

trabajo utilizando el sistema modelo *Arabidopsis thaliana*- *Pseudomonas syringae*.

Material y métodos

Se han preparado extractos proteicos a partir de suspensiones celulares y hojas de *Arabidopsis* sin tratar (controles), tratados con S-nitrosoglutatión (genera nitrosotioles *in vitro*) e infectadas con la bacteria *P. syringae* (Maldonado et al., 2002). Hemos usado el método del “biotin switch” (Jaffrey and Snyder, 2001) para purificar selectivamente proteínas y péptidos nitrosilados, añadiendo, en este último caso un paso adicional de digestión con tripsina previo a la purificación, que a su vez se ha llevado a cabo en condiciones reductoras o ácidas. El análisis se llevo a cabo mediante un sistema nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masas LTQ (ThermoFisher Scientific) (MS+MS/MS). La identificación de proteínas se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrixscience, UK).

Resultados y conclusiones

Hemos identificado un listado de proteínas candidatos de S-nitrosilación: *in vivo* (en respuesta a la infección bacteriana) e *in vitro* (en las muestras tratadas con S-nitrosoglutatión) que pertenecen a diversos grupos funcionales: proteínas relacionadas con las respuestas a estrés y defensa, señalización y regulación,

proteínas del citoesqueleto y enzimas del metabolismo. Muchas de estas proteínas han sido descritas previamente en *Arabidopsis* y en otros sistemas biológicos en el contexto de la regulación redox y S-nitrosilación. En paralelo y como parte del trabajo del “Nitroso-team” (grupo de trabajo cuyo objetivo es el estudio de este tipo de modificaciones en distintos sistemas biológicos) estamos desarrollando una metodología para identificar péptidos nitrosilados que permitiría identificar el residuo modificado. En el caso de la elución reductora todas las identificaciones positivas lo hacen con péptidos que contienen cisteínas; en el caso de la elución ácida, la cantidad de positivos disminuye drásticamente, lo cual era esperable debido a la fragmentación de la biotina, que en este caso queda unida a los residuos de cisteína. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la especificidad de la metodología utilizada y son indicativos de su viabilidad y potencial para el estudio del S-nitrosoproteoma en plantas.

Bibliografía

- Delledonne, M. *Curr. Opin Plant Biol.* 2005, 8: 390-396;
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R., Lamb, C., Cameron, C. *Nature* 2002, 419: 399-403;
- Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P., Snyder, S. H. *Nat Cell Biol* 2001, 3, 193-197.

Interacción de la tiorredoxina TrxA de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 con proteínas de membrana

Mata-Cabana A, Florencio FJ y Lindahl M.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Universidad de Sevilla. Avd. Américo Vespucio 49, 41092, Sevilla

Introducción

El intercambio ditiol/disulfuro de las cisteínas constituye la base molecular tanto para la regulación de una amplia variedad de actividades enzimáticas como para la transducción de señales celulares (Cooper et al., 2002). Por lo tanto, la búsqueda de proteínas con cisteínas reactivas y accesibles puede

contribuir a revelar nuevos mecanismos moleculares de dichos procesos. Las tiorredoxinas conforman una familia de enzimas con actividad redox que catalizan la reducción de enlaces disulfuro y ácidos sulfénicos de otras proteínas. Recientemente, la tiorredoxina de tipo *m*, TrxA, de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 se encontró asociada a membranas tilacoidales purificadas (Srivastava et

al., 2005). Debido a la dificultad del trabajo con proteínas de membrana, el estudio de éstas se ha pasado por alto en muchos análisis proteómicos sobre la interacción con tiorredoxinas (Meyer et al., 2005).

Materiales y métodos

En este trabajo hemos desarrollado un procedimiento para aislar proteínas de membrana que interaccionen con la tiorredoxina TrxA mediante la unión "in situ" a una tiorredoxina alterada (TrxAC35S), con una sola cisteína en el sitio activo, y con una secuencia adicional de seis histidinas, la cual fue añadida directamente a membranas intactas. Posteriormente al fraccionamiento y solubilización de las membranas, las potenciales proteínas diana de tiorredoxina fueron aisladas mediante cromatografía de afinidad por níquel y electroforesis desnaturizante bidimensional bajo condiciones no reductoras en la primera dimensión y reductoras en la segunda.

Resultados

Utilizando este método hemos identificado 50 posibles proteínas diana de tiorredoxina, 38 de las cuales han sido identificadas como tales por primera vez para *Synechocystis* en este trabajo, aunque 10

de ellas ya fueron descritas como tales en trabajos previos para otros organismos. Entre las dianas cabe destacar varias subunidades ATPasa de transportadores y miembros de la familia AAA⁺ de ATPasas, e.g. FtsH. (Mata-Cabana, et al., 2007).

Conclusiones

En este estudio se describe por primera vez una posible regulación por la luz a través de tiorredoxinas de procesos tales como el transporte a través de la membrana o la proteólisis, con lo que se abren nuevas vías de estudio para profundizar en estas nuevas relaciones tanto en cianobacterias como en otros organismos.

Bibliografía

- Cooper, C.E., Patel, R.P., Brookes, P.S., Darley-Usmar, V.M. Trends in Biochemical Sciences 2002, 27, 489-492
- Mata-Cabana, A., Florencio, F.J., Lindahl, M. Proteomics 2007, 7, 3953-3963
- Meyer, Y., Reichheld, J.P., Vignols, F. Photosynthesis Research 2005, 86, 419-433
- Srivastava, R., Pisareva, T., Norling, B. PCC 6803. Proteomics 2005, 5, 4905-4916

Tomato chromoplast proteome: challenges and perspectives

Petrizzo R.¹, Reisinger V.², Eichacker L.², Rose Campbell J. K.³, Bellido D.⁴, Oliveira E.⁴, Odena MA⁴ and Boronat A.¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Faculty of Biology, Avda. Diagonal 645, 08028-Barcelona. ²Department für Biologie I, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany. ³Emerson Hall Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853 USA. ⁴Plataforma de Proteómica, Parc Científic de Barcelona, Campus Diagonal, Universitat de Barcelona, C/ Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona.

Introduction

In our work we focus on non-photosynthetic plastids (i.e Chromoplasts) which are part of the compartmentalised genetic machinery of the plant cell and originated from endosymbiosis. Chromoplasts derive from the chloroplasts present in the

green fruit (Camara et al., 1995). The chloroplast to chromoplast transition is marked by the degradation of the thylakoid membrane system and the reduction in the level of proteins associated with photosynthesis (Cheung et al., 1995). The role of chromoplasts in other metabolic processes relevant for fruit quality (such as the production of flavors, aromas, or