

Modifications post-traductionnelles de Pin1 dans des Tauopathies



Yann Verdier¹, Sabiha Eddarkaoui², Emmanuelle Demey-Thomas¹, Nicolas Sergeant², Luc Buée², Joelle Vinh¹

¹ESPCI ParisTech – USR 3149 - SMBP: 10 rue Vauquelin 75231 Paris cedex

²INSERM U837-1, Centre Jean Pierre Aubert, IMPRT, Univ. Lille II, Alzheimer & Tauopathies, 1 Place de Verdun, Rue Polonovski, 59045 Lille cedex

Résumé

- ✓ Pin1 est une peptidyl-prolyl cis/trans isomérase pré-requis pour la déphosphorylation de phospho-Ser ou de phospho-Thr, dont la protéine Tau est une cible.
- ✓ Des analyses de western blot en 2D montrent la présence de 5 isoformes de Pin1, variant principalement par leur PI.
- ✓ Ces isoformes ont été analysées par MALDI TOF/TOF, MALDI Orbitrap, et LC FT MS/MS.
- ✓ Nous avons montré que plus de 5 résidus de Pin1 peuvent être modifiés, en particulier par des oxydations et des acétylations N terminales.

Introduction

Un pré requis pour la déphosphorylation des phospho-sérines ou des phospho-thréonines suivis de résidus prolines est l'isomérisation des liaisons peptidiques amides précédant le résidu proline. Ce mécanisme est assuré par une peptidyl-prolyl cis/trans isomérase nommée **Pin1**. Par ces isomérisations, Pin1 régule la fonction d'un nombre croissant de cibles, dont la protéine Tau associée aux microtubules, qui est hyperphosphorylée et agrégée dans les neurones en dégénérescence dans la maladie d'Alzheimer et les Tauopathies. En utilisant un modèle de neuroblastome SY5Y exprimant de façon inducible la protéine Pin1, des analyses de Western blot après électrophorèse en 2D ont montré la présence de cinq isoformes de Pin1, de points isoélectriques différents.

Objectif du travail :

Ce travail vise à caractériser les modifications post-traductionnelles de ces isoformes de Pin1.

Matériel et méthodes

Cellules

Une lignée cellulaire SY5Y sur-exprimant d'une façon inducible Pin1 a été utilisée (Hamdane et al., Mol. Cell. Neurosci. 32, 155-160, 2009).

Gels d'électrophorèse en 2 dimensions et western blot

Les lysats cellulaires des cellules SY5Y sont homogénéisés dans 2 mL de tampon 2D (7M urée, 2M thiourée, 4% Triton X100 et 10 mM DTT). 500 µg de lysat sont déposés sur des strips IPG 3-10 (GE Healthcare). L'isoélectrofocalisation est réalisée avec l'IEF IPGPhor™ (GE healthcare) en appliquant un total de 75 kV/h. Les strips sont ensuite équilibrés 3x 15 mn dans du tampon de Laemmli et migrent sur un gel SDS-PAGE Tris-tricine à 16,5%.

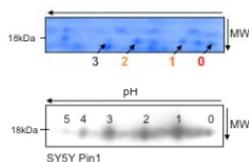
Les Western blot sont réalisés avec un anticorps anti-Pin1 H123 polyclonal (Santa Cruz Biotechnology) dilué à 1:1000 et révélés par chimio-luminescence.

Analyses en spectrométrie de masse

Les spots sont découpés sur des gels polyacrylamide colorés au Bleu de Coomassie brillant. Après réduction/alkylation (DTT 5mM final, 30 mn, 56°C / Iodoacétamide 25mM final 20 mn au noir), ils sont incubés 16h avec 10 ng de trypsine (Roche) et dessalés sur colonnes ZipTip C18 (Millipore). Les peptides obtenus sont analysés par MALDI-TOF/TOF (4800 Applier Applied Biosystems Inc., Framingham, MA), FTICR (LTQ-Ft, ThermoFisher Scientific) et MALDI-Orbitrap (LTQ-Orbitrap, Thermo Electron). Les listes de pics sont générées avec GPS 3.6 Explorer pour les données MALDI TOF/TOF, et avec Xcalibur 2.0.7 pour les acquisitions MALDI-Orbitrap et FTICR.

L'identification des protéines est réalisée avec Mascot 2.2.04 (Matrix Science) sur la base de données Swissprot KB 2010-05, taxon *homo sapiens* (20280 entrées), en utilisant les paramètres suivants : enzyme : trypsine, 2 digestes autorisés, pas de modification fixe, modifications variables : carbamidométhylation (C), oxydation (M), acétylation N terminale; tolérance de masse pour les ions précurseurs : 25 ppm pour les spectres MALDI TOF/TOF, 5 ppm pour le MALDI-Orbitrap et le FTICR, tolérance de masse pour les ions fragments : 0.3 Da for MALDI TOF, 0.9 Da for FTICR. Les fragments de matrice, kératine et trypsine de (m/z) suivants sont exclus : 806.08, 917.29, 1707.79, 2163.06 et 2273.18. Les protéines avec une probabilité p<0.05 sont validées.

Isoformes de Pin1

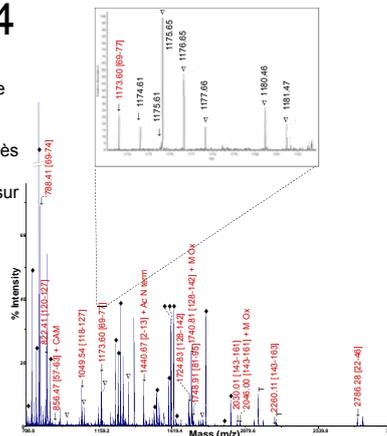


Les analyses par western blot en 2D montrent la présence de 5 isovariants de Pin1 dans les cellules SY5Y surexprimant Pin 1. Ces isovariants sont numérotés depuis l'isovariant natif (0) jusqu'aux plus acides (1 à 5) (à gauche, sur un gel coloré au Bleu de Coomassie, à droite résultat du WB avec un anticorps anti-Pin 1).

Exemple de l'isoforme 4

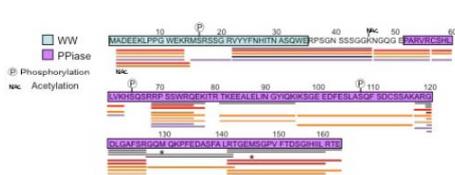
Analyse par cartographie peptidique (PMP) en analyse TOF. Les analyses démontrent la présence dans cet échantillon de Pin1 (J), PPIA (♦), NMDK (Δ) et de la trypsine (T). Encart : la haute résolution de l'analyse en MALDI Orbitrap permet la mesure précise de m/z de peptides distincts ayant des m/z très proches (par exemple, 1175.61 et 1175.65). La séquence de certains peptides est confirmée par MSMS sur un appareil FTICR (résultat MASCOT, en bas).

Protein	Accession	Sequence	Score	Expectation	Modification	Fragment	Mass (m/z)
Pin1	Q99686	MADEKALPGVWEKRMRSRSGRYVYFNHNTASQWEPK	10.2	1.0e-10	None	MADEKALPGVWEKRMRSRSGRYVYFNHNTASQWEPK	1175.61
Pin1	Q99686	MADEKALPGVWEKRMRSRSGRYVYFNHNTASQWEPK	10.1	1.0e-10	None	MADEKALPGVWEKRMRSRSGRYVYFNHNTASQWEPK	1175.65
Pin1	Q99686	MADEKALPGVWEKRMRSRSGRYVYFNHNTASQWEPK	10.0	1.0e-10	None	MADEKALPGVWEKRMRSRSGRYVYFNHNTASQWEPK	1175.69



Couverture de séquence et MPT

Couverture de séquence des 5 isovariants analysés.



* : Met oxydées;
 P : site de phosphorylation;
 Nac : résidu N-acétylé.
 Les domaines WW et PPIase de Pin1 sont respectivement colorés en bleu clair et violet.

Conclusions

- ✓ Nos analyses ont mis en évidence que plus de cinq résidus de Pin1 peuvent être modifiés, en particulier par des oxydations et des acétylations N terminales.
- ✓ Des analyses complémentaires visant à confirmer ces modifications sont en cours.
- ✓ L'étude de la relation entre la spécificité de ces modifications et les pathologies Tau, en particulier dans la maladie d'Alzheimer, est également menée.