

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

D. PFLIEGER¹, A. DELAUNAY², M.-B. BARRAULT^{1,2}, M. TOLEDANO², J. VINH¹, J. ROSSIER¹,
¹Neurobiologie et Diversité Cellulaire, ESPCI, CNRS UMR 7637, 75231 Paris Cedex 05

²Laboratoire 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 (Delaunay et al., 2000).

En présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), 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^{C303A} 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 (Delaunay 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^{C303A} 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 (H₂O/acétonitrile/AF, 96/4/0,1, v:v:v) à 50% de tampon B (H₂O/acétonitrile/AF, 10/90/0,085, v: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 Maxlynx (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 tryptiques 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

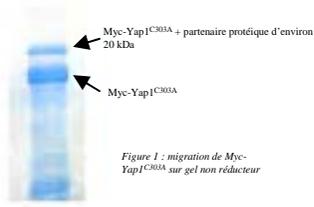


Figure 1 : migration de Myc-Yap1^{C303A} sur gel non réducteur

Après extraction protéique de cellules de levure traitées au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), 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 ce qui s'agit de 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^{C303A}.

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

