

Nouvelle approche protéomique pour l'analyse du SUMOylome humain et l'identification des sites de modification

Pierre Thibault(1,2) • Louiza Mabrouche(1,2) • Frédéric Galisson(3) • Eric Bonneil(1) • Mounira Chelbi-Alix(3)

(1)IRIC, Institut de recherche en immunologie et en oncologie, Université de Montréal, Canada • (2)Département de Biochimie,

Université de Montréal, Montréal, Canada • (3)CNRS FRE2937, Institut André Lwoff, Villejuif, France

Small Ubiquitin Modifier (SUMO) est une protéine exprimée chez les eucaryotes et conservée de la levure à l'être humain. SUMO forme un lien isopeptidique sur une lysine acceptrice des protéines telles promyelocytic leukemia (PML), Mdm2, c-MYB, c-Jun, et p53 et sa dérégulation peut entraîner la tumorigenèse. Cette modification est étroitement associée à l'ubiquitination et implique une cascade similaire d'enzymes. Contrairement à l'ubiquitination qui entraîne une dégradation de la protéine modifiée par le protéasome, la sumoylation a des incidences sur le trafic intracellulaire, l'intégrité du génome et la signalisation cellulaire. L'identification des sites de sumoylation par spectrométrie de masse (MS) est un défi analytique de taille en raison de la très faible abondance de cette modification *in vivo* et de la présence d'un long segment C-terminal n'ayant pas d'acide aminé Lys/Arg chez les isoformes SUMO1-3 des mammifères. Pour pallier à ces deux limitations, nous avons développé une nouvelle approche protéomique impliquant différentes constructions des paralogues SUMO marqués avec 6xHis et comprenant un site de clivage trypsique à l'extrémité C-terminal de SUMO.

Les cDNA His6-SUMO1-3 mutants et les constructions sauvages correspondantes ont été générées par PCR avec des amorces contenant His6 tag et les sites de restriction KpnI et NcoI restriction sites, lesquelles ont été utilisées pour exprimer de façon stable les protéines His6-SUMO1-3 mutantes dans les cellules HEK293. Les cellules HEK293 normales ou exprimant les protéines His6-SUMO1-3 mutantes (traitées et non-traitées à l'As₂O₃, 1 µM, 4h) ont été lysées pour isoler les protéines nucléaires (500 µg / condition). Les protéines SUMOylées ont ensuite été enrichies au Ni²⁺/NTA (Invitrogen) et digérées par la trypsine. Les produits de digestion trypsique ont été analysés par 2D LC-MS/MS sur un LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher) ou immunoprecipités avec un anticorps spécifique au bout C-terminal de SUMO-3 avant leur analyse par MS. Les spectres d'ions fragments ont été obtenus par activation collisionnelle et par dissociation par transfert d'électron (ETD). La cartographie peptidique et le profil de tous les ions peptidiques détectés dans les différentes analyses 2DLC-MS/MS a été réalisée en utilisant un logiciel maison (MassSense). Les spectres

MS/MS ont été corrélées à une base de données de protéines humaines en utilisant les logiciels Mascot et ChopNSpice. Notre méthode de double affinité est basée sur l'expression de protéines His-SUMO comprenant des mutations spécifiques à chacun de paralogues SUMO. Ces mutations ne compromettent pas les fonctions associées à la sumoylation et permettent l'introduction d'une arginine près de l'extrémité C-terminale. L'arginine est ainsi stratégiquement située dans le but de former un segment de cinq acides aminés (ramification SUMO) lié de manière covalente à la lysine du peptide cible suite à la digestion trypsique. Il est ainsi possible d'enrichir les peptides modifiés grâce à un anticorps spécifique à cet épitope. De plus, durant la fragmentation ETD dans le spectromètre de masse, la ramification SUMO forme des ions fragments spécifiques (par exemple: ions fragment c provenant de NQ, NQT, NQTG). Une comparaison de la distribution des protéines provenant de cellules exprimant ou non les His-SUMO1-3 mutants nous a permis de distinguer les protéines sumoylées de celles se liant de façon non-spécifique à la colonne NTA. En outre, nous avons pu identifier plus d'une centaine de protéines sumoylées et confirmer la localisation des sites de modification dont ceux des protéines TRIM28 (K750, K779) et PML (K490). L'analyse des extraits protéiques provenant de cellules HEK293-His-SUMO mutant par protéomique quantitative a permis de déterminer l'augmentation des niveaux de sumoylation chez différentes protéines suite au traitement à l'arsenic (As₂O₃), un agent thérapeutique utilisé dans les cas de leucémie promyélocytaire aigüe. Entre autre, l'analyse protéomique quantitative a révélée la sumoylation préférentielle de la protéine PML. La stratégie d'enrichissement par double affinité nous a également permis de mettre en évidence des sites de sumoylation SUMO1 chez des protéines dont les niveaux de modification sont moins élevés (e.g. SaFB2, Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5). De plus, des essais de sumoylation *in vitro* ont permis pour la première fois l'identification des sites de modification des histones dont certains ont pu être confirmés dans nos études *in vivo* (e.g. H3K23). Cette présentation décrira les perspectives analytiques de cette nouvelle approche protéomique et ses applications pour l'analyse du sumoylome humain.