

# DES CELLULES B LYMPHOBLASTOÏDES HUMAINES PAR ELECTROPHORESE BI DIMENSIONNELLE ET SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI -TOF ET ESI Q-TOF

J-P. LE CAER, V. LABAS, D. PFLIEGER

Laboratoire de Neurobiologie et diversité cellulaire. ESPCI CNRS UMR 7637 F 75231 Paris Cedex 05.

N. IMAM-SGHIOUAR, R. JOUBERT-CARON, M. CARON

Equipe de Biochimie des Protéines et Protéomique. UFR SMBH Léonard de Vinci. Université Paris 13.

## OBJECTIF

La constitution de cartographies de référence constitue un pré-requis pour l'étude protéomique de cellules lymphoïdes humaines. L'utilisation conjointe de l'électrophorèse bidimensionnelle sur gradients de pH immobilisés, de l'analyse informatique, de l'annotation des gels obtenus et de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS et ESI/MS/MS), nous a permis d'établir une cartographie protéique de cellules B lymphoblastoïdes.

## MATERIEL ET METHODE

### Electrophorèse bi dimensionnelle :

10 à 500 mg de protéines solubles des cellules lymphoblastoïdes de la lignée PRI en culture ont été séparées par électrophorèse bi-dimensionnelle.

Pour la première étape d'isoelectrofocalisation, deux gradients de pH immobilisés ont été utilisés : IPG 4-7 et 5-8 avec 1 appareil Proteom IEF Cell (Biorad). La seconde dimension est réalisée dans un gel de polyacrylamide en gradient 8-18% avec le système Proteom Ixi cell (Biorad).

**Coloration, analyse informatique :** Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie Colloïdal ou à l'argent puis ont été scannés et analysés au moyen des logiciels Melanie 2.3 (Biorad) et 3 (GeneBio).

### Digestion enzymatique :

Les spots d'intérêt ont été découpés et digérés dans le gel par la trypsine bovine (Roche Diagnostics) selon la méthode décrite par Shevchenko *et al.*, 1996. Après digestion des protéines, les peptides générés ont été extraits et dessalés sur micro-colonne Zip Tip C18 (Millipore).

### Spectrométrie de masse :

#### MALDI-TOF :

L'échantillon a été déposé sur la cible selon la méthode de la goutte séchée (v/v; 1 : 1) avec une solution saturée d'acide 2-5 dihydroxybenzoïque (DHB) en TFA 0.1%. Les cartes peptidiques ont été obtenues à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager DE-STR (Applied Biosystems, Framingham, MA), en mode réflectron positif avec une tension d'accélération de 20 000 V, une extraction retardée de 200 ns et environ 250 tir laser additionnés sont requis pour une acquisition spectrale. L'analyse et le retraitement des données ont été effectués par le logiciel Data Explorer (Applied Biosystems). Tous les spectres obtenus ont été déconvolués, d'une part en externe en utilisant les masses monoisotopiques des peptides Des-Arg Bradykinin (PM 904.4681) et ACTH (18-39) (PM 2465.1989) et d'autre part, en interne sur les produits d'autodigestion de la trypsine (fragment 207-214 : PM 906.50, fragment 152-142 : PM 1163.57, fragment 56-75 : PM 2163.06).

#### Séquençage par spectrométrie de masse tandem ESI-OTOF :

Le séquençage de certains des spots a été effectué soit en introduction directe par ionisation nano-spray soit par couplage d'une chaîne CLIP Ultimate LC Packing et d'un spectromètre Q-TOF 2 Micromass.

Les peptides sont fragmentés par CID (collision avec de l'argon à une énergie de collision entre 05 et 35 eV).

### Identification dans les banques de données

#### Mass finger printing :

Le logiciel Peptide a été utilisé pour identifier les protéines par comparaison des masses expérimentales des fragments typiques obtenus avec les masses calculées à partir des séquences des banques protéiques (SWISS-PROT) et nucléotidiques (GenBank/TrEMBL).

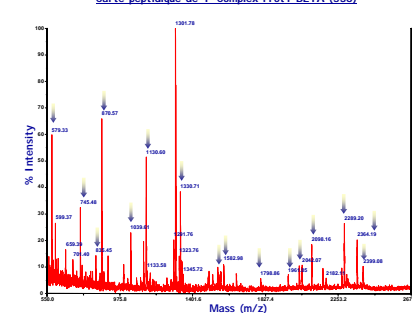
Les identifications ont été réalisées en prenant des tolérances de 0.1 Da sur la précision de mesure, +/- 1 unité de pH pour les points isoélectriques et 30 % de variation sur les masses moléculaires calculées à partir de la deuxième dimension de l'électrophorèse.

#### Identification à partir des spectres MS/MS

Les spectres de fragmentation ont été utilisés après déconvolution par Max Ent 3, et les spectres reconstitués sauvegardés sous format\*.dat ont servi à la recherche de peptides homologues dans Mascot.



Carte peptidique de T-Complex Prot1 BETA (5.30)



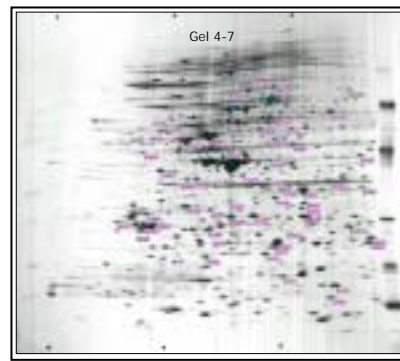
### Peptide mass fingerprinting Peptide

Name of the database protein: ...  
 Species searched: ...  
 Database searched: ...  
 Mass (Da): ...  
 MS (Da): ...  
 Peptide masses for which protein: ...  
 Tolerance: ...  
 Minimum number of peptides required to match: ...  
 Minimum number of matching proteins: ...  
 % of the database protein: ...  
 Score: ...  
 Score for each protein: ...  
 Score for each protein: ...  
 Score for each protein: ...  
 Score for each protein: ...

Protein	Score	Protein	Score
...	...	...	...
...	...	...	...

## Résultats

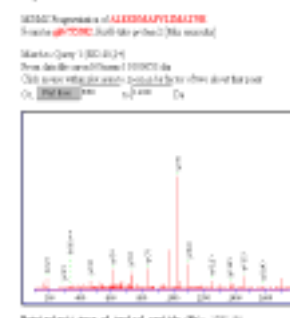
N° spot	N°accés Swiss-prot	Nom de la protéine	pi	pI	MW	AMW (Da)	Peptides trouvés	% de Couverture de la Séquence	Méthode d'identification	Maturation de N terminal
43	Q04917	I43-3 PROTEIN ETA	4.92	0.16	28500	18	5	17.1	MS	
75	P28122	ACTIN, BETA	4.85	0.27	27000	16	16	52.7	MS	
561	P05388	G05 PROTO RIBOSOMAL	5.29	nd	37286	nd	nd	nd	Match	
4	P08865	67 kDa LAMNIN RECEPTOR	4.97	0.18	40356	18.9	9	29.8	MS	Met-
1	P02570	ACTIN, BETA	5.29	0	41899	0.5	16	46.3	MS	
2	P02570	ACTIN, BETA	5.14	0.04	42072	0.9	14	38.8	MS	
3	P02570	ACTIN, BETA	5.09	0.21	42196	1.4	10	24.6	MS	Met/acc2
139	P32301	ANNEXIN 2	5.68	0.09	45079	3.9	16	36.5	MS	
57	P23526	ADENOSYL-HOMOCYSTEINASE	6.15	0.12	42596	12	13	21.8	MS	
22	P09625	ANNEXIN V	5.72	0.13	31869	7.7	12	28.9	MS	
120	P08758	ANNEXIN V	5.05	0.11	32300	10.9	22	62.4	MS	
507	P08133	ANNEXIN VI	5.54	nd	78186	nd	nd	nd	Match	
505	P08133	ANNEXIN VI	5.45	nd	80364	nd	nd	nd	Match	
504	P08133	ANNEXIN VI	5.49	nd	78014	nd	nd	nd	Match	
142	P07741	APRT	5.56	0.23	22170	11.9	6	40.2	MS	Met-acc1
144	Q15511	AR 16	5.6	0.13	18200	10.3	4	33.1	MS	
176	P07377	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE	4.99	0.17	52210	6.5	15	36.3	MS	
117	P52607	CAG2	5.53	0.1	36900	9.8	14	53.1	MS	
118	P47756	CAPB	5.65	0.04	32800	6.6	10	36.4	MS	
107	Q00299	FLUORIDE INTRACELL CHANNEL PROT 1	5.26	0.24	30359	11.1	7	36.8	MS	
95	Q09639	CORNELI	5.62	0.11	41825	3.7	12	18.8	MS	
122	Q15691	EBI1	5.06	0.13	32400	5.2	13	42.2	MS	
167	Q9Y230	ECP 51	5.61	0.12	50000	12.3	15	40.2	MS, MS/MS	
175	P14424	FPP SYNTHETASE	5.07	0	38400	5	11	28.3	MS	
18	P52666	G05 HUMAN	5.14	0.04	42590	12.5	11	29.2	MS	
541	P48637	GSHB1	5.6	nd	52854	nd	nd	nd	Match	
23	P09211	GTP_HUMAN	5.61	0.16	24522	5.2	7	60.8	MS	
504	P11142	HEAT SHOCK COGNATE 71 KD	5.62	nd	74900	nd	nd	nd	Match	
103	P11142	HEAT SHOCK COGNATE 71 KD	5.62	nd	74900	nd	nd	nd	Match	
51	P04792	HSP 37 KD	6.06	1.77	28000	20.3	12	46.2	MS	
86	Q15433	HYPOTHETICAL 33333 KD	5.53	0.12	41900	8.7	13	37	MS	
45	Q12765	HYPOTHETICAL PROTEIN KIAA0093	4.92	0.21	48274	15.6	8	24.3	MS	
420	Q13347	I1	5.51	nd	48381	nd	nd	nd	Match	
115	Q06233	IGUP 1-5111	5.72	0.03	30479	15.4	17	70.7	MS	
116	Q15181	INORGANIC PYROPHOSPHATASE	5.6	0.06	34200	4.5	9	33.9	MS, MS/MS	Met-acc2
23	Q13920	INTRACELLULAR AUTOANTIGENE	5.62	0.1	42000	3.5	7	24.7	MS	
99	P13796	L-PLASTIN	5.26	0.06	64000	11.6	18	29	MS	
100	P13796	L-PLASTIN	5.22	0.02	64000	10.7	13	21.2	MS	
98	P13796	L-PLASTIN	5.35	0.15	64000	9.8	16	31.4	MS	
73	P13796	L-PLASTIN	5.48	0.28	64000	12.13	13	21.5	MS	
130	Q04760	LACTOYLGLUTATHIONE LYASE	5.1	0.15	24181	18.3	9	36.1	MS	
151	Q04760	LACTOYLGLUTATHIONE LYASE	5.25	0	24453	16	9	36.1	MS	
134	Q14847	LAMP-1	6.17	0.45	36815	18.6	6	29.9	MS	
29	P07395	LAMB3 CHAIN	5.72	0	34000	2	14	37.2	MS	
76	P13004	PCNA	4.75	0.17	32800	12	18	6.4	MS	
108	Q15129	PROTEASOME ACTIVATOR SUBUNIT B	5.6	0.06	30600	10.3	19	66.1	MS	
130	P02870	PROTEASOME BETA CHAIN	5.7	0.19	25790	5.1	8	45.7	MS	
109	P02870	PROTEASOME BETA CHAIN	5.66	0.23	25448	8	5	27.9	MS	
131	P49730	PROTEASOME THETA CHAIN	6.24	0.02	25645	12	6	28.3	MS	
41	P12866	PROTEASOME ZETA CHAIN	4.8	0.11	27000	11.8	7	33.4	MS	
13	Q09628	RETINOBLASTOMA BINDING PROT P48	4.8	0.1	42590	4.7	9	27.7	MS	
16	P13489	RIBONUCLEASE INHIBITOR	4.82	0.11	42848	0.3	16	40.4	MS	
130	Q14885	RNA BINDING PROTEIN REGUL	6.22	0.11	24522	18.8	12	55	MS	
149	P30625	SORCIN PROTEIN 23KD	5.08	0.19	21370	0.8	10	56.5	MS	
119	Q15511	SPIRAMIDE SYNTHASE	5.28	0.04	30389	0.3	9	28.3	MS	
106	P17987	T-COMPLEX PROTEIN 1 ALPHA	5.94	0.14	61860	2.5	9	21.3	MS, Match	
126	P50960	T-COMPLEX PROTEIN 1 THETA	5.58	0.09	58049	6.9	20	40.5	MS	
125	P48643	TCP-1 EPSILON	5.15	0.13	37121	2.9	21	46.1	MS	
143	P23119	THIOREDOXIN PYRIDOXASE 1	5.59	0.06	22513	12.4	11	32	MS	
562	P75837	TRANS ALDOLASE	5.92	nd	31769	nd	nd	nd	Match	
78	P12324	TROPOMYOSIN CYTOSKELETAL TYPE	4.85	0.1	30900	6.3	26	74.6	MS	
28	P04687	TUBULIN ALPHA 1B	5.15	0.14	48388	3.2	13	41.2	MS	
31	Q16261	TUBULIN PROTEIN LIASE	5.94	0.17	45708	0.8	8	40.2	MS	
66	Q9Y384	UNR-INTERACTING PROTEIN	5.09	0.11	38801	0.1	13	46.3	MS	
100	P03120	URIDYLKINASE INHIBITOR	5.59	0.14	42807	3.5	14	27.2	MS	



### Mascot Search Results



### Peptide View



## Conclusions

Les cartographies protéiques présentées dans ce poster sont accessibles à la communauté scientifique sur le site internet : <http://www.smbh.univ-paris13.fr/bap/index.htm>.

Sur 144 spots analysés par cartographie peptidique massive, 118 ont abouti à une identification fiable de la protéine contenue dans ce spot, ce qui représente un taux de réussite de 82%.

Les différences de pI entre les valeurs déterminées sur gel et les valeurs calculées à partir des séquences est de 0.16 unités de pH en moyenne. Les écarts de poids moléculaires entre les valeurs expérimentales et théoriques sont en moyenne de 7.7%. L'analyse méticuleuse des spectres MALDI-TOF permet dans un certain nombre de cas de déterminer la nature du N terminal de la protéine.