

dada la hipersensibilidad de las plantas mutantes, son de esperar mayores diferencias en ambos proteomas. Así mismo es una herramienta útil para el análisis de diferentes mutantes, deficientes en distintas enzimas que median la transferencia de poder reductor del NADPH a los peróxidos, disponibles en nuestro grupo con objeto de identificar posibles rutas de detoxificación dependientes de NTRC.

Bibliografía

- Apel K, Hirt H. 2004. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.
- Dietz K-J. 2003. Annual Review of Plant Biology 54: 93-107.
- Pérez-Ruiz JM, Spinola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ. (2006). The Plant Cell 18: 2356-2368.

Serrato AJ, Pérez-Ruiz JM, Spinola MC, Cejudo FJ. (2004). Journal of Biological Chemistry 279: 43821-43827.

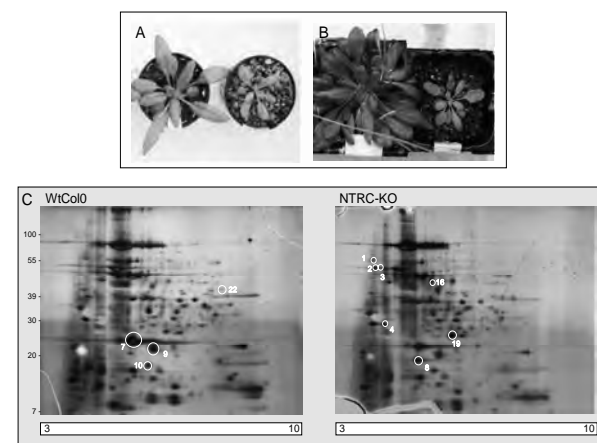


Figura 1. Análisis proteómico comparativo del estroma de plantas silvestres y deficientes en NTRC.

2DE vs cromatografía líquida ProteomeLab PF 2DE en embrión de trigo

Irar S¹, Brini F², Masmoudi K², Pagès M¹

(1) Servicio de Proteómica del CRAG, Av Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona. (2) Unidad de genética Molecular de plantas, Centro de Biotecnología de Sfax, Sidi Manssur Km6 3038. Sfax –Túnez

Introducción

Los avances tanto en la separación líquida de proteínas como los realizados en los sistemas de detección de proteínas han permitido desarrollar otras ideas para la separación de proteínas en dos dimensiones, este es el caso de la casa Beckman Coulter y su apuesta por un sistema de separación en dos dimensiones, acoplado a una cromatografía en gradiente de pH una segunda separación basada en la hidrofobicidad de las proteínas. (Wall, D. B., *et al.*, 2000) (Wall, D. B., *et al.*, 2001) (Wang, H., *et al.*, 2002). La elección de una metodología es crítica a la hora de estudiar mezclas complejas de proteínas como demostraremos en esta comunicación. Partiendo de una misma muestra, en este caso embrión maduro de trigo, hemos separado extractos totales de proteínas utilizando métodos convencionales 2DE y sistemas de cromatografía líquida (ProteomeLab PF 2DE) (Andrea, P., *et al.*, 2006). Nuestros resultados indican que ambas metodologías son complemen-

tarias y nos ayudan a tener una visión más amplia del Proteoma.

Material y métodos

Como material vegetal utilizamos embriones de trigo, (*Triticum durum Desf.*) de la variedad Oum Rabiaa, variedad tolerante a sal y sequía. Los embriones maduros se separan del endospermo. En mortero con nitrógeno líquido se trituran y se guardan hasta la extracción de proteínas a -80°C. (Brini, F., *et al.*, 2007)

- Extracción de proteínas para estudios 2DE: 150 mg de embriones de trigo se resuspenden en 1,2 ml de Tampón de lisis. (7 M Urea, 2 M Thiourea, 18 mM TrisHCl pH 8.0, 4% CHAPS, 1% Tritón X-100, suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas, DNasa y RNasa). Se incuban 20 min a 4°C. Se añade DTT 14 mM. Las muestras se cen-

trifugan a 35000g durante 10 min a 4°C. Se separa el sobrenadante y se cuantifica con BCA protein assay reagent kit (Pierce).

- Extracción de proteínas para ProteomeLab PF 2DE: 150 mg de embriones de trigo se resuspenden en 1,2 ml de tampón de lisis. (6 M Urea, 2 M Tiourea, 10% Glicerol, 50 mM TrisHCl pH 8.0, 2% octal-β-D-glucopyranoside, suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas, DNasa y RNasa). Las muestras se centrifugan a 35000g durante 10 min a 4°C. Se separa el sobrenadante y se cuantifica con BCA protein assay reagent kit (Pierce). A continuación se cambia el tampón de la muestra con columnas PD-10 (ProteomeLab PF 2DE kit, Beckman Coulter).
- Separación 2DE y separación mediante ProteomeLab PF 2DE: La separación 2DE se realizó siguiendo las indicaciones de (Irar. S., *et al* 2006) y la separación con ProteomeLab PF 2DE se realizó atendiendo a (Mónica, S., *et al*, 2005) modificando el tampón de lisis, no utilizamos TCEP y la cantidad inicial de proteínas que inyectamos fue de 2.5 mg.

Resultados y conclusiones

Concluimos que la cromatografía líquida es más resolutive a *pI* ácidos y básicos que la 2DE. Así mismo, la 2DE es más resolutive a *pI* entre 5.0-6.5. La segunda conclusión que sacamos es que el número de proteínas que se resuelve por ambos métodos es similar. Esto significa que ambas metodologías amplían la comprensión del proteoma de una muestra.

Bibliografía

- Andrea, P., Giovana, V., Aliosha, M., Nelson, M., J. Chromatogr. B 2006, 833, 91-100.
- Brini, F., *et al.*, Plant Science, 2007, 172, 20-28
- Irar, S., *et al.*, Proteomics, 2006, 6, S175-S185
- Mónica, S., Cecilia, S., Cristina, V., Fulvio, M., Vanesa, P., *et al*, Proteomics, 2005, 5, 2641-2647.
- Wall, D. B., Kachman, M. T., Gong, S., Hinderer, R. *et al.*, Anal. Chem. 2000, 72, 1099-1111.
- Wall, D. B., Parus, S. J., Lubman, D. M., J. Chromatogr. B 2001, 763, 139-196.
- Wang, H., Kachman, M. T., Schwartz, D. R., *et al.*, Electrophoresis 2002, 23, 3168-3181.

Identificación de dianas de S-nitrosilación durante la interacción planta-patógeno

Maldonado-Alconada AM¹, Ogueta-Villareal S², Martínez-Acedo P³, Martínez-Ruiz A⁴, Vazquez J³, Jorrín-Novo JV.¹

¹Grupo de Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agrícola, Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba; ²Unidad de Proteómica. Servicio Central de Apoyo a la Investigación. Universidad de Córdoba; ³Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid; ⁴Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC, Madrid

Introducción

El óxido nítrico es una molécula esencial en la regulación de numerosos procesos fisiológicos vegetales; concretamente, desempeña un papel crucial durante la señalización en las respuestas de defensa frente a patógenos y ejerce su papel principalmente a través de la modificación reversible de los grupos

tiolos de cisteínas (S-nitrosilación) (Delledonne, 2005). La identificación de las dianas de S-nitrosilación y de los residuos específicos implicados es un paso previo indispensable para conocer los mecanismos por los cuales esta molécula regula la activación de las respuestas de defensa en plantas. Con este objetivo se ha llevado a cabo el presente