.

El desenmascaramiento químico mediante tratamiento con Aza-dC de suspensiones celulares permitió la identificación de patrones aberrantes de metilación de

genes específicos asociados a pérdida del control del crecimiento y diferenciación celular. Así, *TTG1*, *SUVH8* y *GSTF5*, que en tejidos diferenciados de hoja se encuentran hipometilados, se encuentran silenciados e hipermetilados en suspensiones celulares. La reactivación de su expresión mediante tratamiento con Aza-dC confirma que la expresión de estos genes está, al menos en parte, controlada por los niveles de metilación de sus promotores.

TTG1 ha sido previamente caracterizada como una proteína implicada en varios aspectos de la diferenciación de *A. thaliana*, principalmente implicada en los procesos de diferenciación de tricomas (Walker et al., 1999; Payne et al., 2000; Hülskamp, 2004) y biosíntesis de antocianinas (Debeaujon et al., 2003; Baudry et al., 2004; Carey et al., 2004). Sin embargo, se ha encontrado que la expresión de TTG1 no es tejido-específica, ya que se encuentra en la mayor parte de los órganos de *A. thaliana* (Walker et al., 1999).

Nuestros resultados indican que TTG1, aparte de ser importante para la formación de los tricomas, también puede desempeñar un papel crítico en el control del crecimiento y de la diferenciación en *A. thaliana*. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que TTG1 contiene en su secuencia repeticiones del tipo WD-40 (Walker et al., 1999). Se han identificado numerosas proteínas en eucariotas que contienen repeticiones WD-40, desempeñando papeles fundamentales en la regulación de procesos de señalización celular, ciclo celular, represión transcripcional, tráfico vesicular, procesamiento de ARN o apoptosis, entre otros (Walker et al., 1999; van Nocker & Ludwig, 2003). Además, TTG1 forma parte de un complejo junto con otros factores de transcripción del tipo bHLH (TT8) y MYB (TT2) (Zhang et al., 2003; Baudry et al., 2004), constituyendo el complejo MYB-bHLH-WD40 una interacción proteica muy común en la regulación de múltiples procesos de diferenciación celular (Ramsay & Glover, 2005). Uniones entre proteínas WD-40 y proteínas de la familia del retinoblastoma han sido descritas tanto para animales como para plantas (Ach et al., 1997), apoyando la posibilidad de que TTG1 pueda tener un papel importante en el control de la progresión del ciclo celular.

La hipermetilación de los genes *SUVH8* y *GSTF5* también podría estar implicada en la pérdida del control de crecimiento y diferenciación celular de las suspensiones celulares de *A. thaliana*. *SUVH8* (*SU(VAR)3-9 HOMOLOGOUS 8*) se

corresponde con una proteína con dominios SET homóloga de la familia de metiltransferasas de histonas SUV39H en *Drosophila* y en humanos (Baumbusch et al., 2001). Estas enzimas están directamente implicados en la compactación de la heterocromatina (Peters et al., 2001; Schotta et al., 2002), de modo que participan activamente en el control de la división celular. Por su parte, *GSTF5* pertenece a la familia multifuncional de las glutatión transferasas (GST), enzimas que se encuentran tanto en animales como en plantas (DeRidder et al., 2002) y que están relacionadas con procesos de detoxificación de agentes xenobióticos y de protección ante estrés oxidativo (McGonigle et al., 2000; Dixon et al., 2002). Además, las alteraciones en enzimas GST están íntimamente relacionadas con procesos tumorales en mamíferos. La hipermetilación del promotor de *GSTP1* y, por tanto, silenciamiento génico de esta enzima se ha descrito en tumores de próstata, pecho y riñón (Esteller, 2003). Si al igual que *GSTP1* en mamíferos, *GSTF5* tuviese actividad reparadora del ADN en células vegetales, la hipermetilación de su promotor podría ser un factor que favorece la aparición de alteraciones genéticas a una frecuencia mayor de lo normal en suspensiones celulares. En plantas, este fenómeno se conoce como variación somaclonal.

La represión génica de *TTG1*, *SUVH8* y *GSTF5* en suspensiones celulares, asociada a hipermetilación de sus promotores, también se asocia a modificaciones de histonas relacionadas con represión génica, aportando nuevos datos acerca de la interconexión de las vías de actuación de los mecanismos epigenéticos en el mantenimiento del silenciamiento de genes específicos (“*código epigenético*”) (Strahl & Allis 2000, Spotswood & Turner 2002, Turner 2002) entre animales y plantas.

En base a los datos expuestos en este trabajo, junto con datos funcionales obtenidos mediante transformación génica (*TTG1*, *SUVH8* y *GSTF5*) realizados en *A. thaliana* (resultados no presentados), es razonable pensar que estos genes puedan estar implicados en el control del crecimiento y diferenciación celular en *A. thaliana* ya que la expresión de estos genes, al igual que en los genes supresores de tumores de animales, se encuentra fuertemente reprimida mediante hipermetilación de sus promotores, hipoacetilación de histonas e hipometilación de histonas (3mK4H3).

Estos resultados son la primera evidencia de que en plantas, al igual que en mamíferos, la hipermetilación de promotores de genes específicos está implicada en la génesis de pautas de crecimiento aberrantes y de desdiferenciación celular.

Secuenciación de bisulfito

<i>Gen</i>	<i>5' cebador</i>	<i>3' cebador</i>	<i>Tm (°C)</i>
<i>BR</i>	tagtttttggttgtyaggag	taaattcaaattcactattctcacac	58
<i>CACTA(1)</i>	ggagaatattatgtatggtataggt	aaactatcaaaaaactcatcca	56
<i>GSTF5</i>	gagtgtattatagagagtagagagag	tcaaaactctttattccatc	53
<i>SUVH8</i>	aatgttattgatgatggagat	cttcattaactcataaaatactctc	56
<i>TTG1</i>	ggaagtttttygaagattataataa	atcttcrtaatttccaaaaaac	56

ChIP

<i>Gen</i>	<i>5' cebador</i>	<i>3' cebador</i>	<i>Tm (°C)</i>
<i>ACTIN</i>	ctcccattcccttctccttc	cgaggacgaccacaataact	63
<i>GSTF5</i>	tcatggttatgctgtccatttc	agcaagtttccggtacatgg	63
<i>SUVH8</i>	ccacgcaacatcagtacctc	gtactaggaccggcatctcg	63
<i>TTG1</i>	tctacccatggctttctct	gagatctccggaggaaggac	63

RT-PCR

<i>Gen</i>	<i>5' cebador</i>	<i>3' cebador</i>	<i>Tm (°C)</i>
<i>ACTIN</i>	ctcccattcccttctccttc	cgaggacgaccacaataact	60
<i>GSTF5</i>	tgaccagaagaagccgagtt	cccaggctcagtgttgatgtg	60
<i>TTG1</i>	ctcggttctcaacaacagca	cgcacatgacgattatacgg	60

Tabla Suplementaria 7.1. Secuencia y temperatura óptimas de los cebadores empleados para la secuenciación de bisulfito, los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y la retrotranscripción (RT-PCR).

7.5. BIBLIOGRAFÍA.

Ach, R.A., Taranto, P. & Gruissem, W. 1997. A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *The Plant Cell* 9: 1595-1606.

Bartee, L., Malagnac, F. & Bender, J. 2001. *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes and Development* 15: 1753-1758.

Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. & Lepiniec, L. 2004. TT2, TT8 and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYLUS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39: 366-380.

Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G. & Aalen, R.B. 2001. The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Research* 29(21): 4319-4333.

Carey, C.C., Sthahle, J.T., Selinger, D.A. & Chandler, V.L. 2004. Mutations in the *pale aleurone color1* regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* gene in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 450-464.

Cui, H. & Fedoroff, N.V. 2002. Inducible DNA demethylation mediated by the maize *Suppressor-* mutator transposons-encoded TnpA protein. *The Plant Cell* 14: 2883-2899.

Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M. & Lepiniec, L. 2003. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa regulation of differentiation and role in seed development. *The Plant Cell* 15: 2514-2531.

DeRidder, B.P., Dixon, D.P., Beussman, D.J., Edwards, R. & Goldsbrough, P.B. 2002. Induction of glutathione S-transferase in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiology* 130: 1497-1505.

Dixon, D.P., Laphorn, A. & Edwards, R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3(3): 1-10.

Esteller, M. 2003. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440.

Finnegan, E.J. & Kovac, K.A. 2000. Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 43: 189-201.

Finnegan, E.J., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. 2000. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development* 10: 217-223.

Fraga, M.F., Herranz, M., Espada, J., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Erkek, E., Bozdogan, O., Peinado, H., Niveleau, A., Mao, J.H., Balmain, A., Cano, A. & Esteller, M. 2004. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Research* 64: 5527-5534.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T. & Esteller M. 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics* 37(4): 391-400.

Fukuda, T., Sakai, M., Takano, H., Ono, K. & Takio, S. 2004. Hypermethylation of retrotransposons in the liverwort *Marchantia paleacea* var. *diptera*. *Plant Cell Reports* 22: 594-598.

Genger, R.K., Kovac, K.A., Dennis, E.S., Peacock, W.J. & Finnegan, E.J. 1999. Multiple DNA methyltransferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 41: 269-278.

Henikoff, S. & Comai, L. 1998. A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 148: 307-318.

Herman, J.G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J.R., Ahuja, N., Issa, J.P., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W. 1998. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 6870-6875.

Hülkamp, M. 2004. Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nature Reviews* 5: 471-480.

Jacobsen, S.E. & Meyerowitz, E.M. 1997. Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science* 277: 1100-1103.

Jacobsen, S.E., Sakai, H., Finnegan, E.J., Cao, X. & Meyerowitz, E.M. 2000. Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Current Biology* 10: 179-186.

Kubis, S.E., Castilho, A.M.M.F., Vershinin, A.V. & Seymour, J. 2003. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology* 52: 69-79.

Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. & Jacobsen, S.E. 2001. Requirement of *CHROMOMETHYLASE3* for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292: 2077-2080.

Loidl, P. 2004. A plant dialect of the histone language. *Trends in Plant Science* 9(2): 84-90.

McGonigle, B., Keeler, S.J., Lau, S-M.C., Koeppe, M.K. & O'Keefe, D.P. 2000. A genomic approach to the comprehensive analysis of the glutathione S- transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology* 124: 1105-1120.

Meehan, R.R. 2003. DNA methylation in animal development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14: 53-65.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. & Kakutani, T. 2001. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* 411: 212-214.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Papa, C., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Meeley, R. & Kaeppler, S.M. 2001. Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation. *The Plant Cell* 13: 1919-1928.

Payne, C.T., Zhang, F. & Lloyd, A.M. 2000. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics* 156: 1349-1362.

Peters, A.H.F.M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M. & Jenuwein, T. 2001. Loss of the *Suv39h* histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107: 323-337.

Potuschak, T. & Doerner, P. 2001. Cell cycle controls: genome-wide analysis in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 501-506.

Ramsay, N. & Glover, B. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science* 10(2): 63-70.

Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R. & Reuter, G. 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO Journal* 21(5): 1121-1131.

Spotswood, H.T. & Turner, B.M. 2002. An increasing complex code. *Journal of Clinical Investigation* 110: 577-582.

Stals, H. & Inzé, D. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science* 6(8): 359-364.

Strahl, B.D. & Allis, D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.

Turner, B.M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-291.

Van Nocker, S. & Ludwig, P. 2003. The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BioMed Central Genomics* 4: 50-61.

Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D. & Gray, J.C. 1999. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell* 11: 1337-1349.

Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, T. & Lloyd, A. 2003. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1- dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development* 130: 4859-4869.

Capítulo VIII

CONCLUSIONES

En relación a los cambios de metilación del ADN genómico y de acetilación de histona H4 acetilada en *Pinus radiata* D. Don:

- 1) La dinámica de metilación del ADN genómico en *Pinus radiata* D. Don es independiente del genotipo y presenta: variación temporal, en función del desarrollo ontogénico del individuo, y variación espacial, en función del grado de diferenciación del órgano.
- 2) Existe metilación del ADN específica en función del órgano analizado, concomitante con el proceso de diferenciación y destino del órgano en cuestión.
- 3) La dinámica de metilación del ADN genómico en los ápices caulinares permite establecer pautas de metilación específicas de fases juveniles, adultas vegetativas y adultas reproductivas.
- 4) A diferencia de la dinámica de metilación del ADN de primordios aciculares y fascículos aciculares, en ápices caulinares existe demetilación durante el cambio de fase para facilitar la reprogramación celular que implica floración.
- 5) Se constata el carácter reversible, tanto en términos cuantitativos como de distribución, de la metilación del ADN en procesos de revigorización. Efecto que se valida tanto en el estudio de brotes epicórmicos como en ápices caulinares derivados de cepas madre sometidas a poda intensiva.
- 6) Independientemente del grado de diferenciación de los primordios aciculares, la inmunolocalización de 5-metilcitosina siempre aparece en células “determinadas”. Mediante inmunolocalización y cuantificación por HPCE se

constata que los órganos con capacidad reproductiva son los que presentan mayor señal de inmunomarcado y mayores niveles de 5-metilcitosina genómica.

- 7) La dinámica de acetilación de histona H4 es fase de desarrollo dependiente. La hipoacetilación de histona H4 caracteriza estados reproductivos, incrementando la acetilación de histona H4 en estados juveniles, tal y como lo valida el efecto de revigorización vía brote epicórmico. La acetilación de histona H4 es tanto mayor cuanto mayor es el índice mitótico, de acuerdo con la inmunolocalización de ciclina B1 de los tejidos.
- 8) En estados reproductivos coinciden situaciones divergentes para metilación del ADN,- hipermetilación-, y acetilación de histona H4 –hipoacetilación-, lo cual indica la existencia de pautas de integración-regulación entre ambos procesos.

En relación a los cambios de expresión génica de *Arabidopsis thaliana* regulados por metilación del ADN:

- 1) La aplicación de 5 μ M Aza-dC durante 96 h a suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* (Col 0) provoca un descenso en la tasa de proliferación celular del 25%, así como una disminución del 50% del contenido total de 5-metilcitosina el genoma.
- 2) La técnica de “desenmascaramiento químico” mediante aplicación exógena de 5- Aza 2'- deoxicitidina resultó ser una técnica eficaz en la detección de cambios de expresión génica asociados a metilación del ADN en sistemas experimentales vegetales. La metilación del ADN produce silenciamiento génico en la mayor parte de las secuencias génicas estudiadas, de modo que disminuciones en la metilación conllevan a la reactivación de un 75% de los genes cuya expresión varía tras el tratamiento con 5- Aza 2'- deoxicitidina.
- 3) La demetilación inducida por tratamiento con 5- Aza 2'- deoxicitidina produce sobreexpresión selectiva de familias proteicas. Los elementos repetitivos del genoma, en concreto transposones con repeticiones CACTA, resultan fuertemente sobreexpresados tras el tratamiento demetilante. El tratamiento con Aza-dC también produce sobreexpresión de secuencias de copia única,

- incluyendo genes codificantes para actividades proteasas, genes específicos de tejido relacionados con componentes del fotosistema y genes asociados al control del ciclo celular.
- 4) La metilación aberrante de promotores de genes específicos ocurre de forma exclusiva en dianas CpG. La metilación natural en regiones de ADN genómico repetitivo puede ocurrir tanto en dianas CpG como en dianas CpNpG.
 - 5) Por primera vez en plantas, se pone de manifiesto que patrones aberrantes de metilación, en concreto hipermetilación de promotores, induce la desdiferenciación de *Arabidopsis thaliana* en células con crecimiento no controlado.
 - 6) La hipermetilación de los promotores de *TTG1*, *SUVH8* y *GSTF5* en suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* está asociada con el silenciamiento transcripcional de dichos genes, y la expresión se recupera con tratamientos con drogas demetilantes.
 - 7) La hipermetilación de los promotores y la represión génica de *TTG1*, *SUVH8* y *GSTF5* se relaciona con modificaciones represivas de las histonas adyacentes a esas secuencias génicas. Se pone de manifiesto que hipermetilación del ADN, hipoacetilación de histonas H3 y H4 y trimetilación de histona H3 son mecanismos epigenéticos que interaccionan en el silenciamiento de genes específicos.
 - 8) Se demuestra por primera vez que la metilación aberrante de promotores, junto con la alteración del patrón de modificación de las histonas adyacentes, son mecanismos epigenéticos implicados en la represión transcripcional de genes específicos, y que estos fenómenos pueden tener consecuencias críticas para el control del desarrollo y diferenciación celular en plantas.

*A mi abuela, por enseñarme que una sonrisa
es siempre la mejor opción.*



Este trabajo ha sido realizado en:

- Universidad de Oviedo: Unidad de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas.
- Centro de Investigaciones Biológicas- C.S.I.C. (Madrid): Grupo de Desarrollo de Plantas y Organización Nuclear, Departamento de Biología de Plantas.
- Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Madrid): Grupo de Epigenética del Cáncer, Programa de Patología Molecular.

Con la colaboración en la cesión de materiales experimentales de:

- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo (NEIKER), Vitoria.
- Viveros Oihamberri, S.A., Bilbao.
- Universitat Autònoma de Barcelona.

Financiación personal y de la investigación:

- Proyectos de Investigación Europeos: INCO ICA4-CT-2001-10063.
- Proyectos de Investigación Nacionales: MCT-AGL-00-2126; AGL2004-00810/FOR; MCYT PB-2002 BOS 2002 – 03372.
- Proyectos de la Comunidad de Madrid: 07/G0026/2004

AGRADECIMIENTOS

La consecución de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la labor llevada a cabo por personas que han participado activamente en su elaboración, así como gracias al apoyo de otras muchas personas que me han transmitido su ánimo en todo momento. Razones por las cuales me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento:

A los Directores de la Tesis Doctoral. Al de “aquí”, el Profesor Roberto Rodríguez, por su constante dedicación, instrucción y apoyo ofrecidos, no solo durante la realización del trabajo, sino a lo largo de mi formación profesional. Y al de “allá”, el Dr. Mario F. Fraga, por haber depositado tanta confianza en mí. Sin duda, tu apoyo y tus conocimientos han sido vitales para la consecución del trabajo. A ambos, gracias por generar el clima de amistad en el que hemos estado todo este tiempo.

A la Co-Directora de la Tesis Doctoral, la Profesora María Jesús Cañal, por sus inestimables consejos y, especialmente, por el rigor científico que siempre ha mostrado y que espero me haya transmitido.

A los responsables de los Grupos de Investigación en los que he desarrollado gran parte del trabajo, el Dr. Manel Esteller, responsable del Grupo de Epigenética del Cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas y a la Profesora de Investigación María del Carmen Risueño, responsable del Grupo de Desarrollo de Plantas y Organización Nuclear del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Mi más sincero agradecimiento por su amable acogida y por haberme mostrado tantos nuevos horizontes de trabajo.

Al Profesor Ricardo Sánchez Tamés, por su gestión, buenos consejos y edificante lectura de la memoria.

A mis compañeros de la Universidad de Oviedo:

A L. Borja Diego, porque gran parte del camino la hemos hecho cogidos de la mano.

A Luis Valledor, por tantas cosas, especialmente por tu ayuda en labores informáticas, pero sobre todo por todos esos disparates e historias que nos hacen reír tanto.

A Carlos Noceda, por todas esas charlas compartidas y por aportar la parte de calma que tanto ayuda.

Al resto de componentes del Grupo de Investigación, Rodrigo, Estrella. No hemos tenido mucho tiempo, pero habéis escuchado en todo momento mis problemas.

A Eva Santos, por tu inagotable paciencia a la hora de escucharme hablar y hablar durante horas. Gracias por el gran sentido de la amistad que tienes.

A mis compañeros del C.I.B.-C.S.I.C.:

A Pilar Testillano, por su constante ayuda durante mi estancia en el laboratorio. Tus orientaciones han sido de gran utilidad a la hora de resolver los problemas del día a día.

A “mi” Pablo y a “mi” Rebeca. ¿Qué escribir que no sepáis?. No os podéis ni imaginar lo que agradezco esos cuidados y mimos que me habéis brindado nada más entrar por la puerta. Con vosotros cerca, sentirse sola es más que imposible.

A María José, a Ivett y a Carmen por vuestra amable acogida en el laboratorio, estando siempre dispuestas a dejar lo vuestro y ayudarme.

A Carlos, por su ayuda técnica y por las charlas y charlas que hemos mantenido todas las mañanas.

A mis compañeros del C.N.I.O.:

Sois tantos que resulta difícil hacer un listado sin olvidar a nadie. A todos, a los que pertenecéis al grupo, y a los que como yo hemos “pasado por allí”, gracias por esa rápida acogida y disponibilidad en todo momento.

A Esteban Ballestar, por su ayuda en el desarrollo de muchas tareas en el laboratorio, pero sobre todo por el buen humor que muestra en todo momento.

A mi equipo de “actividades extraescolares”: Aizpea, Lidia, Nelo, Rosalía, Sara, Filipe, Óscar, y Paz por todos esos parloteos y fiestas que hacen que la rutina salga corriendo. Todavía tenemos muchos deberes pendientes.

A Fer, siempre de buen humor y siempre dispuesto a echarte una mano.

A la gente que con sus charlas y bromas han contribuido a sentirme en un clima tan cordial: Santi, Michel, Jesús, Rubén, Mari Paz, Ana, Kevin, Patrizia, Paula, Rocío, y Teresa.

A todos mis amigos y familiares que me han acompañado durante todo este tiempo. Recibir vuestro ánimo, vuestro consejo y compartir vuestros problemas e inquietudes son el motor de todo.

A todos mis niños, que ya sois muchos pero nunca demasiados. Sin duda, vuestra inocencia y vuestro cariño es lo que más alegrías me puede provocar.

A Andrés, por marcarme el rumbo de esta travesía. Ya ves, he llegado a buen puerto “capitán”.

A mis padres, Ángel y María Joaquina. Soy consciente de que vosotros habéis vivido y compartido todos los momentos de estos últimos años tan intensamente como yo. Pensar que sin vuestro esfuerzo no sería posible. Sabéis que vuestra comprensión, apoyo y cariño han sido y son indispensables para mí. Gracias.

