

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 Thiourea, 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

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