



Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado
Universidad de Oviedo



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Perfiles epigenéticos en la respuesta a estrés UV-B en *Pinus radiata* D. Don.



María Luz Annacondia López

22 de julio de 2015



Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado
Universidad de Oviedo



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Perfiles epigenéticos en la respuesta a estrés UV-B en *Pinus radiata*
D. Don

Epigenetic profiles in the UV-B stress response of *Pinus radiata* D. Don

María Luz Annacondia López

Firma

María Jesús Cañal Villanueva

Firma

RESUMEN

Como consecuencia de la actual disminución de la capa de ozono, la superficie terrestre está recibiendo cantidades crecientes de UV-B (280-320 nm), las cuales causan daños considerables en las plantas. A pesar de tener una clara importancia, el estudio de la exposición a UV-B en plantas es escaso, especialmente en el caso de las especies forestales, las cuales presentan una gran implicación tanto ecológica como económica. Según estudios previos, los mecanismos epigenéticos, como las modificaciones postraduccionales de las histonas y la metilación del ADN, podrían cumplir un papel vital en esta respuesta al UV-B.

Por esto, el objetivo de este trabajo consiste en establecer los perfiles epigenéticos de la respuesta de *P. radiata* al estrés UV-B. Para lo cual, se planteó diseñar un sistema experimental que simule las condiciones ambientales relacionadas con la exposición a dicha radiación, la optimización de un protocolo de ELISA que permitiesen el análisis de los niveles de marcas epigenéticas y la optimización de un protocolo de MS-RAPD-PCR para el análisis de la metilación del ADN.

Los resultados obtenidos indican que en la respuesta al estrés UV-B se produce un descenso de las marcas permisivas H3K4me3 y H4Ac, así como de la marca represiva H3K9me3, entre los niveles control y los de algunos tratamientos. Por otra parte, los eventos de metilación del ADN, asociados a la represión de la transcripción, observados concurren con los eventos de desmetilación. Todo esto estaría indicando que ciertos genes se activarían, mientras que otros se reprimirían, con el fin de remodelar el perfil transcriptómico para lograr una mejor adaptación a este estrés. De esta forma, en este trabajo se ha conseguido establecer un perfil epigenético diferencial en *P. radiata* D. Don en la respuesta a estrés UV-B, proporcionando a una base sobre la que trabajar en un futuro.

ABSTRACT

As a result of the decrease of the ozone layer, increasing amounts of UV-B (280-320 nm) are reaching the Earth's surface, causing important damages to plants. Even though it has a clear importance, the study of the exposure of plants to UV-B is scarce, especially the case of forestry species, which have great economical, as well as ecological, implications. Previous studies showed that epigenetic mechanisms, such as the histones post-translational modifications and the DNA methylation, could play a key role in the response to the UV-B stress.

This work's objective consists of the establishment of the epigenetic profiles of the *P. radiata* response to UV-B stress. To achieve this, we decided to design an experimental system which simulated the environmental conditions related to the exposure to this stress, to optimize an ELISA protocol to analyze the levels of epigenetics marks and to optimize a MS-RAPD-PCR protocol to analyze the DNA methylation.

The obtained results show that in the UV-B stress response there is a decrease of the permissive marks H3K4me3 and H4Ac, as well as the repressive mark H3K9me3, among the control levels and some of the treatments. Moreover, the DNA methylation events, related to the repression of the transcription, coincide with the demethylation events. This could be indicating that some genes would be up-regulated and some genes would be down-regulated, so the transcriptomic profiles would lead to the optimum response to this stress. So, in this work, we established a differentiating epigenetic profile of *P. radiata* D. Don to the UV-B stress, providing a base for future works.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi tutora, la Doctora Cañal, por todo lo que me ha enseñado durante estos dos años, y por todo lo que espero que continúe enseñándome, así como por su confianza en mí.

Me gustaría agradecer también al Doctor Valledor y a Jesús Pascual, por su paciencia a la hora de explicarme las cosas, por todos los conocimientos que han sido capaces de transmitirme y por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio de una manera eficaz pero entretenida.

Por otra parte, me gustaría agradecer a mis compañeros de laboratorio y máster, Alicia, Álvaro, Fran, Miguel y Sara, por estar siempre dispuestos a ayudar y por haberme hecho disfrutar cada momento de este año.

Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia, por su constante apoyo y ánimos, no sólo durante este máster, sino en todos estos años de estudio. Estoy segura de que sin ellos no habría llegado hasta aquí.

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
APS	Persulfato de amonio
BCA	Ácido bicinconínico
BCIP	Bromocloroindolil fosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CMT3	Cromometiltransferasa 1
<i>CSDP2</i>	<i>COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 2</i>
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DEA	Dietanolamina
DIECA	Ácido dietilditio carbámico
DRM2	Metiltransferasa de dominios reorganizados 2
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
H3Ac	Acetilación de la histona H3
H3K4me3	Trimetilación de la lisina 4 de la histona H3
H3K9me3	Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3
H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3
H4Ac	Histona H4 acetilada
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona deacetilasa
HKMTs	Lisina metiltransferasa
<i>MSI1</i>	<i>MULTICOPYSUPPRESSOR OF IRA1</i>
MS-RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico sensible a metilación
MET1	Metiltransferasa 1
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NtGPDL	Glycerophosphodiesterase-like protein
Paraquat	Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRMTs	Arginina metiltransferasa
PTM	Modificación postraducciona
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
<i>SHM4</i>	<i>SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 4</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TGS	Tris-glicina-SDS
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
2.1	Material vegetal.....	5
2.2	Ensayo con UV-B.....	5
2.3	Análisis de las PTMs de las histonas.....	5
2.3.1	Extracción de proteínas nucleares.....	5
2.3.2	Cuantificación de proteínas nucleares.....	6
2.3.3	ELISA.....	6
2.3.4	Western Blot.....	7
2.4	Análisis de los niveles de metilación del ADN.....	9
2.4.1	Extracción de ADN.....	9
2.4.2	MS-RAPD-PCR.....	9
3	RESULTADOS.....	12
3.1	Análisis de las PTMs de las histonas.....	12
3.1.1	ELISA.....	12
3.1.1.1	Especificidad de los anticuerpos.....	12
3.1.1.2	PTMs de las histonas.....	12
3.1.2	Western Blot.....	13
3.2	Análisis de los niveles de metilación del ADN.....	15
3.2.1	MS-RAPD-PCR.....	15
4	DISCUSIÓN.....	17
5	CONCLUSIONES.....	21
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

1 INTRODUCCIÓN

Debido a su naturaleza sésil, las plantas se enfrentan inevitablemente a cambios ambientales (Zhu et al. 2012), los cuales en ocasiones dan lugar a situaciones de estrés, entendidas como aquellas en las que el metabolismo, el crecimiento o el desarrollo de las plantas se ven afectados o interrumpidos (Han & Wagner 2014). De manera general, el estrés se divide en biótico, el cual incluye por ejemplo la herbivoría o el ataque de patógenos, o abiótico, el cual está relacionado con cualquier condición ambiental desfavorable, tales como la disponibilidad de agua y nutrientes, la temperatura o las condiciones lumínicas (Madlung & Comai 2004).

Uno de los estreses abióticos más importantes en la actualidad es el que está causado por un exceso de radiación ultravioleta (UV), ya que las cantidades de la misma que llegan a la superficie terrestre están aumentando considerablemente como consecuencia de la disminución de la capa de ozono (Besteiro et al. 2011). La radiación UV está formada por tres componentes, el UV-A (320-400 nm), el UV-B (280-320 nm) y el UV-C (<280 nm). En condiciones normales, la radiación UV-C, la más dañina, es filtrada por las capas externas de la atmósfera, lo que ocurre también con gran parte de la radiación UV-B (Brown et al. 2005). A pesar de ser necesaria en pequeñas dosis, ya que es fundamental para la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas porque participa en las respuestas fotomorfogénicas (Besteiro et al. 2011), un exceso de radiación UV-B puede provocar necrosis tisular, daño en el material genético y la generación de ROS (especies reactivas del oxígeno) (Brown et al. 2005). Por esta razón, las plantas han desarrollado mecanismos de respuesta frente al exceso de esta radiación (Brown et al. 2005), que son vitales debido a su necesidad de captar energía solar y su forma de vida sésil, por las cuales obligatoriamente deben exponerse a este estrés (Besteiro et al. 2011).

En estas respuestas, a nivel transcriptómico, actúa un amplio rango de genes, relacionados con procesos bioquímicos y fisiológicos, que se encarga de activar las respuestas a los diferentes tipos de estrés, como pueden ser las fluctuaciones de temperatura, la deficiencia hídrica o el exceso de radiación UV. Por otra parte, a nivel genómico, la estructura de la cromatina determina la accesibilidad a las secuencias de ADN, lo que está habitualmente regulado mediante mecanismos epigenéticos (Zhu et al. 2012).

Se ha demostrado que esta regulación epigenética contribuye a la regulación transcripcional y post-transcripcional de genes importantes en las respuestas a estrés (Mirouze & Paszkowski 2011), gracias a su capacidad para modificar el ADN de manera rápida y reversible. Esta regulación epigenética incluye distintos mecanismos de modificación de la estructura de la cromatina, las modificaciones covalentes de las histonas, la metilación del ADN y los ARN no codificantes (Zhu et al. 2012).

En las plantas, la metilación de las citosinas del ADN se observa en tres secuencias diferentes, las islas CG, las secuencias CHG y CHH, en las cuales la letra H puede ser cualquiera de las otras tres bases restantes, esto es, adenina, timina o guanina. Las secuencias CG y CHG, debido a su simetría, se copian después de la replicación del

ADN, sin embargo, la secuencia CHH, al ser asimétrica, se establece *de novo* después de cada ciclo de replicación. El enzima metiltransferasa 1 (MET1) se encarga del mantenimiento de la metilación en las secuencias CG, localizadas principalmente en los promotores y cuerpos de los genes, posiblemente actuando en las horquillas de replicación, en las cuales usaría el ADN hemi-metilado y recién replicado como sustrato. La metilación en esta secuencia, aparentemente, es la más estable, por lo que su distribución en el genoma determina el patrón epigenético que se hereda de generación en generación. La metilación en las secuencias CHG, situada mayoritariamente en los elementos transponibles, en plantas es mantenida por otro enzima, llamado cromometiltransferasa 3 (CMT3), el cual está regulado por las modificaciones de las histonas, sobre todo la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) (Mirouze & Paszkowski 2011). Finalmente, la metilación *de novo*, es decir, la que ocurre en las secuencias CHH, es establecida principalmente por DRM2 (metiltransferasa de dominios reorganizados 2), en las nuevas hebras de ADN obtenidas tras la replicación (Dhar et al. 2014). Al tratarse de una modificación bimodal, la metilación del ADN funciona como un interruptor de la transcripción, motivo por el cual se propuso que actúa como control de la actividad de genes importantes en la respuesta a estrés (Colaneri & Jones 2013).

Por otra parte, las histonas se encuentran formando la unidad estructural de la cromatina, los nucleosomas. Estos están constituidos por un octámero en el que se encuentran las cuatro histonas (H3, H4, H2A y H2B), alrededor de las cuales se encuentran 147 pares de bases del ADN. Estas histonas son mayoritariamente globulares, a excepción de su extremo N-terminal, denominado "cola", el cual no presenta una estructura definida. Una de las características más interesantes de las colas de las histonas es el gran número de modificaciones que experimentan (Kouzarides 2007), las cuales pueden ser fosforilaciones, acetilaciones, metilaciones, ubiquitilaciones y sumoilaciones (Zhu et al. 2012), destacando entre ellas la acetilación y la metilación (Kouzarides 2007).

La acetilación de las histonas se produce en residuos de lisina y se caracteriza por ser una modificación notablemente dinámica y estar regulada por la acción de dos familias de enzimas, las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs). Las HATs catalizan la transferencia de un grupo acetilo al residuo de lisina utilizando como cofactor el coenzima-A (CoA), por lo que neutralizan la carga positiva del aminoácido y debilitan la interacción histona-ADN, permitiendo de esta forma la transcripción. Por el contrario, las HDACs eliminan esta acetilación, de manera que devuelven la estabilidad a la cromatina, lo que las convierte en represores de la transcripción (Bannister & Kouzarides 2011).

La metilación de las histonas ocurre principalmente en residuos de lisina y arginina y, a diferencia de la acetilación, no cambia la carga de la proteína. Los enzimas encargados de realizar esta modificación son las lisina metiltransferasas (HKMTs) y las arginina metiltransferasa (PRMTs), ambas capaces de dar lugar a tanto la activación como la represión de la transcripción. En comparación con las acetiltransferasas, las lisinas metiltransferasas presentan una especificidad muy superior (Kouzarides 2007). Además, son capaces de añadir uno, dos o tres grupos acetilos a los residuos de lisina o uno o dos

grupos acetilo a los residuos de arginina, por lo que aumentan aún más el número de modificaciones posibles que experimentan las histonas (Bannister & Kouzarides 2011).

De manera general, tanto en animales como en plantas, la heterocromatina, aquella cromatina más compacta, se asocia a niveles altos de metilación de los residuos de citosina del ADN y con niveles de trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) y de la lisina 27 de la misma histona (H3K27me3) altos. En cambio, la eucromatina, aquella que es transcripcionalmente activa, se asocia con niveles de metilación del ADN bajos y de trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 altos (H3K4me) (Tittel-Elmer et al. 2010).

Conocer los mecanismos epigenéticos de respuesta al estrés por exceso de UV-B es especialmente interesante en el caso de las especies forestales, ya que proporcionan materia prima para diferentes tipos de industrias. Por otra parte, los bosques constituyen los principales sumideros en la captura natural del CO₂, de manera que su estudio tiene tanto fines económicos como ecológicos. Una de las especies forestales más importantes es *Pinus radiata*, ya que se trata de la madera blanda no autóctona más plantada en el mundo (Mead 2013).

P. radiata se caracteriza por su crecimiento rápido, por su madera blanda de densidad media y por ser versátil y adecuado para un amplio abanico de usos. Además, su cultivo está bien desarrollado, gracias a que se lleva investigando y practicando casi un siglo. Por todo esto, en el año 2013, existían en el mundo unas 4 millones de ha plantadas con esta especie. Las plantaciones más grandes se encuentran en Chile, Nueva Zelanda (alrededor de 1,5 millones de ha en ambos países) y Australia (0,77 millones de ha). Esta especie también se planta de manera más moderada en España (0,29 millones de ha) y Sudáfrica (57.000 ha), además de en otros países (Mead 2013). Es justamente en estos países, Chile, Nueva Zelanda y Australia, donde se están sufriendo los mayores índices de radiación UV (Liley & McKenzie 2006), razón por la cual el estudio de las respuestas de *P. radiata* al estrés causado por un exceso de esta radiación presenta ahora un especial interés.

En el año 2003, Kovalchuk et al. publicaron las primeras evidencias de la relación entre los cambios epigenéticos y la adaptación a exposiciones crónicas de radiación en otra especie del género, *P. silvestris*. Para ello, evaluaron el nivel de metilación global de árboles control y de árboles que habían sido expuestos a radiación mediante un método basado en el uso de la enzima de restricción HpaII, la cual es sensible a la metilación del ADN. De esta forma, consiguieron demostrar que el genoma de los pinos que habían sido estresados estaba considerablemente hipermetilado y que esta hipermetilación podría ser dosis-dependiente. En base a estos hallazgos, estos autores consideraron que la hipermetilación debería entenderse como una defensa ante la posible pérdida de estabilidad y una reorganización del material hereditario, de manera que las plantas podrían sobrevivir en estas condiciones ambientales desfavorables (Pascual et al. 2014).

Por otra parte, Valledor et al., en 2012, analizaron los niveles de expresión de tres genes candidatos relacionados con la regulación epigenética en la respuesta a UV-B *MSI1* (*MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1*), *CSDP2* (*COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 2*) y

SHM4 (*SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 4*), los cuales experimentaron un aumento considerable como consecuencia del estrés (Valledor et al. 2012).

A pesar de que existen diversos estudios sobre la respuesta molecular de *P. radiata* al estrés provocado por la radiación UV-B, hasta el momento no se conocían los perfiles epigenéticos. Por esta razón, se planteó como objetivo principal de este trabajo la obtención de los perfiles epigenéticos de acículas de *P. radiata* D. Don tras ser sometidas a estrés por UV-B. Para poder abordar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. El establecimiento de un sistema experimental que simulase las condiciones ambientales reales, no letales, y permitiese el estudio de la respuesta a estrés UV-B de *P. radiata*.
2. La optimización de un protocolo de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) que permitiese el análisis de las PTMs (modificación postraduccional) de las histonas.
3. La optimización de un protocolo de MS-RPAD-PCR (amplificación aleatoria de ADN polimórfico sensible a metilación) que permitiese el análisis de la metilación en las secuencias CG.
4. La obtención de los perfiles epigenéticos, tanto de las PTMs de las histonas como de la metilación del ADN, mediante las técnicas anteriormente citadas.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Se utilizaron 12 individuos de la especie *Pinus radiata* de dos años de edad que habían sido mantenidos en condiciones controladas de invernadero.

2.2 Ensayo con UV-B

El ensayo con UV-B consistió en la aplicación de $0,480 \text{ W}\cdot\text{m}^2$ de dicha radiación en tres tratamientos distintos, lo que se corresponde con un índice UV de entre 8 y 10; una dosis de 2 horas (2h1d), una dosis de 8 horas (8h1d) y dos dosis de 8 horas en dos días consecutivos (8h2d). Durante el ensayo, tanto las plantas control como las expuestas a radiación UV-B, permanecieron bajo un fotoperiodo de día largo y en condiciones controladas ($0,115 \text{ W}\cdot\text{m}^2$ de radiación PAR, radiación fotosintéticamente activa, y $20 \text{ }^\circ\text{C}$) (Figura 1). En el caso del MS-RAPD-PCR también se utilizaron plantas recuperadas, que fueron aquellas que tras haber sido sometidas al tratamiento de 8h2d se dejaron recuperar del estrés durante un mes.

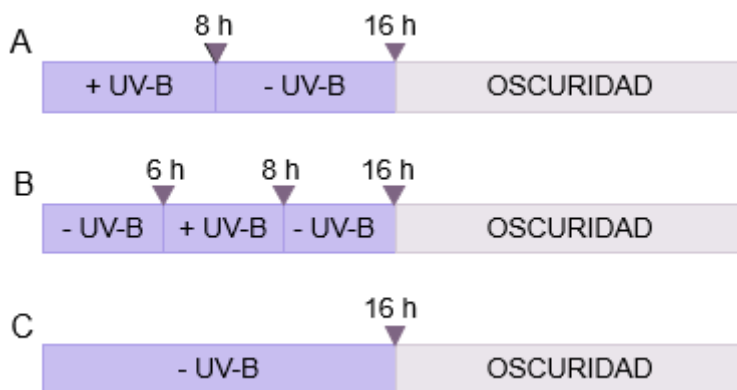


Figura 1. Esquema del ensayo con UV-B. A. Plantas sometidas al tratamiento de 8 horas, tanto un solo día como dos (8h1d y 8h2d). B. Plantas sometidas al tratamiento de dos horas un día (2h1d). C. Plantas control.

2.3 Análisis de las PTMs de las histonas

2.3.1 Extracción de proteínas nucleares

Con el fin de extraer únicamente las proteínas nucleares y evitar así que las proteínas citoplasmáticas pudiesen causar desviaciones en los resultados, en primer lugar se realizó una purificación de núcleos. Para ello, se homogeneizaron 500 mg de acículas de cada individuo en un mortero hasta conseguir un polvo fino, el cual se transfirió a un tubo Falcon de 12 ml. Inmediatamente, se añadieron 8 ml de tampón de extracción A ($0,44 \text{ M}$ sacarosa; 10 mM Tris-HCl, tris-hidroximetil-aminometano-HCl, pH 8,0; 5 mM β -mercaptoetanol; 200 mM PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo). A continuación, las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo, mezclándolas por inversión cada 5 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se filtró el contenido de cada tubo a través de dos capas de miracloth. La solución obtenida se centrifugó durante 15 minutos a 3.000 g y, seguidamente, se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se resuspendió en 5 ml de tampón B (0,25 M sacarosa; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 1% Tritón X-100; 5 mM β-mercaptoetanol; 200 mM PMSF), el cual provoca la lisis de los plastos y las mitocondrias, añadiéndolo con cuidado para que no romper los núcleos extraídos. Seguidamente, las muestras se incubaron durante 10 minutos en hielo, mezclando por inversión cada 5 minutos y, a continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 g y se eliminó el sobrenadante obtenido. El lavado con el tampón B se realizó dos veces más siguiendo los mismos pasos.

Posteriormente, se resuspendieron los núcleos en 8 ml de tampón C (sacarosa 0,25 M; Tris-HCl pH 8,0 10 mM; MgCl₂ 10 mM; β-mercaptoetanol 5 mM; PMSF 200 mM), para eliminar los restos de tritón del tampón B, y se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 g. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y los núcleos se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Por otra parte, para extraer las proteínas nucleares, el precipitado obtenido tras la purificación de núcleos se resuspendió en 300 μl de H₂SO₄ 0,2 M y se mezcló por inversión a 4 °C durante 20 minutos. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 4 °C y 16.000 g para que los restos organulares precipiten. Seguidamente, se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo con cuidado de no coger el precipitado y se añadieron a cada tubo 105 μl de TCA (ácido tricloroacético) 100%, incubando la mezcla durante 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C y 16.000 g para precipitar las proteínas. A continuación, el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo, procurando no arrastrar el precipitado, y las proteínas se lavaron con 1 ml de acetona helada y se centrifugaron nuevamente durante 15 minutos a 4 °C y 16.000 g. Este lavado con acetona se repitió dos veces más y, una vez finalizado, las proteínas se dejaron secar a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 μl de urea 8 M.

2.3.2 Cuantificación de proteínas nucleares

La cuantificación de las proteínas extraídas se realizó con un ensayo BCA (ácido bicinonínico). Para ello, se preparó una placa con una recta patrón, por duplicado y formada por 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 μl de BSA (seroalbúmina bovina), y con dos réplicas de las muestras, de las cuales se cuantificó 1 μl. Tras una incubación de 20 minutos a 60 °C, se midió la absorbancia a 562 nm y se procedió a calcular la concentración de las muestras.

2.3.3 ELISA

En primer lugar, se comprobó la especificidad de cada uno de los anticuerpos de las marcas epigenéticas en estudio, H3K4me3 (Upstate, ref. 07-442), H3K9me3 (Upstate, ref. 07-442), H3K27me3 (Upstate, ref. 07-449), H3ac (Upstate, ref. 07-352) y H4ac (Upstate, ref. 06-866), mediante un Western Blot, el cual se realizó según se describe en el apartado 2.3.4., a excepción de que en este caso no se utilizó ningún tipo de control.

Una vez comprobada la especificidad de los anticuerpos, se prepararon diluciones de las muestras de manera que tuviesen una concentración de 0,05 µg/µl, se añadieron 16 µl/pocillo de cada muestra por duplicado y posteriormente se añadieron 34 µl de PBS (tampón fosfato salino; 3,2 mM Na₂HPO₄; 0,5 mM KH₂PO₄; 135 mM NaCl; 1,3 mM KCl; pH 7,3) 1x. Las placas se sellaron y se incubaron a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, las placas se agitaron vigorosamente y se desechó el contenido de los pocillos. Se realizaron 4 lavados con 200 µl/pocillo de solución de lavado (0,5% Tween 20 en PBS 1x), agitando la placa una vez añadida la solución y dejándola incubar durante 2 minutos. A continuación, se bloquearon las posibles uniones inespecíficas con 200 µl/pocillo de solución de bloqueo (5% BSA; 0,05% Tween 20 en PBS 1x) dejando incubar la placa al menos durante una hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se agitaron las placas y se desechó la solución y se añadieron 50 µl/pocillo del anticuerpo primario (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3ac y H4ac) a una concentración 1:1.000 en solución de bloqueo, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se lavaron las placas 4 veces de la manera indicada anteriormente y se añadieron 50 µl/pocillo del anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina) en una concentración 1:5.000 en solución de bloqueo, el cual se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrida la incubación, se lavaron las placas 4 veces como se explicó anteriormente y se revelaron añadiendo 200 µl/pocillo de solución de p-nitrofenilfosfato preparada en el momento, la cual contiene 28 mg p-nitrofenilfosfato/20 ml de tampón de DEA, dietanolamina, (0,9 M dietanolamina, 0,3 mM MgCl₂·6H₂O, pH 9,8). Finalmente, las placas se colocaron en una estufa a 37 °C y se tomaron medidas de la absorbancia obtenida tras 30, 45, 60 y 75 minutos de incubación.

Los datos de absorbancia obtenidos de cada marca epigenética se normalizaron utilizando los datos de absorbancia de la histona H3. Posteriormente, se realizó un ANOVA (análisis de la varianza) con el programa RStudio para comprobar si había resultados estadísticamente significativos.

2.3.4 Western Blot

En primer lugar se prepararon unos geles de acrilamida al 15%, en los cuales se separaron las proteínas nucleares. Estos geles estaban formados por una parte superior denominada empaquetado (0,45 ml acrilamida-bisacrilamida 37,5:1 40%; 1,75 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 25 µl SDS, dodecilsulfato sódico, 20%; 27,5 µl APS, persulfato de amonio, 10%; 4 µl TEMED, tetrametiletilendiamina; 1,125 ml ddH₂O) y una parte inferior denominada resolución (1,875 ml acrilamida-bisacrilamida 37,5:1 40%; 1,75 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 25 µl SDS 20%; 25 µl APS 10%; 2,5 µl TEMED; 1,85 ml ddH₂O). En estos geles, se cargaron 5 µg de proteína por calle, junto con 5 µl de tampón de carga 1-De 2x (0,25 ml Tris-HCl 1 M pH 6,8; 0,4 ml SDS 20%; 0,4 ml glicerol; 60 µl de β-mercaptoetanol; 0,89 ml ddH₂O; azul de bromofenol).

Para correr los geles se utilizó tampón TGS (Tris-glicina-SDS; 25 mM Tris, pH 8,6; 192 mM glicina; 0,1% SDS) 1x y estos se corrieron primero a 70 V, hasta que el bromofenol estuviese en la parte inferior (resolución), y después a 120 V, hasta que el azul de bromofenol llegase hasta el borde inferior del gel.

Una vez separadas las proteínas en los geles, se preparó la membrana a la cual se transfirieron las proteínas. En primer lugar, esta se activó sumergiéndola en metanol 100% durante 1 minuto y, posteriormente, se estabilizó sumergiéndola en tampón de transferencia (25 mM tris; 192 mM glicina; metanol 20%; SDS 0,02%) durante 10 segundos. A continuación, se colocaron el gel y la membrana en la posición adecuada y se taparon con papel Whatman y esponjas, ambos previamente sumergidos en tampón de transferencia. La transferencia a la membrana se realizó primero a 300 mA durante 2.30 horas y, posteriormente, a 400 mA durante 30 minutos.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se bloquearon las uniones inespecíficas dejando la membrana en solución de bloqueo (2% leche desnatada en polvo p/v; 0,05% Tween 20 en tampón PBS) durante toda la noche a 4 °C y en agitación. A continuación, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios y a la dilución apropiada a 4 °C durante 2 horas. En este caso cada membrana se incubó con dos anticuerpos: un anticuerpo para una de las tres marcas epigenéticas estudiadas, la H3K4me3, la H3K9me3 y la histona H4ac, a una concentración 1:3.000, y un anticuerpo para la actina, el cual se utilizó para normalizar los datos, a una concentración 1:5.000.

Tras el tiempo de incubación, se eliminaron los restos de anticuerpo primario no unido mediante 3 lavados consecutivos con solución de lavado (leche desnatada en polvo 0,2% p/v, Tween 20 0,5% en tampón PBS) de 10 minutos de duración y en agitación. Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y en una dilución 1:1.000 en tampón de bloqueo.

A continuación, se revelaron las bandas incubando las membranas con tampón de revelado, el cual contiene 50 µl de NBT (azul de nitrotetrazolio) y 50 µl BCIP (bromocloroindolil fosfato) en 10 ml de tampón de fosfatasa alcalina (100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100mM Tris pH 9,5) durante 15 – 30 minutos en agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron con solución PBS-EDTA, ácido etildiaminotetraacético, (500 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0 para 50 ml de PBS) para eliminar el color de fondo.

El valor número de la intensidad de las bandas se obtuvo utilizando el programa informático Fiji y los datos numéricos de las modificaciones de las histonas se normalizaron con los datos numéricos de la actina. Finalmente, se realizó un ANOVA con el programa RStudio para comprobar si había diferencias significativas de manera general y, posteriormente, un test Tukey para comprobar los tratamientos que eran significativamente diferentes entre sí.

2.4 Análisis de los niveles de metilación del ADN

2.4.1 Extracción de ADN

Se homogeneizaron 125 – 150 mg de acículas en mortero utilizando nitrógeno líquido. Inmediatamente se añadieron a cada tubo 800 µl de tampón de extracción previamente calentado (2% CTAB, bromuro de hexadeciltrimetilamonio; 2 M NaCl; 50 mM EDTA pH 8,0; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 2% PVP, polivinilpirrolidona, 40000; 8 mM ácido ascórbico; 5 mM DIECA, ácido dietilditio carbámico) y 7 µl de 13,4 M β-mercaptoetanol. Las muestras se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos a 65 °C. A continuación, se centrifugaron 5 minutos a 5.000 x g para separar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo, se le añadieron 500 µl de cloroformo:isoamil alcohol (24:1) y se mezcló por inversión para formar una emulsión. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 7.500 x g y la fase acuosa resultante, la cual se corresponde con la superior, se transfirió a un nuevo tubo. Posteriormente, se añadieron 2,5 µl de RNasa A (20 mg ml⁻¹) y se realizó una incubación de 20 minutos a 37 °C. Una vez finalizada la incubación, las muestras se lavaron con cloroformo:isoamil alcohol dos veces más de la misma forma que la descrita anteriormente. A continuación, el ADN se precipitó mediante la adición de un volumen de isopropanol y una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 12.000 x g. Seguidamente, se decantó el sobrenadante cuidadosamente y el precipitado se lavó con 700 µl de etanol frío al 70% y se recuperó tras una centrifugación de 10 minutos a 11.000 x g y a 4 °C. Finalmente, el precipitado se secó y el ADN se resuspendió en ddH₂O (Valledor et al. 2009).

2.4.2 MS-RAPD-PCR

Primeramente, se probaron dos series de cebadores de la casa comercial Operon, llamadas OPH y OPC y compuestas ambas por 20 cebadores, para comprobar cuáles amplificaban en la especie en estudio. Además, también se probaron tres concentraciones de MgCl₂ distintas (2,5 mM, 3,5 mM y 4,5 mM) para comprobar cuál era la óptima para cada cebador. De estos finalmente se utilizaron 13 cebadores (OPC: 2, 5, 8, 10, 11; OPH: 3, 4, 5, 7, 12, 13, 18, 20), cuyas secuencias se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados de las series OPC y OPH.

OPC		OPH			
2	GTGAGGCGTC	3	AGACGTCCAC	13	GACGCCACAC
5	GATGACCGCC	4	GGAAGTCGCC	18	GAATCGGCCA
8	TGGACCGGTG	5	AGTCGTCCCC	20	GGGAGACATC
10	TGTCTGGGTG	7	CTGCATCGTG		
11	AAAGCTGCGG	12	ACGCGCATGT		

A continuación, las muestras se digirieron con las enzimas de restricción *MspI* y *HpaII*, en un volumen final de 20 μ l, de los cuales 1 μ l se correspondía con la enzima, 2 μ l con el tampón de esta y el resto con los microlitros necesarios para tener 350 ng de ADN y agua hasta completar el volumen total. Esta reacción se llevó a cabo en un termociclador a 37 °C durante 14 horas y, posteriormente, a 80°C durante 5 minutos para inactivar la actividad enzimática. Se escogieron estas dos enzimas de restricción debido a que cortan la misma secuencia (5' C/CGG 3'), con la diferencia de que no actúan en las mismas condiciones de metilación. Cuando no hay metilación en la secuencia de corte, ambas enzimas actúan, mientras que si la secuencia se encuentra hipermetilada, es decir, contiene sus dos citosinas metiladas, ninguna de las dos enzimas actúa. Sin embargo, cuando la citosina interna se encuentra metilada, *HpaII* no es capaz de cortar. Por el contrario, *MspI* no es capaz de actuar cuando la secuencia se encuentra hemimetilada, es decir, presenta los grupos metilo en una de las dos hebras (Figura 2). De esta manera, al utilizar ambas enzimas se pueden observar diferencias en los niveles de metilación.

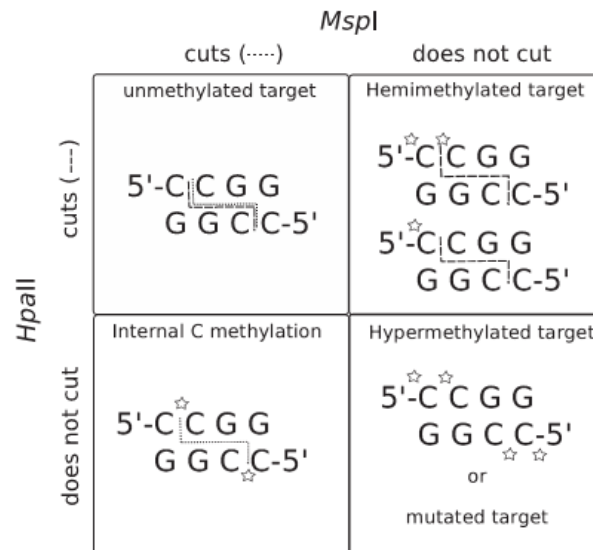


Figura 2. Especificidad de corte de las enzimas de restricción *MspI* y *HpaII*. Tomado de Pérez-Figueroa 2013.

A continuación, se prepararon placas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en las cuales cada pocillo contenía 20 μ l de mezcla de reacción (2 μ l tampón de la polimerasa; 2 μ l $MgCl_2$; 0,5 μ l polimerasa 4 U/ μ l; 1 μ l muestra; 0,15 μ l cebador y 12,35 μ l H_2O). El programa de esta PCR consistió en un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos y 48 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante un minuto, hibridación del cebador a 29 °C durante un minuto (rampa 1,5 °C cada segundo) y extensión a 72 °C durante un minuto. Los productos de las reacciones se observaron en geles de agarosa al 1% preparados con tampón TAE, tris-acetato-EDTA, (Tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM).

Una vez obtenidas todas las fotos de los geles de agarosa, se comprobó el patrón de cada individuo para cada banda de amplificación, para lo cual se asignó un 1 en el caso de la presencia de la banda y un 0 en el caso de su ausencia. De esta forma, se asignó a

cada individuo un patrón formado por dos números, el primero correspondiente a la presencia o la ausencia de la banda en la digestión con MspI y el segundo a la presencia o ausencia de la banda en la digestión con HpaII.

Posteriormente, se elaboró un patrón general con los datos de los tres individuos de cada tratamiento tomando el patrón de corte de cada enzima de restricción que apareciesen en al menos dos de ellos. Este patrón general se utilizó para observar los cambios entre cada tratamiento y el siguiente, es decir, el control con 2h1d, 2h1d con 8h1d, 8h1d con 8h2d y 8h2d con 8h2dR, según indica la figura 3.

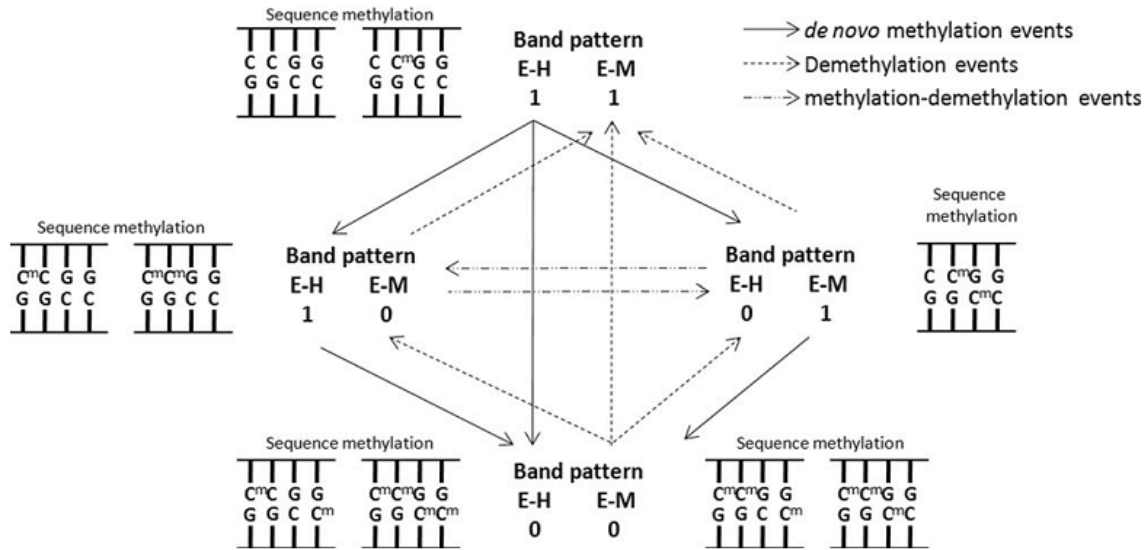


Figura 3. Interpretación de los resultados obtenidos tras la digestión con MspI y HpaII. Tomado de González et al. 2007.

3 RESULTADOS

3.1 Análisis de las PTMs de las histonas

3.1.1 ELISA

3.1.1.1 Especificidad de los anticuerpos

Las membranas de los Western Blot realizados para comprobar la especificidad de los anticuerpos que se utilizaron posteriormente para analizar las PTMs de las histonas mediante ELISA se muestran en la figura 4. Los anticuerpos para la H3K4me3 y la H3K9me3 habían sido comprobados con anterioridad (Valledor et al. 2010), de manera que se utilizaron los anticuerpos para la H3K27me3, la H3ac y la H4ac.

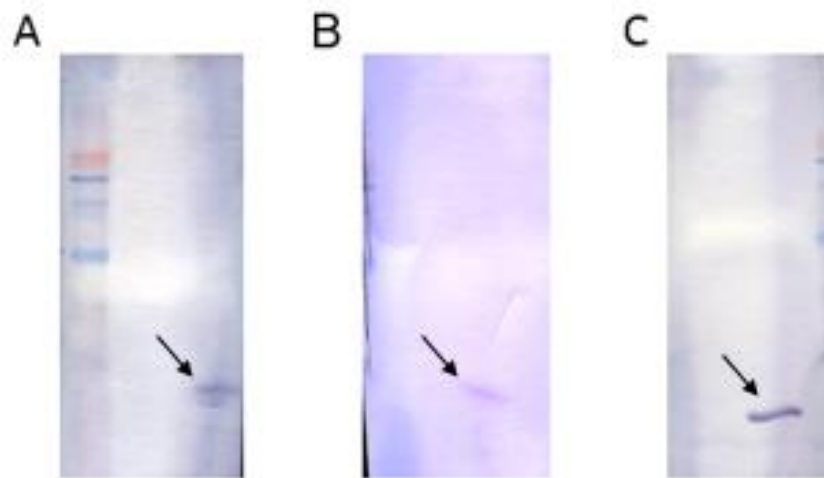


Figura 4. Western Blot realizado con el anticuerpo para la H3K27 (A), H3ac (B) y H4ac (C).

Como se puede observar, únicamente se obtuvo una banda con cada uno de los anticuerpos probados, lo que indica que son específicos para la marca epigenética frente a la cual reaccionan.

3.1.1.2 PTMs de las histonas

En primer lugar, se realizó un ELISA para observar los cambios en cinco marcas epigenéticas, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3ac y H4ac. La figura 5 representa el valor promedio de las marcas epigenéticas normalizadas con los niveles de la histona H3. De manera general, no se aprecia una única tendencia en estas marcas, pues por ejemplo la H3K27me3 es aparentemente estable, mientras que la H3K9me3 aumenta en 2h1d con respecto al control y desciende en los tratamientos de 8 horas.

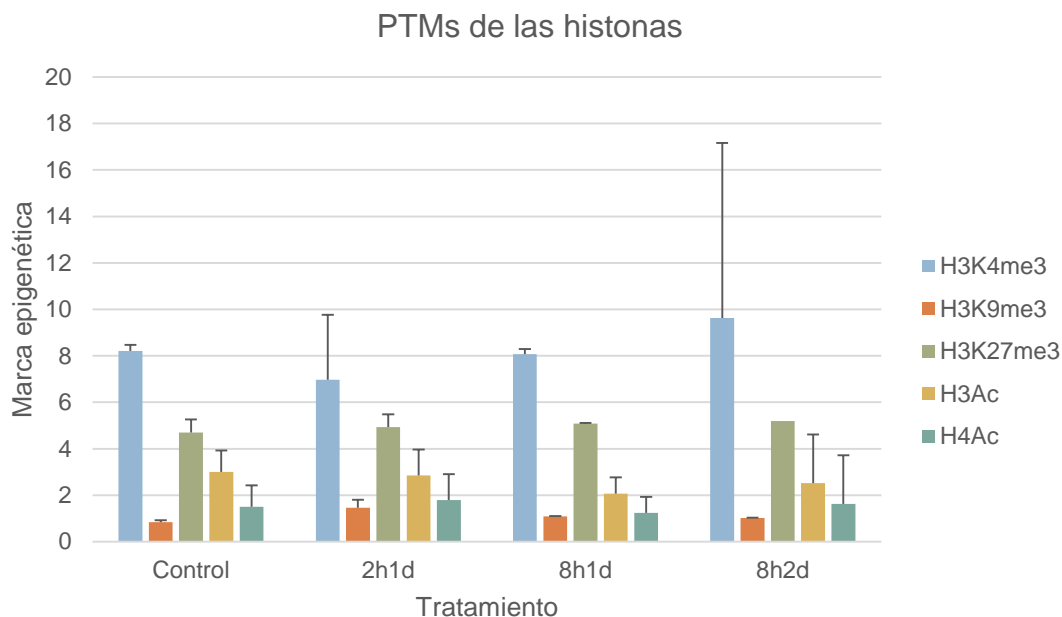


Figura 5. Representación gráfica de los valores promedio de las marcas epigenéticas estudiadas.

En la tabla 2 se muestran los p-valores obtenidos tras realizar un ANOVA. Estos valores en todos los casos son superiores a 0,05, por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en ninguna de las marcas epigenéticas estudiadas.

Tabla 2. Valores promedio de las modificaciones de las histonas (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me, H3Ac y H4Ac) normalizadas con la H3 y p-valor asociado a cada marca obtenido tras un ANOVA.

	Control	2h1d	8h1d	8h2d	p-valor
H3K4me3	8,214	6,966	8,071	9,631	0.6453
H3K9me3	0,845	1,465	1,091	1,023	0.5666
H3K27me3	4,699	4,930	5,085	5,196	0.9558
H3Ac	2,999	2,854	2,071	2,519	0.9184
H4Ac	1,494	1,795	1,241	1,628	0.7565

3.1.2 Western Blot

Debido a que los resultados del ELISA no fueron los esperados, se realizó un Western Blot, pero en este caso sólo se analizaron tres marcas (H3K4me3, H3K9me3 y H4ac). En la figura 6 se muestran las membranas de los Western Blot realizados para analizar las marcas epigenéticas H3K4me3, H3K9me3 y H4ac.

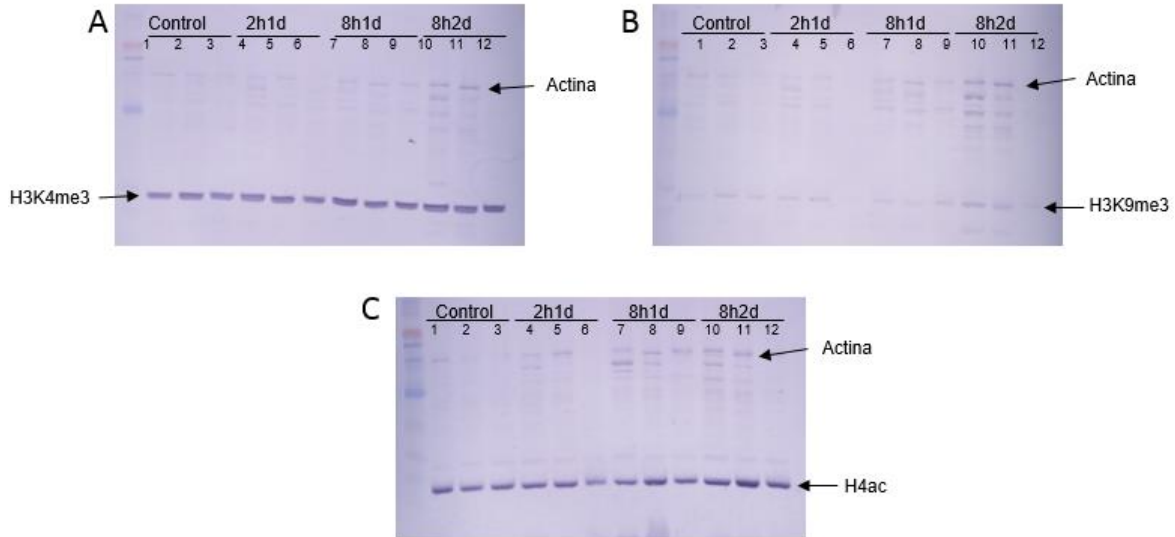


Figura 6. Western Blot de las PTMs de las histonas. A. H3K4me3. B. H3K9me3. C. H4ac.

En la figura 7 se muestran gráficamente los valores promedios de las tres marcas epigenéticas. De manera general, se produce un descenso en estas tres marcas epigenéticas. En el caso de la H3K4me3, las diferencias se encuentran entre el control y los tratamientos de 8 horas, el tratamiento de 2h1d con los tratamientos de 8 horas y entre ambos tratamientos de 8 horas. Para la H3K9me3 se observan diferencias entre el control y los tratamientos de 8 horas y entre 2h1d y los tratamientos de 8 horas. Finalmente, la H4ac presenta diferencias significativas entre el control y los tres tratamientos.

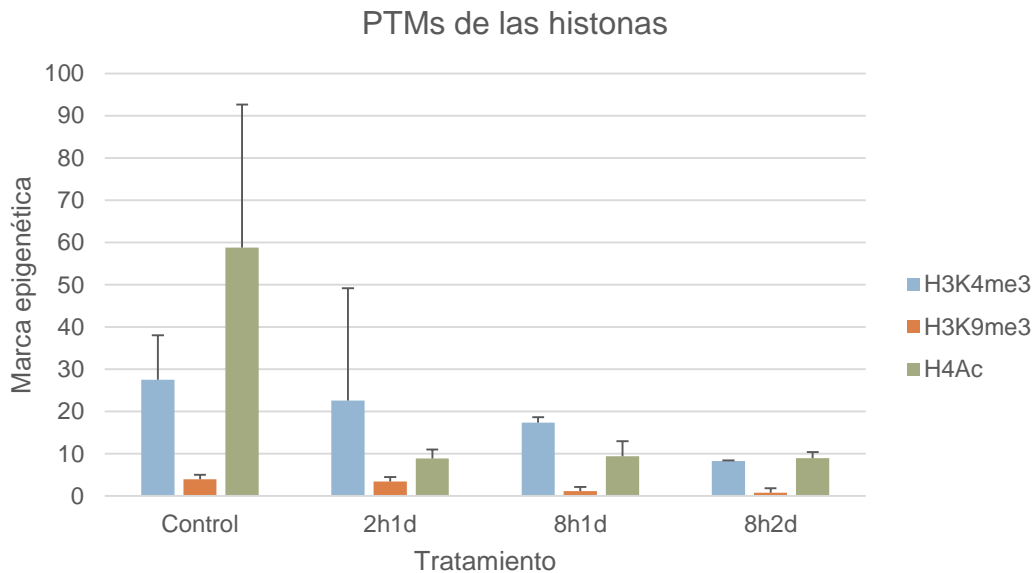


Figura 7. Representación gráfica de los valores promedio modificaciones de las histonas correspondientes normalizado con la actina.

En la tabla 3 se muestran los valores promedios de las distintas marcas epigenéticas estudiadas, normalizadas con la actina, así como los p-valores obtenidos con un ANOVA para cada una de estas marcas. En este caso, todos los p-valores obtenidos son menores a 0,05, por lo que en las tres marcas se producen diferencias son estadísticamente significativas.

Tabla 3. Valores promedio de las modificaciones de las histonas (H3K4me3, H3K9me3 y H4Ac) normalizadas con la actina y p-valor asociado a cada marca obtenido tras un ANOVA.

	Control	2h1d	8h1d	8h2d	p-valor
H3K4me3	27,468	22,551	17,361	8,292	0.00844 **
H3K9me3	3,984	3,445	1,122	0,800	0.009306 **
H4Ac	58,744	8,905	9,383	8,959	4.523e-06 ***

Finalmente, en la tabla 4 se muestran los resultados del Test de Tukey. Este test indica entre qué tratamientos se encuentran las diferencias estadísticamente significativas, las cuales no coinciden en todos los casos con las diferencias observadas en la figura 7. En el caso de la H3K4me3, los valores obtenidos entre el control y 8h2d son significativamente diferentes, así como los valores obtenidos entre 2h1d y 8h1d. Para la H3K9me3 las diferencias se encuentran entre el control y los dos tratamientos de 8 horas. Finalmente, la H4ac es significativamente diferente entre el control y los tres tratamientos.

De manera general, estos datos indican que en todas las marcas se producen cambios entre el control y, al menos, el tratamiento 8h2d.

Tabla 4. Resultados del Test de Tukey.

Tukey	K4	K9	H4Ac
8h1d-2h1d	0,6044839	0,1013560	0,9994299
8h2d-2h1d	0,0334649	0,0612974	0,9999992
Control-2h1d	0,6417371	0,9151167	0,0000112
8h2d-8h1d	0,1975460	0,9715849	0,9996018
Control-8h1d	0,1394970	0,0263949	0,0000121
Control-8h2d	0,0067659	0,0156514	0,0000113

3.2 Análisis de los niveles de metilación del ADN

3.2.1 MS-RAPD-PCR

En la tabla 5 se muestra el recuento de los cuatro patrones obtenidos tras la amplificación con los 13 cebadores aleatorios utilizados en las muestras previamente digeridas con MspI y HpaII.

Tabla 5 .Número total de patrones obtenidos tras el tratamiento con MspI y HpaII, correspondientemente, y la posterior amplificación aleatoria.

1-1	1-0	0-1	0-0	Constantes	Total
534	104	133	673	25	1469
36,35 %	7,08 %	9,05 %	45,81 %	1,70 %	

A continuación, en la tabla 6, se muestran los eventos epigenéticos correspondientes a los cambios entre pares de tratamientos consecutivos.

Tabla 6. Número total de eventos epigenéticos observados mediante la realización de los RAPDs.

Metilación <i>de novo</i>	Desmetilación	Metilación-desmetilación	Constantes	Total
57	54	10	345	466
12,33 %	11,59 %	2,15 %	74,03 %	

Los resultados obtenidos muestran que, de manera general, los eventos de metilación *de novo*, de desmetilación y de metilación-desmetilación son poco frecuentes en dichas secuencias, ya que el número de secuencias en las que no se produjeron cambios es considerablemente más alto que el número total de los tres eventos. De entre los tres eventos, la metilación *de novo* se observó en un número prácticamente similar a la desmetilación, mientras que los eventos de metilación-desmetilación fueron escasos.

Finalmente, en la figura 8 se muestra un ejemplo de los resultados visualizados en los geles de agarosa, en la cual se señala una de las bandas diferenciales de interés en un recuadro. Esta banda aparece en todos los individuos de los tratamientos 8h2d y 8h2dR y en ambas enzimas, pero no aparece en los individuos del tratamiento 8h1d, así como en algunos individuos control y del tratamiento 2h1d.

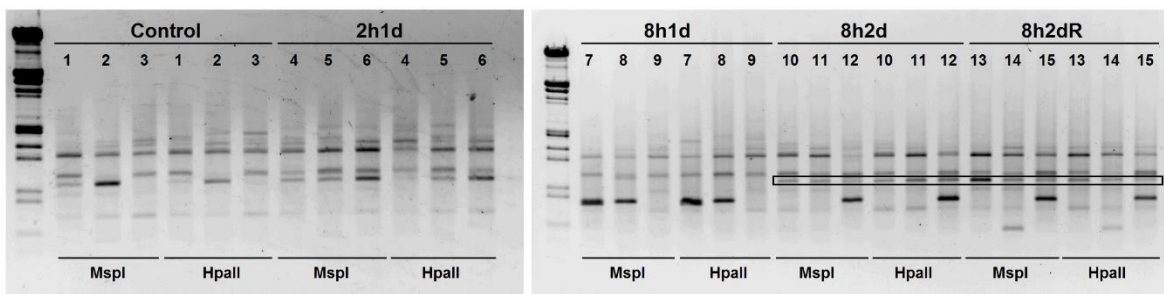


Figura 8. MS-RAPD-PCR realizado con el cebador OPH 20.

4 DISCUSIÓN

Para las plantas, la transducción de la información ambiental que reciben hacia el interior de sus células es un proceso de gran importancia para la expresión de numerosos genes. En la actualidad, la disminución de la capa de ozono como resultado de las actividades humanas está provocando un aumento en los niveles de radiación UV-B que llegan a la superficie del planeta. La mayoría de las especies vegetales no están adaptadas a estos nuevos niveles de UV-B y no son capaces de responder a ellos de manera constante, por lo que utilizan distintos mecanismos, como la reparación del ADN, la producción de moléculas capaces de absorber UV-B, como por ejemplo los flavonoides, o de compuestos capaces de eliminar las ROS (Brosche & Strid 2003). Para que estos mecanismos de defensa puedan tener lugar, deben actuar numerosos genes, los cuales normalmente están regulados por mecanismos epigenéticos (Zhu et al. 2012). La regulación epigenética permite acoplar las señales externas con la expresión génica de una manera rápida y reversible, razón por la cual se ha propuesto que su papel en la respuesta al estrés es fundamental (Mirouze & Paszkowski 2011).

A pesar de tener una clara importancia, el estudio de la exposición a UV-B en plantas es escaso, especialmente en el caso de las especies forestales, las cuales presentan una gran implicación tanto ecológica como económica. En este trabajo se ha conseguido establecer el perfil epigenético de ciertas marcas epigenéticas de *P. radiata* D. Don en la respuesta a estrés UV-B, dando lugar a una base sobre la que trabajar en un futuro.

En primer lugar, se realizó un ELISA para analizar la evolución de cinco marcas epigenéticas (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3ac y H4ac). Sin embargo, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, lo cual puede estar debido al amplio rango obtenido entre los datos de un mismo tratamiento, lo que a su vez puede deberse a algún fallo del método o la existencia de una variación en las marcas epigenéticas entre individuos considerable.

Debido a que no se observaron diferencias con el ELISA, se realizó un Western Blot para tres de las anteriores marcas epigenéticas (H3K4me3, H3K9me3 y H4ac). Los datos obtenidos muestran en todos los casos un descenso de la marca respecto al nivel control en, al menos, el tratamiento 8h2d.

La H3K4me3 es una marca epigenética característica de la eucromatina, por lo que se asocia con la activación de la transcripción (Tittel-Elmer et al. 2010). En este estudio, esta marca epigenética experimentó una disminución, la cual es significativa entre los individuos control y aquellos que fueron tratados 8h2d y entre 2h1d y 8h2d. Esto indica una pérdida de eucromatina abierta, lo que debería relacionarse con una disminución en la transcripción. Por contrario, la H3K9me3 es una marca represiva, ya que se asocia a heterocromatina restrictiva (Tittel-Elmer et al. 2010). En este ensayo, la H3K9me3 experimentó una disminución entre los individuos control y aquellos que fueron tratados 8 horas, tanto un día como dos, lo que significa que la represión descende y, por lo tanto, estaría indicando un aumento en la transcripción.

Por otra parte, la acetilación de la histona H4, una marca epigenética relacionada con la activación de la transcripción (Bannister & Kouzarides 2011), experimentó un gran descenso entre los individuos control y todos los que fueron tratados. Por esta razón, la acetilación de la H4 podría estar indicando que en la respuesta a UV-B se produce un descenso en la transcripción.

En la actualidad, la relación entre las proteínas que se encargan de las modificaciones de la cromatina y las respuestas a la exposición a UV-B no está clara (Casati et al. 2006). Aunque generalmente se asocia el estrés con la represión de la transcripción, los resultados obtenidos muestran que no sólo ocurre esto, sino que también tiene lugar la activación de ciertos genes. La pérdida de H3K9me3, lo que se asocia con un aumento de la transcripción, podría estar relacionada con la actuación de genes necesarios en la respuesta a estrés por UV-B. Por ejemplo, Brosche & Strid, en 2003, observaron un incremento en la expresión de los genes de la ruta biosintética del fenilpropanoide y los flavonoides tras la exposición a UV-B. Esto se debe a que las proteínas de esta ruta son necesarias para la síntesis de estos pigmentos, los cuales son capaces de absorber radiación UV, por lo que constituyen uno de los principales mecanismos de defensa en este estrés. Además, también observaron un aumento en la expresión de genes del metabolismo primario que proporcionan los precursores necesarios para la síntesis de estos compuestos (Brosche & Strid 2003).

La activación de la transcripción que indica la pérdida de H3K9me3 también podría estar asociada a genes relacionados con los propios mecanismos epigenéticos, algunos de los cuales se ha demostrado que aumentan su expresión en este estrés. Por ejemplo, Valledor et al., en 2012, observaron un aumento de la expresión de *MSI1*, un gen que codifica para una proteína de unión al retinoblastoma que recientemente se ha relacionado con la activación de genes improntados mediante el silenciamiento de *MET1*, en plantas que fueron expuestas a UV-B. Este aumento en la expresión de *MSI1*, además, podría estar relacionada con la expresión de genes responsables de la respuesta fotoprotectora (Valledor et al. 2012), necesaria para enfrentar las radiaciones de UV altas.

Por otra parte, la caída en la transcripción que indica la disminución de la H3K4me3 y la H4ac también podría estar asociada con la disminución en la transcripción de ciertos genes. Un ejemplo podrían ser aquellos genes que producen proteínas implicadas en la fotosíntesis, los cuales se ha observado que disminuyen su transcripción como consecuencia de la exposición a radiación UV. Otro grupo de genes que también disminuye su actividad como consecuencia de la exposición a esta radiación, de manera transitoria, son aquellos que están implicados en la regulación del ciclo celular. Al detener el ciclo celular, se estaría evitando que las células hijas heredasen mutaciones de las células madre causadas por la radiación UV-B (Brosche & Strid 2003).

Además, se ha observado en ciertos estreses que la H3K4me3 se relaciona con la transcripción de genes necesarios en la respuesta a dichos estreses. Por ejemplo, se ha observado que la H3K4me en los nucleosomas de genes inducibles por estrés se relaciona con la respuesta a estrés por deshidratación o que la H3K4me3 está

directamente relacionada con la activación de genes sensibles a sequía (Dhar et al. 2014). Por ello, podría ser que las marcas H3K4me3 que se mantienen en este estrés, o que aparecen como resultado del mismo, estén relacionadas con la activación de genes sensibles a la radiación UV-B o responsables de la respuesta defensiva frente a esta.

Otro aspecto que es interesante destacar es la velocidad con la que cambian estas marcas epigenéticas. Mientras que la trimetilación de las lisinas K9 y K4 cambia, respectivamente, en los tratamientos de 8h1d y 8h2d, la acetilación de la histona H4 disminuye significativamente tras sólo dos horas de exposición a UV-B. Esto podría estar indicando que los mecanismos por los cuales se desacetila la histona H4 se activan de una manera más rápida y actúan más eficientemente, ya que los niveles descienden 6,6 veces tras dos horas de tratamiento y se mantienen de esta forma en las demás exposiciones. Sin embargo, esta rápida y considerable disminución de la acetilación también podría deberse a que los mecanismos de acetilación y desacetilación cumplieren un papel más importante para la respuesta al estrés UV-B que los mecanismos de metilación y desmetilación de las lisinas.

Por otra parte, el estrés puede provocar tanto la hipometilación como la hipermetilación del ADN (Dhar et al. 2014). Por ejemplo, Kovařík et al. en 1997 observaron la hipermetilación de dos *loci* de heterocromatina de células de tabaco en suspensión que habían sido sometidas a estrés osmótico (Kovařík et al. 1997). En cambio, en 2007, Choi y Sano observaron la hipometilación del gen *NtGPD*L (*Glycerophosphodiesterase-like protein*) de tabaco en distintos tipos de estrés (por exceso de aluminio, sal, frío y *paraquat*) (Choi & Sano 2007).

La metilación de las citosinas del ADN es un evento epigenético que se asocia con la represión génica. Al igual que ocurre con las PTMs de las histonas, los eventos de metilación observados indican que se produce tanto activación como represión génica, ya que se obtuvieron tanto desmetilaciones como metilaciones respectivamente. Esto, nuevamente, puede estar asociado a la necesidad de activar ciertos genes, como por ejemplo los relacionados con la síntesis de flavonoides, como se explicó anteriormente, y de detener la actividad de otros, como podrían ser los genes de la fotosíntesis o del ciclo celular.

Además, otro aspecto que debería considerarse con respecto al análisis de la metilación realizado es que sólo tiene en cuenta la metilación en islas CG que se encuentran en las secuencias de los cebadores y, además, en plantas la metilación puede ocurrir también en secuencias CHG o CHH, por lo que sería interesante medir los niveles de metilación en estas secuencias también. De esta manera se tendría una visión global de los niveles de metilación en este estrés y ver así si en *P. radiata* ocurre una hipermetilación global al igual que ocurre en *P. silvestris* (Pascual et al. 2014).

Una vez realizados estos RAPDs sensibles a metilación, el siguiente paso a seguir consistiría en conocer las secuencias de las bandas que se corresponden con eventos de metilación o desmetilación. Para ello, habría que purificar las bandas a partir del gel de agarosa en el que se visualizaron, clonarlas en un vector y enviarlas a secuenciar. De

esta forma, podría conocerse las secuencias en las que están ocurriendo cambios en la metilación como respuesta al UV-B y así saber qué genes concretos están experimentando estos cambios.

De esta forma, las marcas epigenéticas experimentan cambios en la respuesta a estrés UV-B en *P. radiata*, tanto las PTMs de las histonas estudiadas como la metilación de las secuencias CG.

Este trabajo es una primera aproximación a este estudio, en el que se ha logrado alcanzar los objetivos planteados, a pesar de haber tenido que cambiar el método de análisis de las PTMs de las histonas. Es necesario continuar investigando los perfiles epigenéticos en la respuesta a este estrés, así como profundizar en los genes en los que estos cambios epigenéticos ocurren. De esta manera, en un futuro próximo podremos conocer los mecanismos epigenéticos por los cuales las plantas responden a la radiación UV-B. Esto permitiría aportar datos relevantes que permitan realizar un manejo adecuado de especies forestales de interés e incrementar su supervivencia y productividad en el actual contexto de cambio climático, especialmente en las regiones en las que se está produciendo un incremento importante de la cantidad de radiación UV, potencialmente dañina para todos los seres vivos.

5 CONCLUSIONES

1. Los perfiles epigenéticos en plantas de *P. radiata* confirman la relevancia de las modificaciones epigenéticas en la respuesta al estrés UV-B.
2. El sistema experimental diseñado en *P. radiata* es adecuado para realizar estudios epigenéticos en la respuesta a estrés UV-B.
3. Las PTMs de las histonas cumplen un papel fundamental en la respuesta al estrés UV-B, experimentando una disminución tanto en la marca represiva estudiada (H3K9me3), como en las marcas permisivas estudiadas (H3K4me3 y H4ac).
4. La metilación del ADN también cumple un papel fundamental en la respuesta al estrés UV-B, presentando un equilibrio entre la metilación y la desmetilación.
5. Según los resultados obtenidos, en la respuesta al estrés UV-B, tendría lugar la activación de ciertos genes y la represión de otros. Sin embargo, este trabajo no permite conocer qué genes se activan y qué genes se reprimen, por lo que es necesario realizar estudios posteriores que profundicen en el conocimiento de las modificaciones epigenéticas en la respuesta al estrés UV-B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bannister, A.J., & Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), pp.381–395.
- Besteiro, M.; Bartels, S.; Albert, A.; Ulm, R. 2011. Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *Plant Journal*, 68(4), pp.727–737.
- Brosche, M., & Strid, A. 2003. Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum*, 117(1), pp.1–10.
- Brown, B.; Cloix, C.; Jiang, G.H.; Kaiserli, E.; Herzyk, P.; Kliebenstein, D.J.; Jenkins, G.I. 2005. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), pp.18225–18230.
- Casati, P.; Stapleton, A.E.; Blum, J.E.; Walbot, V. 2006. Genome-wide analysis of high-altitude maize and gene knockdown stocks implicates chromatin remodeling proteins in response to UV-B. *Plant Journal*, 46(4), pp.613–627.
- Choi, C.S., & Sano, H. 2007. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(5), pp.589–600.
- Colaneri, A.C., & Jones, A.M. 2013. Genome-Wide Quantitative Identification of DNA Differentially Methylated Sites in Arabidopsis Seedlings Growing at Different Water Potential. *PLoS ONE*, 8(4).
- Dhar, M.K.; Vishal, P.; Sharma, R.; Kaul, S. 2014. Epigenetic Dynamics: Role of Epimarks and Underlying Machinery in Plants Exposed to Abiotic Stress. *International Journal of Genomics*, 2014.
- González, A.I.; Alaiz, V.; Polanco, C.; Ruiz, M.L. 2007. Análisis del estado de metilación en plantas de centeno obtenidas por embriogénesis somática. VII reunión sociedad española de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Fundación General de la Universidad de Alcalá. Pp 135-136.
- Han, S.K., & Wagner, D. 2014. Role of chromatin in water stress responses in plants. *Journal of experimental botany*, 65(10), pp.2785–2799.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), pp.693–705.
- Kovařík, A.; Koukalová, B.; Bezděk, M.; Opatrný, Z. 1997. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(1-2), pp.301–306.
- Liley, J.B., & McKenzie, R.L. 2006. Where on Earth has the highest UV? *National Institute of Water and Atmospheric Research (NIWA)*, pp.2–3.
- Madlung, A., & Comai, L. 2004. The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany*, 94(4), pp.481–495.
- Mead, D.J. 2013. Sustainable management of Pinus radiata plantations. *FAO Forestry Paper*, 170, pp.2–6.

- Mirouze, M., & Paszkowski, J. 2011. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), pp.267–274.
- Pascual, J.; Cañal, M.J.; Correia, B.; Escandón, M.; Hasbún, R.; Meijón, M.; Pinto, G.; Valledor, L. 2014. 8. Can Epigenetics Help Forest Plants to Adapt to Climate Change? In *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*. pp. 125–146.
- Pérez-Figueroa, A. 2013. msap: A tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. *Molecular Ecology Resources*, 13(3), pp.522–527.
- Tittel-Elmer, M.; Bucher, E.; Broger, L.; Mathieu, O.; Paszkowski, J.; Vaillant, I. 2010. Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS Genetics*, 6(10), pp.1–11.
- Valledor, L.; Cañal, M.J.; Pascual, J.; Rodríguez, R.; Meijón, M. 2012. Early induced protein 1 (PrELIP1) and other photosynthetic, stress and epigenetic regulation genes are involved in *Pinus radiata* D. don UV-B radiation response. *Physiologia Plantarum*, 146(3), pp.308–320.
- Valledor, L.; Hasbun, R.; Rodriguez, R.; Cañal, M.J. 2009. RNA-free DNA Extraction Protocol from *Pinus* Tissues for Molecular Biology or HPCE/HPLC Analyses. *Journal Of Plant Biochemistry And Biotechnology*, 18(2), pp.229–232.
- Valledor, L.; Meijón, M.; Hasbún, R.; Cañal, M.J.; Rodríguez, R. 2010. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of in vitro organogenic capability. *Journal of Plant Physiology*, 167(5), pp.351–357.
- Zhu, Y.; Dong, A.; Shen, W.H. 2012. Histone variants and chromatin assembly in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(3-4), pp.343–348.