

El estudio comparativo, proteómico y transcriptómico, de la respuesta a azúcares en *Arabidopsis thaliana* muestra una relación entre el metabolismo y el desarrollo floral

Marina Ribeiro-Pedro, Fatima Ezzahra Said, María Teresa Ruiz, José María Romero, Federico Valverde

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

El desarrollo vegetal está bajo el control de complejos programas genéticos que permiten generar múltiples respuestas a cambios ambientales. La transcriptómica y la proteómica han surgido como potentes herramientas para profundizar en el conocimiento de los mecanismos regulatorios que los controlan. En particular, la proteómica vegetal, es un campo de investigación emergente ya que, al identificar y cuantificar las proteínas presentes en determinadas condiciones, proporciona información funcional sobre los mecanismos moleculares básicos. En nuestro laboratorio estudiamos los cambios que ocurren en el proteoma nuclear de *A. thaliana* en respuesta al suministro de azúcares. Hemos identificado varias proteínas posiblemente implicadas en esta señalización incluidos factores de transcripción, como FRIGIDA, y otras proteínas señalizadoras.

Las complejas interacciones moleculares que subyacen los procesos de desarrollo vegetal pueden abordarse en la actualidad mediante un conjunto variado de técnicas masivas que permiten identificar las moléculas biológicamente más relevantes [1]. Entre ellas, la transcriptómica permite el análisis global de la expresión del genoma en determinadas condiciones fisiológicas, mientras que la proteómica permite identificar y cuantificar las proteínas involucradas [1, 2]. Dado que, por una parte, son las proteínas los componentes directos de las cascadas de señalización y rutas bioquímicas, y que no existe correspondencia directa entre gen-proteína, la proteómica vegetal emerge como la mejor herramienta para reflejar la complejidad y dinamismo de los sistemas vegetales.

Las plantas son organismos sésiles y responden a cambios del ambiente modificando sus características fisicoquímicas [3]. En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los cambios a nivel molecular que ocurren en el núcleo de *A. thaliana* en respuesta al suministro de azúcares. La función

reguladora y moduladora de los azúcares es conocida desde hace tiempo. Sin embargo, se sabe poco sobre su mecanismo molecular, es decir, qué factores de transcripción y proteínas reguladoras intervienen en esta respuesta. Para responder a esta incógnita hemos diseñado y optimizado un protocolo de proteómica nuclear que nos permita identificar proteínas implicadas en la respuesta a azúcares. Más recientemente, y con objeto de profundizar en el conocimiento de dicho mecanismo, hemos iniciado un acercamiento transcriptómico mediante la utilización de *microarrays* y estudios más detallados de los transcritos que codifican proteínas potencialmente implicadas en la regulación por azúcares. De la comparación de ambas aproximaciones podremos sacar datos que ayuden a comprender la respuesta a azúcares.

Proteómica. En nuestro protocolo purificamos núcleos de *A. thaliana* var. *Col-0* cultivadas en medio MS (control) y medio MS suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, extrayendo las proteínas nucleares con sulfato de amonio/deoxicolato en condiciones nativas. Luego se eliminan los contaminantes por filtración en gel en una columna de Sephadex y se enriquecen las muestras en potenciales factores de transcripción mediante cromatografía de afinidad en una matriz de heparín-sulfato. En condiciones desnaturizantes se extraen las proteínas con fenol y luego se precipitan con una mezcla de acetato de amonio y metanol. En los pasos cromatográficos se empleó el sistema ÄKTAFPLC™. Las fracciones proteicas se sometieron a una electroforesis bidimensional: isoelectroenfoque en *strip* ReadyStrip™ IPG y separación en SDS-PAGE en geles Criterion XT Bis-Tris (Bio-Rad). Los geles fueron teñidos con SYPRO Ruby, nitrato de plata o Coomassie coloidal. Las proteínas de interés fueron analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF e identificadas con el programa MASCOT. Para los

análisis de *Western blot* se utilizaron anticuerpos específicos, generados en el laboratorio, o anticuerpos control de casas comerciales.

Transcriptómica. Para el análisis de los perfiles de expresión en presencia de azúcares se extrajo RNA total de plántulas de *A.thaliana* var. Col-0 cultivadas en medio MS o MS con sacarosa mediante el método del Trizol y se purificaron en columnas “RNeasy” (Qiagen). Se hibridaron 3 muestras biológicas de cada condición experimental en “Gene-Chips” de Affymetrix (Unidad de Genómica, CNB) y los datos se analizaron mediante LIMMA con el software FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es>). Los resultados fueron posteriormente analizados con los programas disponibles en red en el “Bio-array Resource” (<http://bar.utoronto.ca>). En función de los resultados obtenidos se procedió al análisis, mediante QPCR, de los genes de interés.

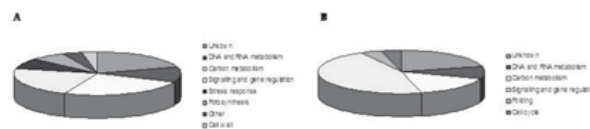


Figura 1. Comparación funcional, entre transcriptómica y proteómica, de la respuesta a sacarosa. A) Clasificación funcional de los genes cuya expresión se altera (represión $FDR < -2$ ó inducción $FDR > 2$) en presencia de sacarosa. B) Clasificación funcional de las proteínas cuya producción (incremento ó disminución) se altera en presencia de sacarosa.

Una vez desarrollado y utilizado el protocolo de forma rutinaria, hemos iniciado la optimización de los pasos más críticos. Asimismo, hemos comparado varios métodos de extracción de proteínas nucleares, entre ellos la extracción en presencia de 6M guanidina, en condiciones de alta sal y con fenol. Los

Tabla 1. Identificación de proteínas identificadas en este estudio.

Category	Protein	Description	ATG number
Signalling, gene regulation	FRI	Regulation of timing of transition from vegetative to reproductive phase	at4g00650
	CPC	Transcription factor activity	at2g46410
	ATMYB3R4	Transcription factor	at5g11510
	GLP3	Response to cold	at5g20630
	TF2	<i>MyB-like</i> transcription factor	at1g05055
	ARAC7	GTP-binding protein implicated in signal transduction	at4g28950
	T3F24.4	F-Box related protein	at1g47350
	F5F19.6	Signalling	at1g52000
	JR1	Signalling	at3g16470
	T204.11	Signalling	at3g16450
	Putative RING zinc finger protein	Signalling	at3g53410
Carbon metabolism	ESM1	Sugar related protein	at3g14210
	TGG1	Sugar related protein	at5g26000
	TGG2	Sugar-related protein	at5g25980
	PYK10	Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	at3g09260
RNA and DNA metabolism	SAD1	mRNA splicing, export, and degradation.	at5g48870
	MSH2	Damaged DNA repair	at3g18524
Cell cycle	TPLATE	Cytokinesis protein targeted to the cell plate	at3g01780
Folding	PBP1	Protein folding	at3g16420
Unknown	RNA-binding	Unknown	at3g24255
	JAL22	Unknown	at2g39310

resultados obtenidos demuestran que se obtiene una mayor eficiencia mediante la extracción con guanidina que con los otros métodos por separado, mientras que la utilización secuencial de ambos (alta sal y fenolización) es comparable a la extracción con el caotrope. A título de comparación hemos aplicado varios métodos de tinción de geles, entre los que la

tinción con coomassie coloidal nos ha proporcionado la mejor resolución y compatibilidad con los análisis de espectrometría de masas. Del total de proteínas identificadas hasta el momento hemos analizado las que presentaban expresión diferencial en presencia o ausencia de sacarosa y se muestran en la Tabla 1 en base a su función. Se observa que el grupo más

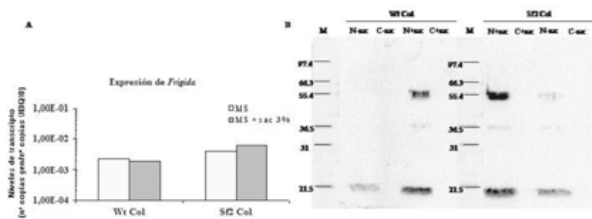


Figura 2. Estudio de los niveles de expresión de *FRIGIDA* y detección de la proteína en plántulas de *A. thaliana*, en respuesta a sacarosa. A) Análisis, por QPCR, de los niveles de transcripto de *FRIGIDA* en plántulas (*Wt col* y *Sf2 col*) crecidas en medio MS y medio MS suplementado con 3% de sacarosa. B) Análisis, mediante Western blot, de la presencia de *FRIGIDA* en extractos nucleares y citosólicos de plántulas *Wt col* y *Sf2 col* crecidas en las mismas condiciones de ensayo. Cabe mencionar que *FRIGIDA* se detecta exclusivamente en las fracciones nucleares (banda de 57 Kda aprox.) y que en presencia de sacarosa parece aumentar su producción. La banda de 20 Kda corresponde a la Histona H3, utilizada como control de la integridad y pureza de las fracciones.

Referencias

- [1] Hochholdinger F, Sauer M, Dembinsky D, Hoecker N, Muthreich N, Saleem M, Liu Y. Proteomic dissection of plant development. *Proteomics* 2006; 6:4076-4083.
- [2] Chen S y Harmon AC. Advances in plant proteomics. *Proteomics* 2006; 6:5504-5516.
- [3] Casal, JJ. Fankhauser C, Coupland G, Blázquez MA. Signalling for developmental plasticity. *Trends in Plant Science* 2004; 9 (6):309-314.

A DIGE proteomic analysis of wheat flag leaf treated with TERRA-SORB® foliar, a free amino acid-based biostimulator

María José Martínez-Esteso¹, Mayte Vilella-Antón¹, Susana Sellés-Marchart², Anna Botta-Català³, Rafael Piñol-Dastis³, Roque Bru-Martinez¹

¹Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas. Dpto. Agroquímica y Bioquímica, IMEM Ramon Margalef, Universidad de Alicante; ²Unidad de Genómica y Proteómica, SSTTI, Universidad de Alicante; ³Departamento I+D Fisiología Vegetal, BIOIBERICA, S.A.

Abstract

In this work, we have undertaken a proteomic approach using DIGE in order to explore molecular mechanisms potentially involved in the biostimulating effect of Terra-Sorb® foliar on wheat applied at

represented corresponds to proteins implicated in mechanisms of signaling and regulation of the gene expression, as is the case of *FRIGIDA* whose expression seems to increase in the presence of sucrose. A similar situation can be proven at the level of the expression profile (Figure 1b). However, and in the particular case of *FRIGIDA*, it does not seem to exist a direct relationship between gene-protein because, in the presence of sucrose, a greater production of protein (Figure 2b) does not seem to be reflected at the level of the corresponding transcript (Figure 2a). Through the use of these tools (Proteomics and Transcriptomics) we have shown that we can increase the understanding of biological mechanisms, as it allows the integration and the intersection of the transcriptional, translational and post-translational information.

flag leaf stage. Proteins identified up- and down-regulated suggest an improvement of wheat productivity by a combination of an enhanced CO₂ fixation, a more active protein synthesis and a decrease of oxidative stress.