

# ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE PROTEINES INTERVENANT DANS LA REPONSE AU STRESS OXYDANT PAR LES PEROXYDES CHEZ LA LEVURE

D. PFLIEGER<sup>1</sup>, A. DELAUNAY<sup>2</sup>, M.-B. BARRAULT<sup>1,2</sup>, M. TOLEDANO<sup>2</sup>, J. VINH<sup>1</sup>, J. ROSSIER<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup>Neurobiologie et Diversité Cellulaire, ESPCI, CNRS UMR 7637, 75231 Paris Cedex 05

<sup>2</sup>Laboratoire Stress Oxydants et Cancers, Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Département de Biologie Joliot Curie, DSV/CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette, 91191 CEDEX

## INTRODUCTION

La concentration intracellulaire en peroxydes doit être finement contrôlée pour préserver l'intégrité de la cellule. Ce contrôle homéostatique est assuré par des voies métaboliques spécialisées, qui sont activées en réponse à de faibles variations de la concentration en peroxydes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Yap1 est un facteur de transcription qui joue un rôle primordial dans la réponse au stress oxydant par les peroxydes. L'activité de Yap1 est essentiellement contrôlée par sa localisation subcellulaire. En l'absence de stress, Yap1 est cytoplasmique car il est exporté rapidement du noyau par le récepteur nucléaire Crm1/Xpo1. Lorsque les cellules sont exposées à des peroxydes, Yap1, oxydé, n'est plus reconnu par ce récepteur nucléaire, et se concentre de ce fait dans le noyau. Il induit alors la majorité des activités antioxydantes de la cellule. L'export nucléaire de Yap1 est contrôlé par son état d'oxydation (Delauay et al., 2000).

En présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Yap1 se lie de façon transitoire avec une protéine de 20 kDa par un pont disulfure intermoléculaire. Le partenaire de Yap1 a été identifié par LC-MS/MS comme étant une glutathion peroxydase : Gpx3. L'étude de souches mutantes de levure a révélé que Gpx3 constitue probablement le premier maillon du système de détection du peroxyde d'hydrogène chez la levure et transmet ce signal de stress oxydant à Yap1. La liaison covalente de Yap1 et de Gpx3 est essentielle à l'oxydation de Yap1 sur un pont disulfure intramoléculaire, la forme active de ce facteur. En effet, le changement de conformation induit par cette modification prévient l'export de Yap1 hors du noyau en inhibant son interaction avec l'exportine Crm1.

Des analyses par spectrométrie de masse en tandem sur un appareil nanoESI-Q-TOF ont permis de préciser les mécanismes moléculaires aboutissant à l'activation de Yap1, en identifiant les résidus cystéiniques impliqués : 1) dans l'association covalente entre Yap1 et le détecteur Gpx3 ; 2) dans la forme oxydée active de Yap1. Ces identifications, confirmant des résultats prédits par la génétique, ont permis de proposer un mécanisme singulier de transduction/détection d'un stress par les peroxydes, reposant sur la détection et la transmission d'un signal redox par une peroxydase.

## Memento

Yap1 est une protéine de 72,5 kDa, possédant 6 cystéines aux positions 303, 310, 315, 598, 620 et 629.  
 Gpx3 est une protéine de 18,6 kDa, possédant deux cystéines aux positions 36, 64 et 82.  
 Yap1<sup>C303A</sup> désigne le mutant de Yap1 où la cystéine 303 a été remplacée par une alanine

## MATERIEL ET METHODES

### Echantillons protéiques

Les protéines extraites de la souche de levure *S. cerevisiae* YPH98 (Sikorski et Hieter, 1989) (*MATa, ura3-52, his2-801leu, ade2-101leu, trp1-Δ1 leu2-Δ1*) et de mutants ont été purifiées et séparées par électrophorèse sur gel selon les méthodes préalablement décrites (Delauay et al., 2000 et soumis). La protéine recombinante Myc-Yap1 correspondant à la protéine Yap1 marquée par 9 épitopes Myc en son extrémité N-terminale a été purifiée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-Myc 9E10.

### Analyses LC-MS/MS et MS/MS

Les protéines séparées sur gel SDS-PAGE ont été digérées par la trypsine, d'après le protocole de Shevchenko et al. (1996). La moitié de chaque échantillon a été réduite et alkylée par le dithiothréitol (DTT) et l'iodoacétamide avant la digestion enzymatique.

Pour identifier Gpx3, le produit de digestion de la bande de gel correspondant à Yap1<sup>C303A</sup> associé à son partenaire a été analysé par chromatographie capillaire en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), à l'aide d'un système chromatographique Famos-Switcher-UltraMate (LC Packings, Amsterdam, Pays-Bas) connecté à un spectromètre de masse hybride nanoESI-QqTOF (QTOF2, Micromass, Manchester, Royaume-Uni). Les séparations chromatographiques ont été menées sur une colonne capillaire à polarité de phase inverse (Pepmap C18, 75 µm d.i., 15 cm de longueur, LC Packings), à un débit de 200 nL/min, avec un gradient de 100% de tampon A (H<sub>2</sub>O/acétonitrile/AF, 96/4/0,1, v:v) à 50% de tampon B (H<sub>2</sub>O/acétonitrile/AF, 10/90/0,085, v:v) en 50 min, suivi par 15 min à 100% B. Les données de LC-MS/MS ont été obtenues en mode automatique et converties en fichiers .PKL grâce au logiciel MaxBinh (Micromass), puis soumises au programme de recherche Mascot (<http://www.matrix-science.com>). Les protéines ont été identifiées par confrontation des données expérimentales à la banque de données NCBI.

Pour identifier les ponts disulfures, les peptides typiques des protéines Yap1 et Gpx3 ont été analysés par fragmentation manuelle en spectrométrie de masse en tandem sur le QTOF2. Des ions de masses correspondant aux peptides liés par un pont disulfure ou à leurs constituants réduits et alkylés ont été détectés, sélectionnés et fragmentés.

## Yap1 interagit de façon covalente avec une protéine de 20 kDa : Gpx3

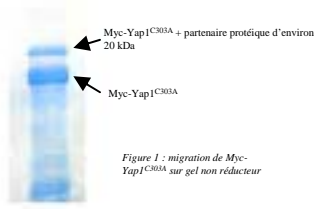
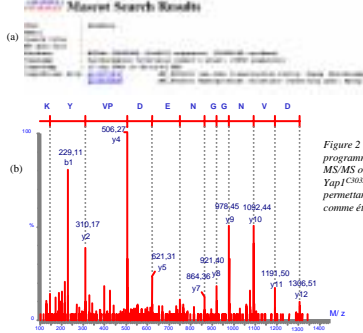


Figure 1 : migration de Myc-Yap1<sup>C303A</sup> sur gel non réducteur

Après extraction protéique de cellules de levure traitées au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'immunoprécipitation de la protéine Myc-Yap1 a permis d'isoler une deuxième espèce protéique. La révélation de cette protéine par Western blotting avec l'anticorps anti-Myc associé à l'anticorps anti-Myc-Yap1 associé à une protéine d'environ 20 kDa. Myc-Yap1 associé à son partenaire apparaît en quantité moins importante que Myc-Yap1 seul (Figure 1). L'étude de la souche sauvage et des différents mutants de Yap1 (mutations ponctuelles de chaque cystéine) montre que cette protéine est la plus présente dans la souche mutante Yap1<sup>C303A</sup>.

## Identification du partenaire protéique de Yap1 par LC-MS/MS.



Yap1 : 40% de couverture de séquence protéique (16 peptides différents fragmentés)  
 Gpx3 = Hyrl1 : 27% de couverture de séquence (peptides 26-35, 96-108, 142-160). La figure 2b représente le spectre MS/MS du peptide 96-108 de Gpx3 ayant contribué à son identification.

## Spectres mal interprétés par le programme Mascot :

La reprise manuelle de spectres mal interprétés par Mascot a permis de repérer :

- des peptides correspondant aux épitopes Myc.
- le peptide 279-305 de Yap1 contenant la mutation Cys303Ala.
- le peptide 611-626 de Yap1 où la Cys 620 est alkylée par le NEM, non proposé comme modification dans Mascot.
- le peptide 9-25 de Yap1 phosphorylé sur la sérine S<sup>14</sup> (figure 3). Le précurseur sélectionné porte une modification de 79,97 Da par rapport à la séquence peptidique 9-25 théorique. La perte de phosphorylation par la sérine S<sup>14</sup> est repérable sur le spectre de fragmentation : ce résidu apparaît comme une déhydroalanine (Ser-H<sub>2</sub>O), de masse 69,02 Da.

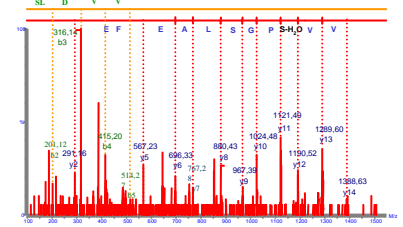


Figure 3 : spectre de fragmentation d'un peptide phosphorylé de Yap1 obtenu en analyse LC-MS/MS automatique

## Modèle de mécanisme de réponse au stress oxydant proposé

Le mécanisme d'activation de Yap1 (figure 4) a été proposé suite à des études génétiques effectuées antérieurement chez des souches mutantes de levure. Les données obtenues par spectrométrie de masse ont permis de confirmer et de renforcer les interprétations basées sur ces expériences de génétique.

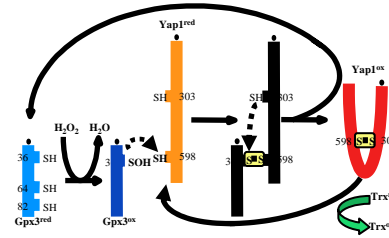


Figure 4 : modèle de mécanisme proposé pour l'oxydation de Yap1

## Mise en évidence du pont intermoléculaire Yap1-Gpx3

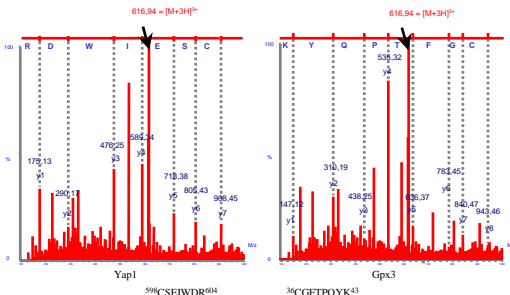


Figure 5 : Fragmentation d'un peptide de masse M = 1847,8 Da, sous forme trichargée, correspondant aux peptides 598-604 de Yap1 et 36-43 de Gpx3 liés par un pont disulfure. Les séquences des deux peptides peuvent être lues sur le spectre.

## CONCLUSION

La spectrométrie de masse a permis de préciser les mécanismes moléculaires déclenchés chez la levure lors d'un stress oxydant par les peroxydes.

En présence d'hydroperoxyde, Yap1, facteur de transcription qui active les défenses antioxydantes de la cellule, s'associe à un partenaire protéique. L'analyse par LC-MS/MS du produit de digestion de Yap1<sup>C303A</sup> lié à son partenaire a permis d'identifier ce dernier comme étant la thiol peroxydase Gpx3. Cette analyse a aussi révélé que Yap1<sup>C303A</sup>, lié à Gpx3, était partiellement phosphorylé sur sa sérine 14.

D'autre part, des analyses par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ont permis de localiser : 1) le pont disulfure intermoléculaire liant Yap1 à Gpx3 ; 2) de conforter l'hypothèse d'un pont intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598 de Yap1.

La connaissance du mécanisme de réponse au stress oxydant pourrait être approfondi par : 1) l'étude détaillée des modifications post-traductionnelles de Yap1 et de Gpx3 en fonction de leur état d'oxydation (notamment les phosphorylations) ; 2) l'analyse du produit de digestion de Yap1 oxydé par une autre enzyme que la trypsine, afin de valider la présence du pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598.

## REFERENCES

Delauay, A., Isnard A.-D. et Toledano, M, EMBO J. 2000 Oct 2;19(19):5157-66.  
 Sikorski, R. S., et Hieter, P. (1989), Genetics 122, 19-27.  
 Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., et Mann, M. (1996). Anal Chem 68, 850-858.

## Hypothèse d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598 de Yap1 confortée par analyse MS/MS.

Lors de la purification de la protéine Myc-Yap1, les cellules de levure sont en présence de NEM, de sorte que les cystéines libres sont modifiées par cet agent alkylant. La figure (6a,b) représente le spectre MS/MS obtenu lors de la fragmentation des espèces à m/z = 517,2(2+) dans le produit de digestion de la forme réduite de Yap1. Les deux peptides isobares 306-313 et 598-604 (M = 1032,45 Da et 1032,43 Da), contenant Cys<sup>310</sup> et Cys<sup>598</sup> alkylées par le NEM, ont pu être mis en évidence. Dans la forme oxydée de Yap1 digérée par la trypsine, la fragmentation des ions à m/z = 517,2(2+) ne permet de révéler que le peptide 306-313, contenant Cys<sup>310</sup> alkylée par le NEM (Figure 6c). Le pont disulfure supposé entre les cystéines 303 et 598 de la forme oxydée de Yap1 n'a pas pu être révélé de façon directe. En revanche, lorsque la forme oxydée de Yap1 a été préalablement réduite et alkylée par l'iodoacétamide avant la digestion tryptique, le peptide 598-604, avec Cys<sup>598</sup> alkylée par l'iodoacétamide, a pu être détecté et fragmenté (Figure 6d).

Les cystéines 310, 315 et 620 de Yap1 ont été détectées sous forme alkylée par le NEM dans la forme oxydée de Yap1. Ces trois cystéines ne semblent donc pas impliquées dans un pont disulfure. En revanche, Cys<sup>598</sup> formerait un tel pont d'après les résultats présentés figure 6. Les cystéines 629 et 303 n'ont pu être détectées. Le plus petit peptide tryptique contenant Cys<sup>303</sup> est de masse supérieure à 3,2 kDa ; cette masse élevée peut expliquer la non détection d'un peptide contenant Cys<sup>303</sup>.

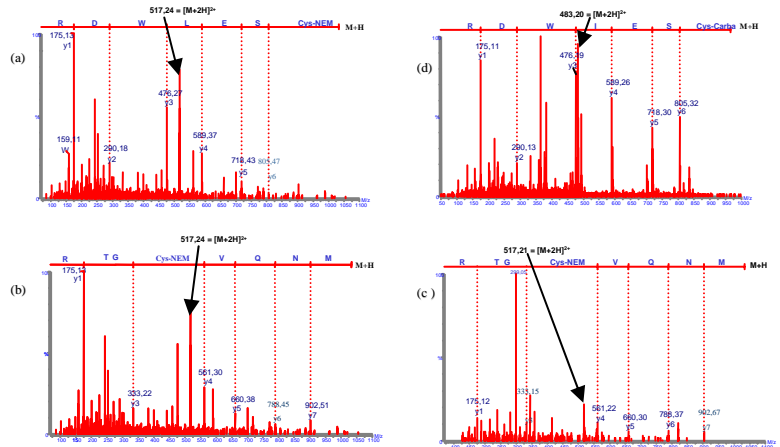


Figure 6 : spectres MS/MS de peptides tryptiques de Yap1 permettant de repérer les cystéines 310 et 598 modifiées par l'agent alkylant NEM ou iodoacétamide.