

Estudio proteómico comparativo del estroma de plantas de *Arabidopsis* silvestres y deficientes en NADPH tiorredoxina reductasa cloroplástica (NTRC)

González M.C. y Cejudo F.J.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla y CSIC). Avda. Americo Vesputio 49, 41092-Sevilla.

Introducción

La conversión fotosintética de energía lumínica en el cloroplasto genera especies reactivas de oxígeno. Una de dichas especies, el peróxido de hidrógeno, juega un papel importante como molécula señalizadora, pero debido a su conversión en radicales hidroxilo altamente reactivos es tóxica en concentraciones elevadas (Apel y Hirt, 2004). El peróxido de hidrógeno es fundamentalmente detoxificado en el cloroplasto por medio de la ascorbato peroxidasa. Además, las peroxirredoxinas juegan un papel importante en la reducción de peróxidos de hidrógeno (Dietz, 2003), siendo reducidas por tiorredoxinas con electrones procedentes del flujo fotosintético. Nuestro grupo ha identificado un nuevo tipo de NADPH tiorredoxina reductasa, NTRC, con un dominio tiorredoxina en el extremo C-terminal y localización cloroplastídica, capaz de reducir eficientemente una 2-Cys-peroxirredoxina cloroplástica en un sistema reconstituido *in vitro* (Serrato et al., 2004). Mutantes *knock-out* para NTRC de *Arabidopsis* muestran hipersensibilidad a estrés oxidativo, sugiriendo que esta enzima puede jugar un papel importante en la protección de la planta frente a este tipo de estrés (Pérez-Ruiz et al., 2006). Con objeto de profundizar en el papel desempeñado por NTRC, se ha llevado a cabo un análisis proteómico comparativo de plantas silvestres y mutantes deficientes en NTRC de *Arabidopsis*.

Materiales y métodos

Nuestro análisis se basa fundamentalmente en la preparación de fracciones estromáticas de cloroplastos, y electroforesis bidimensional e identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Para ello, se ha puesto a punto un método de aislamiento de cloroplastos intactos y rotura controlada en tampón hipo-osmótico. Las proteínas del estroma se sometieron a isoelectroenfoque en tiras de pH 3-10 no lineales y separación en geles de poliacrilamida. Finalmente, se tiñeron con plata o SyproRuby, identificándose los *spots* de interés mediante análisis MALDI-TOF.

Resultados

El análisis del proteoma estromático en plantas de *Arabidopsis* silvestres y mutantes crecidas en día largo mostró algunas diferencias de expresión de proteínas en ambos fondos, si bien el fenotipo de las plantas crecidas tanto en día largo (Figura 1A) como en día corto (Figura 1B) sugería la existencia de diferencias más drásticas. Las proteínas que se expresaban diferencialmente en uno u otro fondo genético se analizaron mediante espectrometría de masas, permitiendo identificar proteínas implicadas en diversas funciones celulares. En un experimento típico (Figura 1C), 25 proteínas mostraron expresión diferencial, identificándose 11 de ellas mediante MALDI-TOF. Entre éstas cabe destacar proteínas del ciclo de Calvin y el Ciclo Oxidativo de las Pentosas Fosfato, como la Rubisco activasa (*spots* 2, 3 y 16) y la fructosa bifosfato aldolasa (*spot* 22). Otro grupo de *spots* corresponde a proteínas del fotosistema II, incluyendo la proteína de 23kDa del *Oxygen Evolving Complex* (7, 8) y la PSBP (*Oxygen-Evolving Enhancer protein 2, calcium ion binding; spot* 9). Finalmente se han identificado proteínas implicadas en el plegado proteico (Peptidil isomerasa ROC4, *spot* 10) y de interacción con RNA y DNA (*spots* 4 y 19).

Fenotipo de plantas silvestres (izquierda A, B) y deficientes en NTRC (derecha A, B) crecidas en condiciones de día largo (A) y corto (B). Las proteínas del estroma se sometieron a electroforesis bidimensional y tinción con plata (C) identificándose los *spots* señalados expresados diferencialmente en el fondo silvestre (cuadrado azul) o mutante (círculo rojo) mediante MALDI-TOF.

Conclusiones

Si bien el proteoma estromático de plantas silvestres y deficientes en NTRC no muestra diferencias drásticas en las condiciones analizadas, el método puesto a punto en el laboratorio permitirá estudiar condiciones de estrés oxidativo en las que,

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.

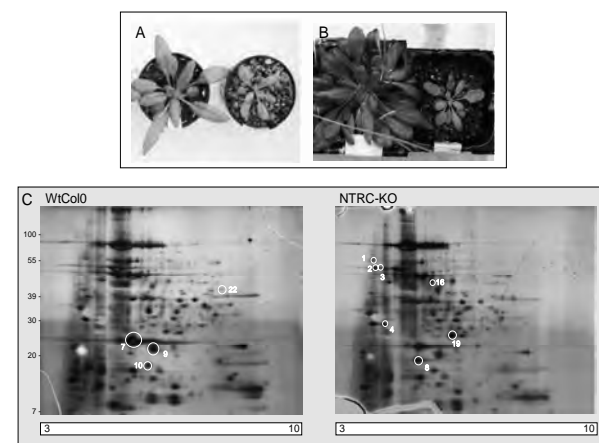


Figura 1. Análisis proteómico comparativo del estroma de plantas silvestres y deficientes en NTRC.

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 Tiourea, 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-