

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 señaladoras 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-

sulfato. En ambos pasos cromatográficos se emplea el sistema ÄKTAFFPLC™. Las fracciones proteicas son sometidas a una electroforesis bidimensional: isoelectroenfoque en *strip* ReadyStrip™ IPG y separación en SDS-PAGE en geles Criterion XT Bis-Tris (Bio-Rad). Los geles son teñidos inicialmente con SYPRO Ruby y subsecuentemente con Coomassie coloidal. Las proteínas de interés son analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF e identificadas con el programa MASCOT.

Resultados

Hemos obtenido mapas de referencia de la composición del subproteoma nuclear de *A. thaliana* en presencia o ausencia de sacarosa. Se han analizado las proteínas que presentan expresión diferencial en ambas condiciones experimentales. Asimismo, se han analizado proteínas cuya expresión no varía en ambos tratamientos y que permiten caracterizar de forma general este subproteoma nuclear de *A. thaliana*. De las 36 proteínas analizadas en un experimento tipo, se identificaron 15, que se presentan agrupadas atendiendo a su función celular en la tabla I. Cabe destacar la identificación de 4 proteínas involucradas en señalización y regulación de la expresión génica como es el caso de FRIGIDA y de ATMYB3R4 cuya expresión parece, respectivamente, aumentar y reprimirse en presencia de sacarosa. El grupo más representativo corresponde a proteínas implicadas en el metabolismo del carbono, más concretamente en el metabolismo de los azúcares.

Conclusiones

En conjunto, estos resultados preliminares sugieren que la respuesta a azúcares en plantas está sometida a un mecanismo de regulación en el que intervienen varias vías de transducción de señales que posiblemente estén interconectadas. Hasta ahora nos hemos centrado únicamente en la búsqueda de factores de transcripción implicados en la respuesta al suministro de sacarosa, y los resultados obtenidos parecen confirmar nuestro abordaje. Eventualmente, para la completa identificación y caracterización de estas proteínas se requiere la aplicación de otros métodos bioquímicos y moleculares. En suma, se trata de un abordaje bastante prometedor para la definición de un subproteoma nuclear de *Arabidopsis*, permitiendo descubrir “cuánto” y “qué” cambia, a este nivel, en respuesta al suministro de azúcares.

Bibliografía

- Bae, M., Cho, E., Choi, E-Y and Park, O. (2003). The Plant Journal 36: 652-663.
- Chen, S. and Harmon, A. C. (2006). Proteomics 6: 5504-5516.
- Casal, J. J., Fankhauser, C., Coupland, G. and Blázquez, M. A. (2004). Trends in Plant Science 9 (6): 309-314.

Tabla I. Identificación de las proteínas nucleares posiblemente involucradas en la modulación de la respuesta al suministro de sacarosa. **p.I.** punto isoelectrico. +. Proteínas cuya expresión parece ser inducida por sacarosa. -. Proteínas cuya expresión parece ser reprimida por sacarosa. **Números sin signos.** Proteínas que se expresan de igual forma en ambas condiciones experimentales.

Categoría	Proteína	Descripción	Spot	Masa Molecular	p.I.
Señalización y regulación génica	FRI	Implicado en el proceso de floración, regulando la transición entre la fase vegetativa y la fase reproductiva	2+	18731 Da	4,74
	CPC	Factor de transcripción involucrado en procesos de diferenciación celular	4	21378 Da	4,60
	ATMYB3R4	Factor de transcripción	1-	18237 Da	5,49
	GLP3	Implicado en el mecanismo de respuesta al frío	1	14382 Da	5,86
Metabolismo del carbono	Proteína con actividad glucosil-transferasa	Actividad de transferencia de grupos glucosil	5	16904 Da	11,41
	ESM1	Implicado en el metabolismo de los azúcares	8+	44061 Da	7,30
	TGG1	Implicado en el metabolismo de los azúcares	9+	50544 Da	6,12
	Xiloglucosil transferasa	Implicado en el metabolismo de los glucanos con actividad hidrolítica	6	34002 Da	7,00
	TGG2	Implicado en el metabolismo de los azúcares, con actividad tioglucosidasa	10	53880 Da	6,43
	PYK10	Actividad B-glucosidasa	7-	60000 Da	6,75
Metabolismo del RNA	SAD1	Implicado en los mecanismos de <i>splicing</i> , exportación y transporte del mRNA. Responde a la presencia de ABA y privación de agua	1+	10658 Da	4,17
Reparación del DNA	MSH2	Implicado en los mecanismos de reparación del DNA	5-	30633 Da	8,23
No caracterizadas	Proteína relacionada con patógenosis	Función desconocida	4+	19969 Da	4,95
Hipotéticas	Nº 5	Desconocidas	5+	59886 Da	9,87
	Nº 6		6-	45023 Da	7,68