

## TESIS DOCTORALES

### **Regulación del proteoma y código epigenético durante el envejecimiento de acículas en *Pinus radiata* D. Don**

Realizada por Luis Valledor González en la Universidad de Oviedo, Área de Fisiología Vegetal, Grupo de Investigación EPIPHYSAGE, bajo la dirección de los Profesores Roberto Rodríguez Fernández (Universidad de Oviedo), María Jesús Cañal Villanueva (Universidad de Oviedo) y Jesús Valentín Jorrín (Universidad de Córdoba).

La defensa de la Tesis tuvo lugar el 29 de Mayo de 2009, en la Universidad de Oviedo.

<http://www.uniovi.es/epiphysage>

#### *1. Resumen*

La diferenciación de las acículas implica un conjunto complejo de procesos cuyo último fin es la formación de un órgano fotosintéticamente maduro. Este hecho implica cambios notables en expresión génica y en la acumulación diferencial de proteínas, procesos que deben estar regulados, entre otros, por mecanismos epigenéticos [1]. Las acículas inmaduras están caracterizadas por una baja diferenciación tisular, una gran capacidad de crecimiento y una cierta habilidad morfogenética, que permite la inducción organogénica *in vitro*, mientras que las acículas maduras, órganos fotosintéticamente activos, no poseen estas capacidades.

Se han comparado algunas modificaciones epigenéticas (metilación del ADN, histona H3 trimetilada en la Lys 4, histona H3 trimetilada en la Lys 9 e histona H4 acetilada) presentes en acículas inmaduras (1 mes de edad) y en acículas maduras (12 meses de edad), determinando tanto sus distintos niveles de expresión como su distribución histológica. Los niveles de acumulación histona H4 acetilada e histona H3 trimetilada en la Lys 4, asociadas a la expresión génica, fueron superiores en las acículas inmaduras mientras que la metilación del ADN y la

trimetilación de histona H3 en la Lys 9, asociados a la represión de la expresión génica, fueron superiores en acículas maduras [2].

Se estudiaron que genes y proteínas se expresan de forma diferencial durante el desarrollo de las acículas para obtener un listado de genes candidatos susceptibles de estar regulados por mecanismos epigenéticos. Para ello se caracterizó y comparo un subtranscriptoma y subproteoma de acículas inmaduras y maduras. Para el estudio proteómico se definió un protocolo de extracción y diseño experimental suficientemente resolutivo [3] que permitió definir 856 spots de los cuales 280 mostraron diferencias de volumen entre los distintos tipos de muestras analizadas [4]. Los análisis transcriptómicos (obtención de dos bibliotecas sustractivas y determinación de la expresión diferencial mediante dot blotting y qPCR) permitieron describir 176 genes cuya expresión es diferencial entre acículas maduras e inmaduras [4]. El análisis conjunto de los datos transcriptómicos y proteómicos permite tener una visión general sobre los mecanismos bioquímicos relacionados con la maduración de las acículas. Genes y proteínas relacionados con procesos fotosintéticos son mayoritarios en las acículas maduras mientras que aquellos relacionados con biosíntesis, división celular y diferenciación dominan los perfiles ómicos de las acículas inmaduras.

De los grupos funcionales descritos anteriormente se seleccionaron cinco genes relacionados con fotosíntesis (RBCA), regulación de la expresión génica (*MSII*, *CSDP2*), elongación foliar (*CYP78A7*) y stress (*SHM4*) para estudiar su posible regulación epigenética. Todos los genes estudiados mostraron modificaciones post traduccionales de histonas diferenciales (detectadas mediante inmunoprecipitación de cromatina). Además *CYP78A7* y *CSDP2* mostraron patrones de metilación del ADN específicos en su promotor asociados a distintos niveles de expresión génica en los distintos tejidos en los que se estudió (acículas inmaduras, maduras y callo). Este trabajo constituye la primera descripción de una regulación epigenética sitio-específica en coníferas [5].

**Bibliografía:**

- [1] Valledor L, Hasbún R, Meijón M, Rodríguez JL, Santamaría E, Viejo M, Berdasco M, Feito I, Fraga MF, Cañal MJ, Rodríguez R. 2007. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91:75-86.
- [2] Valledor L, Meijón M, Hasbún R, Cañal MJ, Rodríguez R. 2009. 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*, in press.
- [3] Valledor L, Castillejo MA, Lenz C, Rodríguez R, Cañal MJ, Jorrin J. 2008. The 2-DE proteome of *Pinus radiata* needle tissue: analytical, biological variability and protein identification. *Journal of Proteome Research*, 7: 2616-2631.
- [4] Valledor L, Jorrín JV, Rodríguez JL, Lenz C, Rodríguez R, Cañal MJ. 2009. Proteome regulation and epigenetic code during *Pinus radiata* D. Don needle maturation. *Molecular and Cellular Proteomics*, under review.
- [5] Valledor L, Cañal MJ, Rodríguez R. 2010. Epigenetic regulation of RBCA, SHM4, CSDP2, CYP78A7 and MSI1 expression during *Pinus radiata* needle maturation. In preparation

*2. Reseña del Grupo de Investigación*

EPIPHYSAGE ([www.uniovi.es/epiphysage](http://www.uniovi.es/epiphysage)). Área de Fisiología Vegetal. Universidad de Oviedo.

*IPs: Dr. Roberto Rodríguez y Dra. M<sup>a</sup> Jesús Cañal.*

El envejecimiento de individuos y la maduración de órganos son procesos complejos que afectan positiva o negativamente a numerosas características de productividad, especialmente después del cambio de fase, limitando la propagación y manipulación de la organogénesis en la mayoría de especies de interés agroforestal. Puesto que el envejecimiento es reversible en plantas el interés científico del grupo se centra en: la determinación de indicadores (epi) genéticos y fisiológicos del envejecimiento y maduración que faciliten una mejor comprensión de los procesos de regulación implicados, y en consecuencia mediante la aplicación de bases científicas probadas, vencer las barreras limitantes de los procesos de clonación y amplificación de progenies mediante sistemas de inmersión temporal.

En la actualidad las líneas principales de investigación básica del grupo están enfocadas al estudio de la regulación epigenética gen-específica de la dormición y del desarrollo de semillas en *Castanea sativa* y al estudio de procesos productivos y respuestas a estrés ambiental (cambio climático) en *Pinus radiata* mediante el empleo de técnicas proteómicas, transcriptómicas y epigenéticas.

