

defence/repair; 4) miscellaneous; 5) Unknown; 6) Not identified. Membrane protein complexes were also studied using BN-PAGE. The BN-SDS PAGE technique has been proven to be a good method to resolve highly hydrophobic integral membrane proteins from chloroplast preparations. These membrane protein complexes are just now being analyzed by nanoLC/ESI-Q-TOF. With BN-PAGE we have been able to get for the first time the chloroplast membrane pattern and to identify all subunits of the ATPase complex and 2 subunits of the NdhI complex. The last one was also confirmed by in gel enzymatic assay, indicating a possible role of that complex in chromorespiration.

References

- Camara B, Huguency P, Bouvier F, Kuntz M, Moneger R (1995). *Int Rev Cytol* 163:175-247.
- Cheung AY, McNellis T, Piekos B (1993). *Plant Physiol* 101:1223-1229.
- Fraser PD, Bramley PM (2004). *Prog Lipid Res* 43:228-265.
- Krinski NI, Johnson EL (2005). *Mol Asp Med* 26: 459-516.
- Reisinger V, et al. (2006). *Proteomics* 6:suppl2:6-15
- Tannu NS and Hemby SE (2006). *Nat Protocols* 1(4):1732-42

Cambios inducidos por el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) en el proteoma cloroplastídico de *Nicotiana benthamiana*

Pineda, M.^{1,2}, Sajnani, C.^{1,2} y Barón, M.^{1,*}

¹: Estación Experimental del Zaidín, CSIC. C/ Profesor Albareda, 1. C.P. 18008. Granada (España). ²: Estos autores han contribuido por igual y están colocados en orden alfabético.

Introducción

El uso de las técnicas proteómicas para el análisis de la respuesta de las plantas a cambios en su entorno está mereciendo un interés creciente (ver revisiones Rossignol et al., 2006; Jorrín et al., 2007). El cloroplasto ha resultado ser un eficaz sensor ambiental y en los últimos años se han registrado notables avances en el conocimiento de su proteoma (ver PPDB, <http://ppdb.tc.cornell.edu/subproteome.aspx>; van Wijk 2004). Análisis proteómicos recientes han destacado además el papel de este orgánulo en la defensa de la planta frente al ataque por patógenos y en las rutas de señalización que éstos desencadenan (Jones et al. 2006; Zhou et al. 2006). En ensayos previos con plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con PMMoV hemos detectado cambios en el proteoma cloroplastídico de la planta huésped que afectaban al sistema de oxidación/fotólisis del agua (Pérez-Bueno et al., 2004); en el presente trabajo, hemos profundizado en el impacto causado por la infección viral en la expresión proteica de este orgánulo.

Material y métodos

El cultivo de plantas, así como la infección experimental, se realizaron según Pérez-Bueno et al., (2004) y las preparaciones cloroplastídicas se aislaron de plantas control e infectadas (Reche et al., 1997) a los 14 días post-inoculación. Los cambios en el proteoma cloroplastídico de *N. benthamiana* durante la infección con la cepa española de PMMoV (PMMoV-S) fueron analizados mediante electroforesis bidimensional (rangos de pH 4-7 y 6-11; Pineda, 2007), seguida de espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF MS) y búsqueda en bases de datos.

Resultados y conclusiones

La técnica de electroforesis bidimensional permitió la obtención de mapas proteicos de cloroplastos de plantas control, en los que se distinguieron al menos 200 manchas, de las cuales un 75% aparecieron en el rango de pH 4-7. Se consiguieron identificar un total de 72 polipéptidos, 55

de ellos en el rango de pH 4-7. La mayor parte de las proteínas identificadas pertenecían a la cadena de transporte de electrones fotosintético y al ciclo de Benson-Calvin. La infección por PMMoV-S de plantas de *N. benthamiana* indujo la regulación a la baja de algunas proteínas constituyentes del cloroplasto.

Bibliografía

Jones, A.M.E., Thomas, V., Bennett, M.H., Mansfield, J., Grant, M. *Plant Physiol.* 2006, 142, 1603-1620.

Jorrín, J.V., Maldonado, A.M., Castillejo, M.A. *Proteomics* 2007, 7, 2947-2962.

Pérez-Bueno, M.L., Rahoutei, J., Sajnani, C., García-Luque, I., Barón, M. *Proteomics* 2004, 4, 418-425.

Pineda, M. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. 2007, 193-224.

Reche, A., Lázaro, J.J., Hermoso, R., Chueca, A., López Gorgé, J. *Physiol. Plant.* 1997, 101, 463-470.

Rosignol, M., Peltier, J.-B., Mock, H.-P., Matros, A., Maldonado, A.M., Jorrín, J.V. *Proteomics*, 2006, 6, 5529-5548.

Van Wijk, K.J. *Plant Physiol. Biochem.* 2004, 42, 963-977.

Zhou, W., Eudes, F., Laroche, A. *Proteomics* 2006, 6, 4599-4609.

Modificaciones del proteoma nuclear de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a cambios en el medio

Ribeiro M, Ruiz MT, Romero JM, Valverde F.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.CSIC y Universidad de Sevilla. Av. Américo Vespucio, 49. 41092 Sevilla

Introducción

La proteómica vegetal es un campo de investigación emergente que cobra gran interés para el tratamiento holístico de los sistemas biológicos (Chen y Harmon, 2007). Dado que se encuentra todavía lejos de igualar los estándares de los sistemas de levaduras y mamíferos, cualquier información acerca de un subproteoma vegetal y sus modificaciones en respuesta a distintas condiciones de crecimiento o estrés, adquiere un alto valor. Las plantas son organismos sésiles que responden a cambios en el medio modificando sus características fisicoquímicas, lo que les otorga una gran plasticidad (Casal et al., 2004). Por esta razón, los núcleos vegetales presentan un alto número de proteínas implicadas en mecanismos de transducción de señales y regulación génica (Bae et al., 2003).

En nuestro laboratorio estamos interesados en los cambios que ocurren en el subproteoma nuclear de *A. thaliana* en respuesta al suministro de azúcares. La función reguladora de los azúcares es conocida desde hace tiempo. Sin embargo, poco se sabe acerca de la maquinaria transcripcional involucrada,

sobre todo qué factores de transcripción controlan la expresión de genes sometidos a regulación por azúcares. En ese sentido hemos desarrollado un protocolo con el cual, mediante un acercamiento proteómico, pretendemos identificar los factores de transcripción y proteínas señalizadoras que modulan la respuesta en función del azúcar añadido.

Material y métodos

El método se basa en la utilización de dos técnicas bioquímicas de elevada resolución: la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas MALDI-TOF. El protocolo diseñado se basa en la purificación de núcleos de plantas de *A. thaliana* var. *Col-0* cultivadas en medio MS (control) y medio MS suplementado con 5% (p/v) de sacarosa; extracción de las proteínas nucleares con alta fuerza iónica y enriquecimiento de las muestras en potenciales factores de transcripción. Este último paso incluye tratamientos cromatográficos clásicos como la filtración en gel en columna de Sephadex, y una cromatografía de afinidad en la que se utiliza una matriz de heparina-