

Caractérisation des isoformes d'une protéine de 55 kDa, la tubuline par MALDI in source decay et T3 sequencing.

D. Calligaris(1) • C. Villard(1) • L. Terras(2) • D. Braguer(1) • P. Verdier-Pinard(1) • D. Lafitte(1) • (1)INSERM UMR 911, Centre de Recherche en Oncologie biologique et en Oncopharmacologie, Plateforme d'Innovation Technologique Timone, Marseille, France • (2)Société Syntropis, Technopôle de Château Gombert, Marseille, France

L'expression des isotopes d'une protéine est sous le contrôle de plusieurs gènes, et les isoformes issus d'un même gène sont produits par épissage alternatif et/ou par modification post-traductionnelle. Ces processus participent à la complexité du protéome. Ces protéines homologues sont souvent fonctionnellement différentes et sont impliquées dans la régulation de différents processus physiologiques. Elles représentent dans certains des biomarqueurs intéressants. La détection de différents isoformes au sein d'une famille de protéines nécessite une large couverture de la séquence en acides aminés. En spectrométrie de masse, la caractérisation des protéines est habituellement effectuée en utilisant des approches de type bottom-up par collision induced dissociation ou par post source decay. Néanmoins, les protocoles associés exigent une digestion préalable des protéines, ceci allongeant le temps de traitement des échantillons. De plus la couverture complète de la séquence protéique est rarement atteinte et les extrémités N- et C-terminales, zones les plus souvent divergentes pour une famille donnée de protéines, ne sont souvent pas séquencées. La tubuline protéine de 55 kDa s'assemblant en hétérodimère, est une cible majeure en chimiothérapie anticancéreuse. Elle possède différents isotopes qui se différencient par les derniers acides aminés, majoritairement acides, composant leur extrémité C-terminale. Certains isotopes peuvent être exprimés de manière spécifique au sein de certaines tumeurs comme par exemple BII dans les cellules de différents carcinomes. Des études ont émis comme hypothèse que la sélection isotypique s'opérant au sein des cellules tumorales peut avoir des conséquences importantes sur la régulation des propriétés dynamiques des microtubules et donc sur la réponse des tumeurs aux agents anti-microtubules. Ainsi, la surexpression de l'isotype DIII est un marqueur de mauvais pronostic pour un large éventail de tumeurs d'origine humaine. Des études précliniques ont montré qu'un niveau élevé d'expression de l'isotype DIII est associé à une résistance au paclitaxel dans des lignées tumorales humaines.

Pour cette raison, la caractérisation des isoformes de tubuline dans diverses lignées cellulaires humaines a fait l'objet d'intenses recherches par des approches

de protéomique dites classiques. Toutefois le profil d'expression de l'isotype DIII est difficile à déterminer ; ceci étant dû à une séquence C-terminale spécifique et un faible niveau d'expression comparé aux autres isotopes. Pour la caractérisation de biomarqueurs et le développement de médicaments, une avancée majeure serait de trouver une stratégie de spectrométrie de masse permettant de caractériser cet isotype et les autres simultanément.

Pour caractériser les isotopes d'une protéine, l'approche top-down par MALDI in-source decay (ISD) paraît être une technique émergente. Lors de ce processus, une augmentation de la fluence laser conduit à la fragmentation des protéines. A partir d'un simple spectre, il est possible d'avoir une connaissance étendue des séquences N- et C-terminales d'une protéine. Les travaux menés au sein de notre laboratoire ont pour la première fois mis en évidence une fragmentation ISD non conventionnelle de l'extrémité C-terminale d'une protéine de masse supérieure à 50 kDa en l'occurrence, la tubuline de cellules HeLa. A partir d'un seul spectre, il a été possible de caractériser tous les isotopes de l'échantillon de tubuline γ compris les plus minoritaires. Des analyses complémentaires de T3-sequencing, technique de pseudo MS3 ont permis d'avoir de confirmer sans ambiguïté la présence de ces isotopes [Calligaris et al. Anal Chem. In press].

Ces résultats ouvrent des perspectives majeures dans le domaine de la protéomique clinique. Nous envisageons des applications dans le domaine de la caractérisation in situ d'isoformes protéiques.