



Spectrométrie de masse et structure de protéines

Julia Chamot-Rooke

Laboratoire des Mécanismes Réactionnels
Ecole Polytechnique

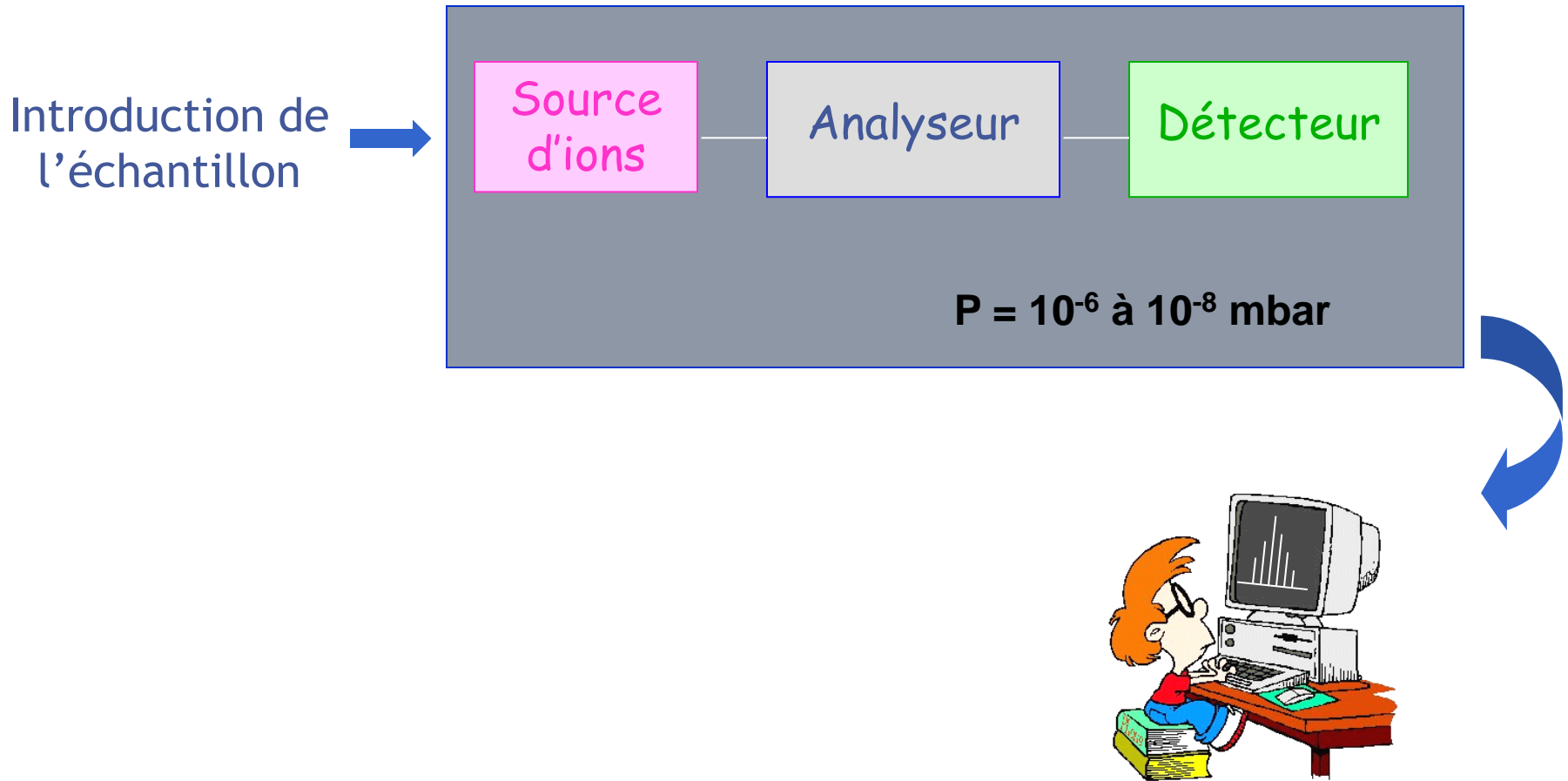
- La spectrométrie de masse en biologie
 - ✓ Les bases
 - ✓ Intérêt de la spectrométrie de masse à très haute résolution
 - ✓ Quelles informations structurales pour des protéines?

- Analyse structurale de protéines portant des modifications post-traductionnelles
 - ✓ Antigène de *M. tuberculosis*
 - ✓ Protéine glycosylée de *N. meningitidis*

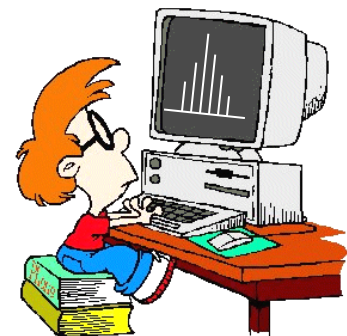
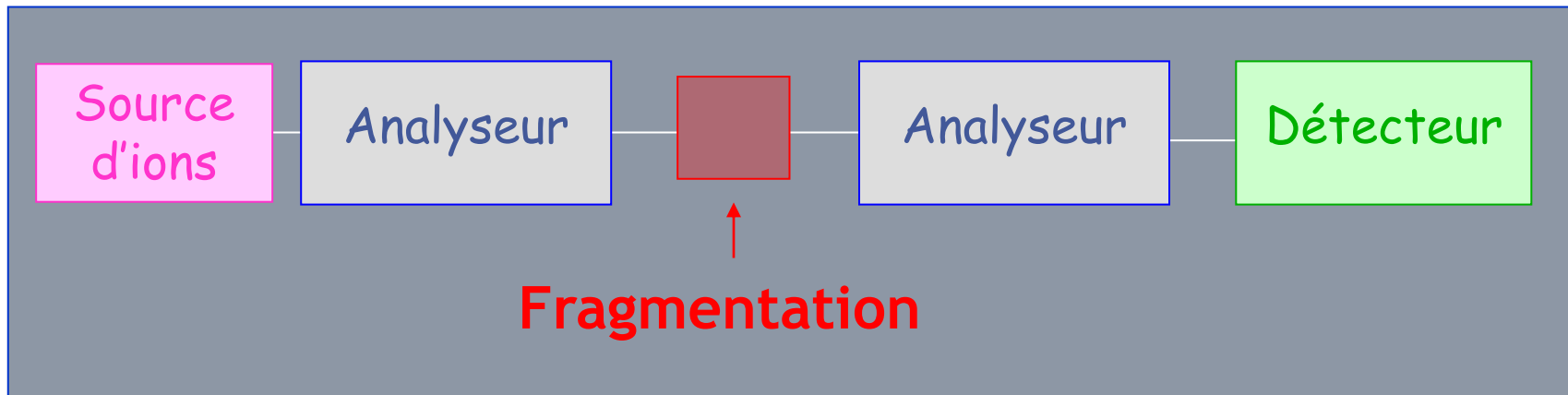
- La spectrométrie de masse en biologie
 - ✓ Les bases
 - ✓ Intérêt de la spectrométrie de masse à très haute résolution
 - ✓ Quelles informations structurales pour des protéines?

- Analyse structurale de protéines portant des modifications post-traductionnelles
 - ✓ Antigène de *M. tuberculosis*
 - ✓ Protéine glycosylée de *N. meningitidis*

Qu'est-ce qu'un spectromètre de masse?

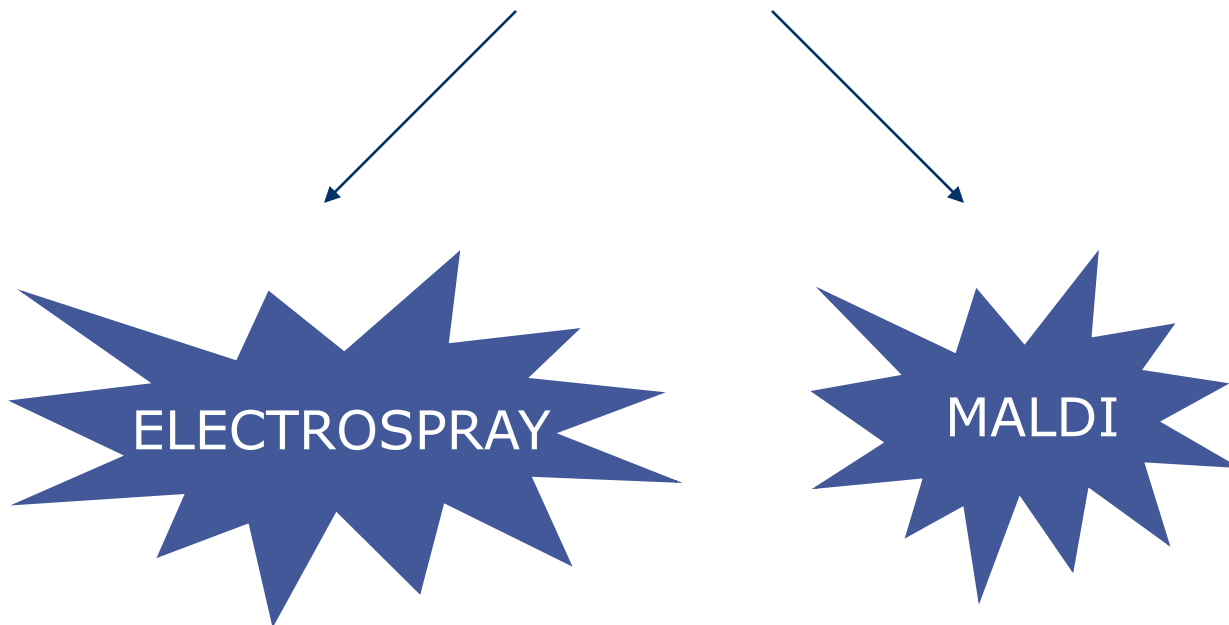


Spectrométrie de masse tandem

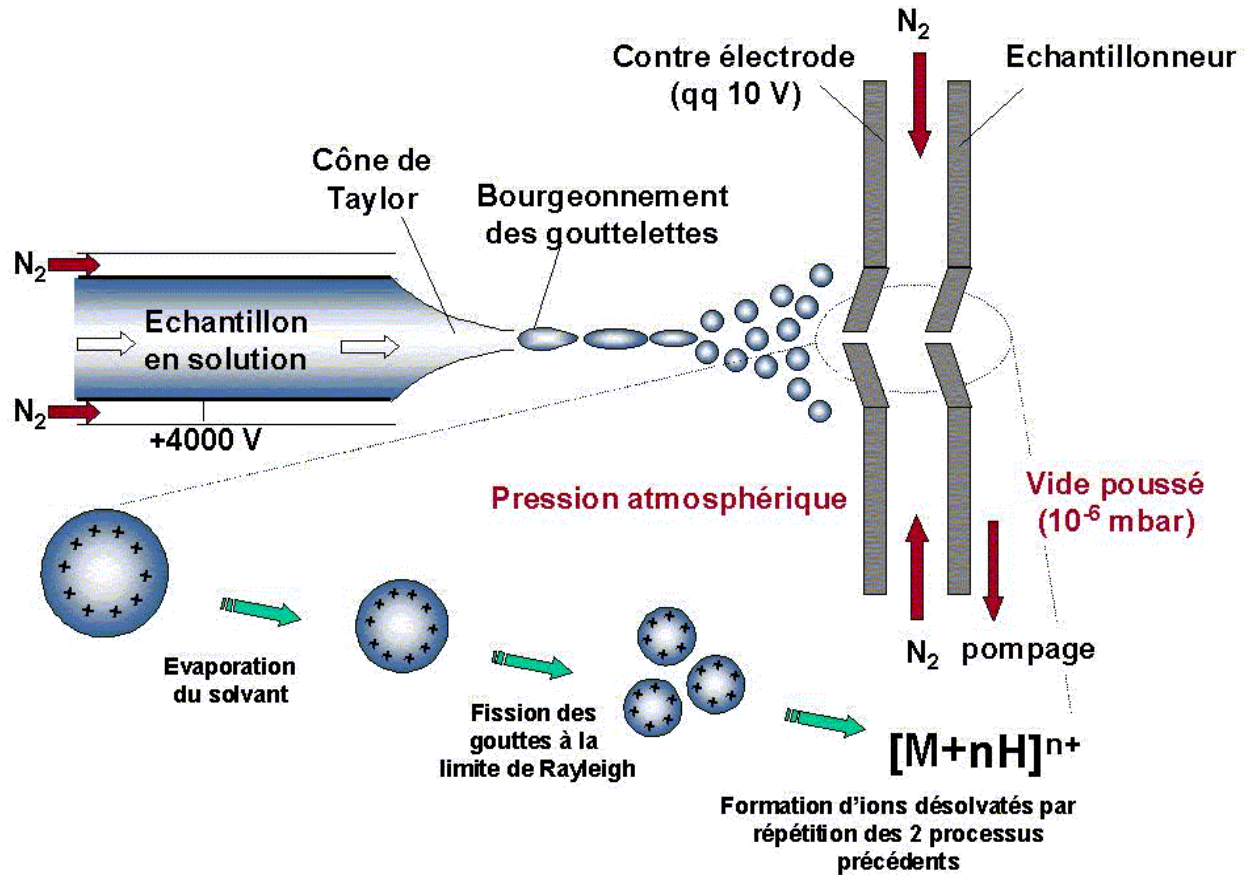


Formation des ions

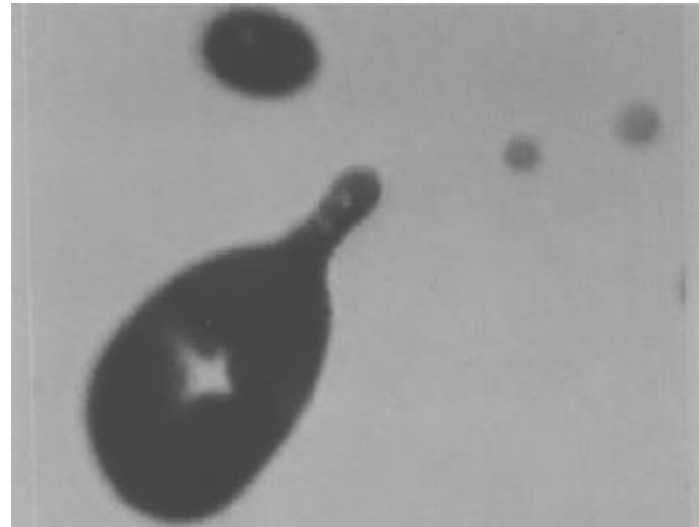
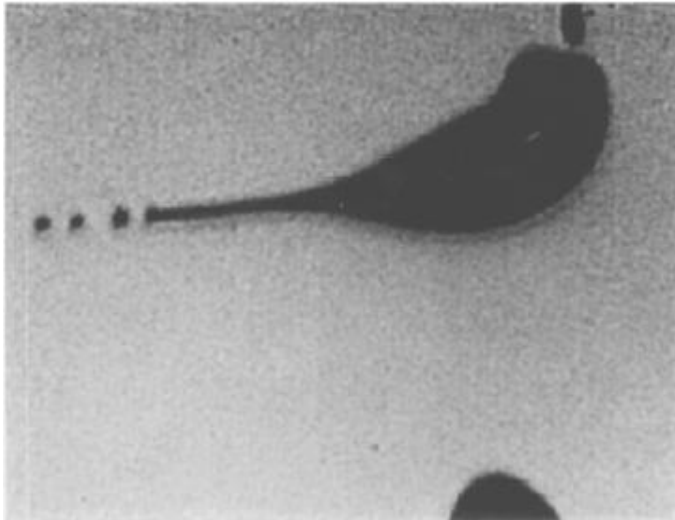
- La spectrométrie de masse nécessite l'ionisation de l'échantillon
- Quelles techniques d'ionisation pour les biomolécules?



Source electrospray



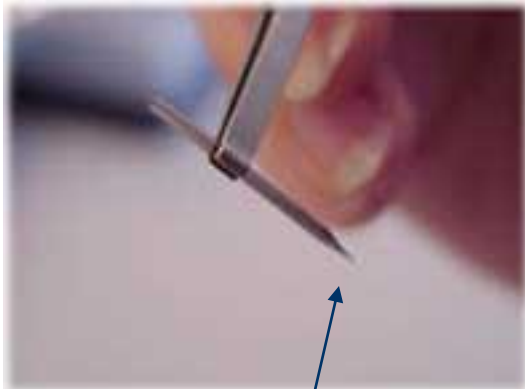
Cône de Taylor en formation



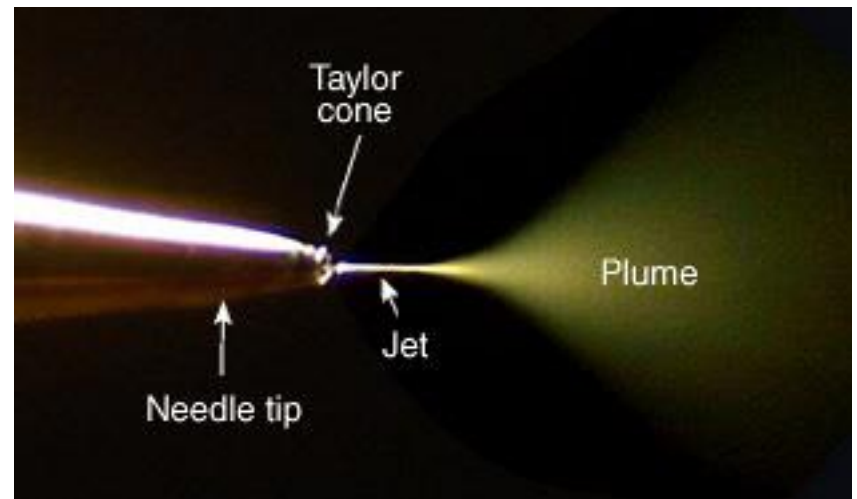
R. Cole, J. Mass Spectrom. 2000, 35, 763.

Les sources nanospray

- Utilisation d'aiguilles remplies de qq mL de solution
- Pas de gaz de nébulisation, température et tensions plus faibles
- Débit de qq nL/min



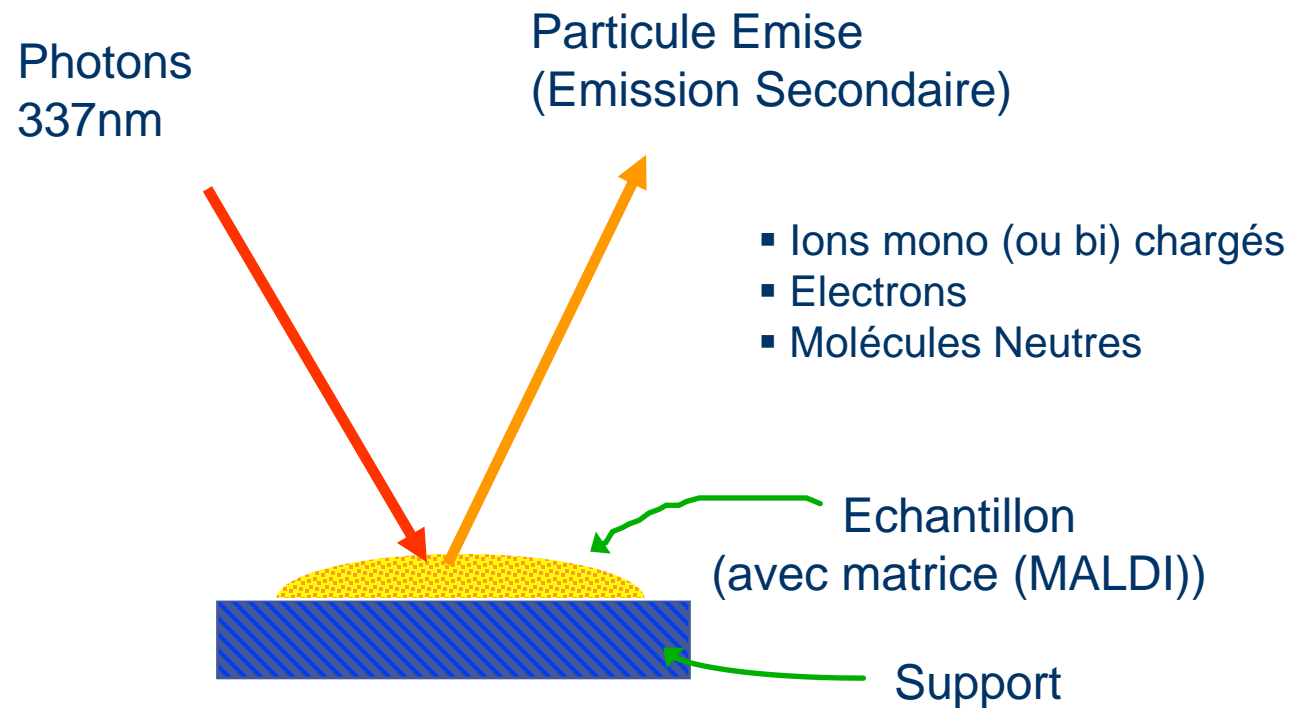
diamètre de 1-4 μm



picture from <http://www.newobjective.com/>

Source MALDI

- Passage de molécules à l'état solide à des ions à l'état gazeux



Prix Nobel de chimie 2002

John FENN



Electrospray

Koichi TANAKA



MALDI

- Principe de fonctionnement : Action d'un champ électrique **E** ou d'un champ magnétique **B** sur les ions

- Types d'analyseurs
 - ✓ Secteur magnétique (B)
 - ✓ Résonance cyclotronique ionique (B)
 - ✓ Temps de vol (E)
 - ✓ Filtre quadripolaire et piège ionique [E(t)]

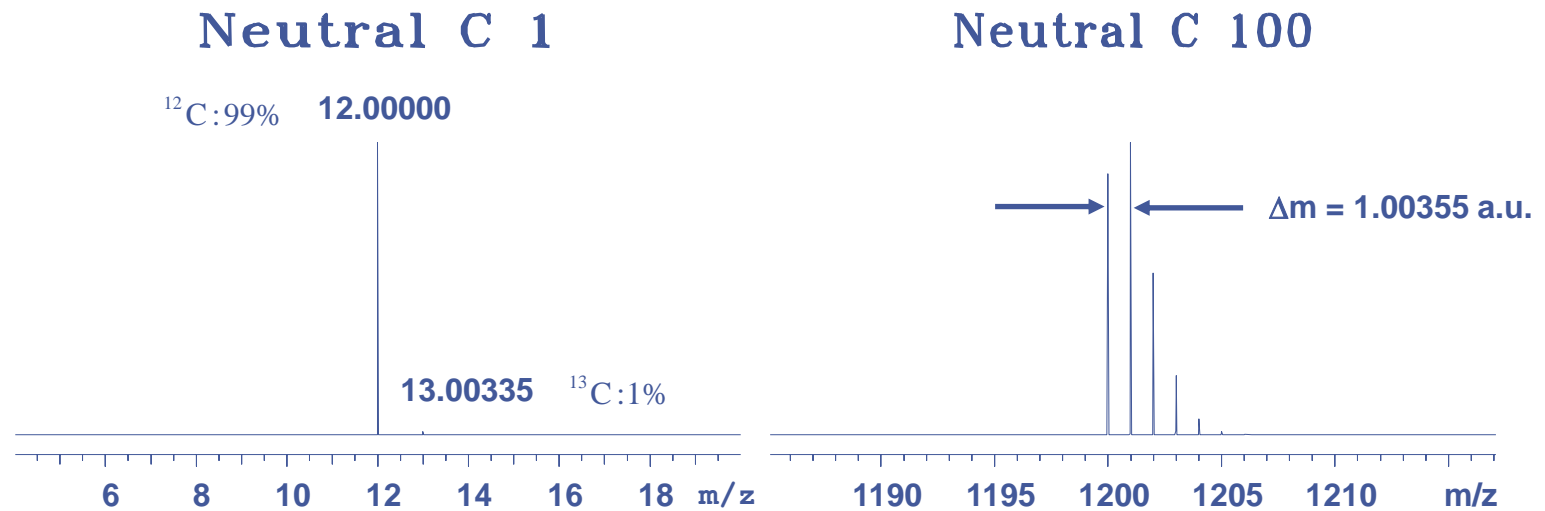
Les analyseurs : comparaison

Analyseur	Résolution	Précision	Gamme de masse
Magnétique	10^2 - 10^5	1-5 ppm	10^4
ICR	$>10^6$	1-5 ppm	10^4
Temps de vol	10^3 - 10^4	5-50 ppm	
Quadrupôle	10^2 - 10^3	100 ppm	$< 10^4$
Piège à ions	10^2 - 10^3	100 ppm	650 - 6000

Les analyseurs : comparaison

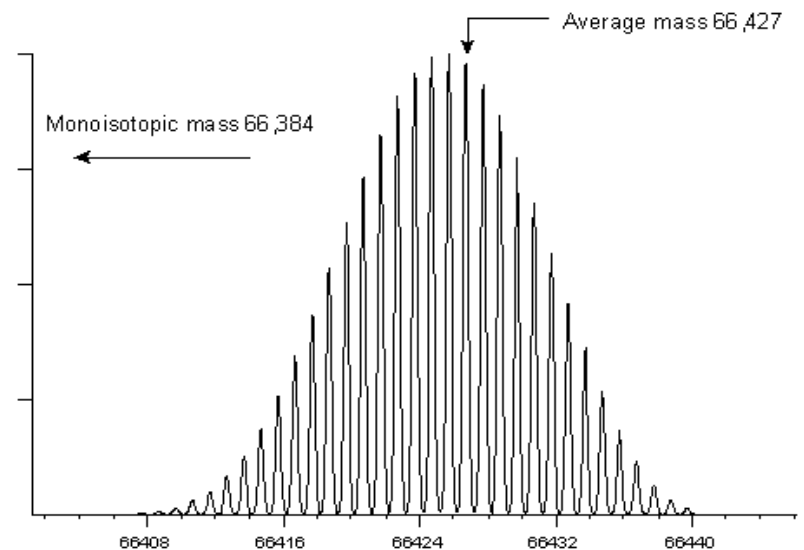
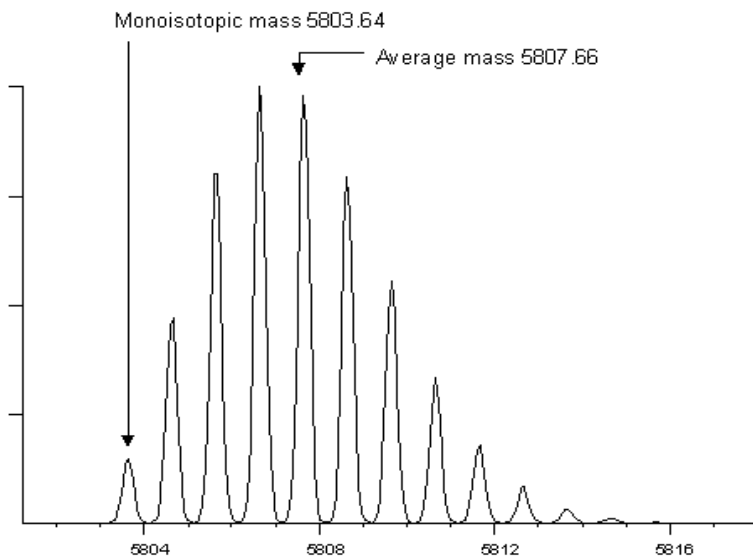
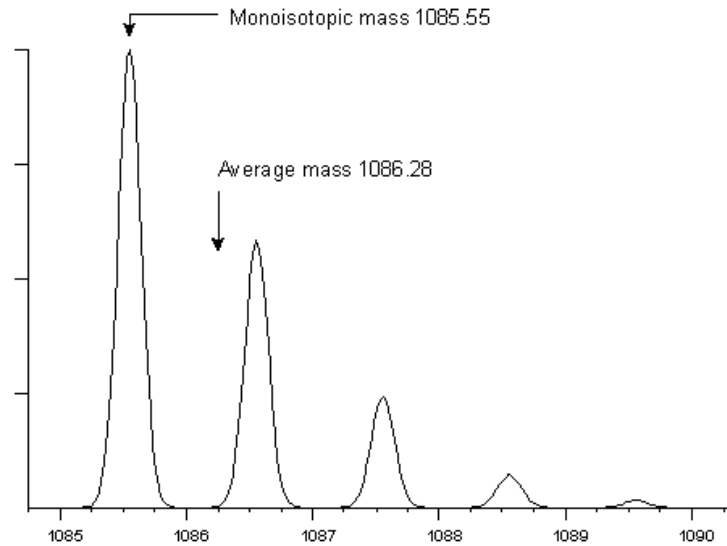
Analyseur	Résolution	Précision	Gamme de masse
Magnétique	10^2 - 10^5	1-5 ppm	10^4
ICR	$>10^6$	1-5 ppm	10^4
Temps de vol	10^3 - 10^4	5-50 ppm	
Quadrupôle	10^2 - 10^3	100 ppm	$< 10^4$
Piège à ions	10^2 - 10^3	100 ppm	650 - 6000

Distribution isotopique



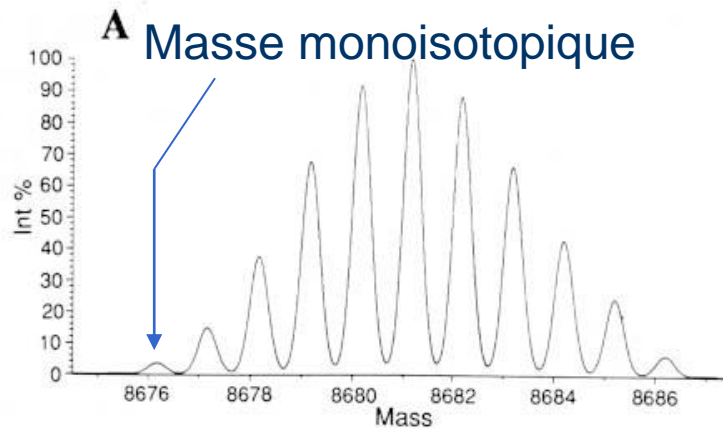
L'intensité du pic $^{12}\text{C}_n$ diminue progressivement quand n augmente.

Quand la masse augmente...



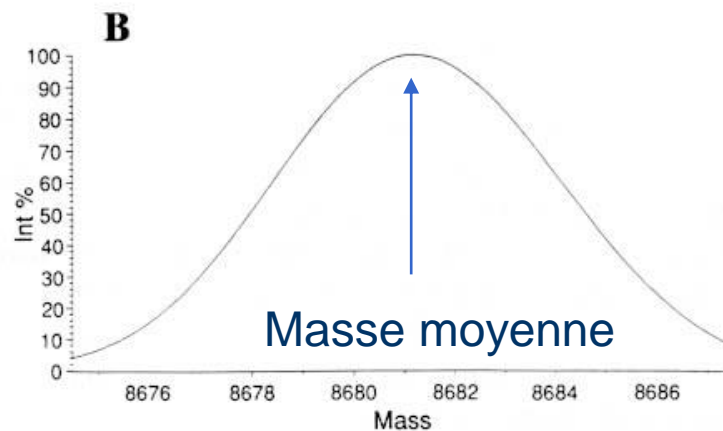
Distribution isotopique et résolution

Exemple : Proinsuline bovine ($C_{381}H_{586}N_{107}O_{114}S_6$)



Résolution = $M/\Delta M$

R=10 000



R=1 000

Un spectromètre de masse FT-ICR

Aimant supraconducteur 7 T

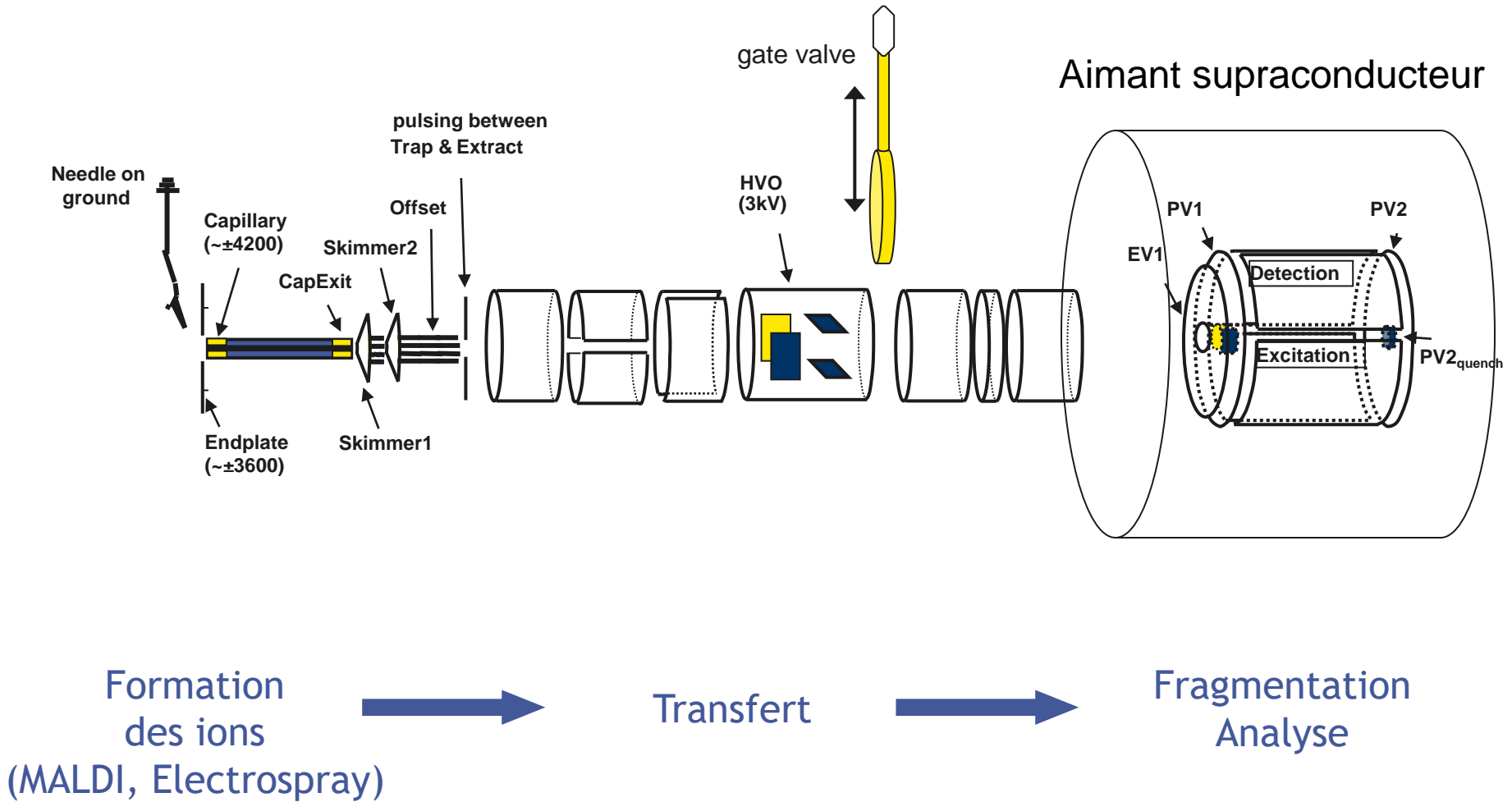


Cellule de piégeage

Transfert des ions

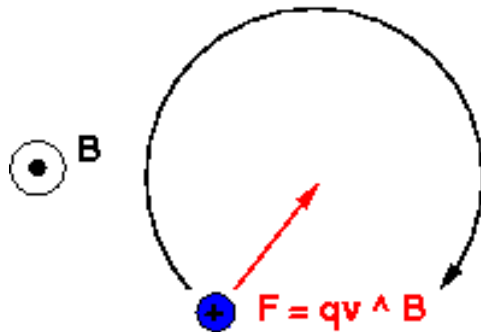
Sources d'ionisation

Schéma de l'instrument

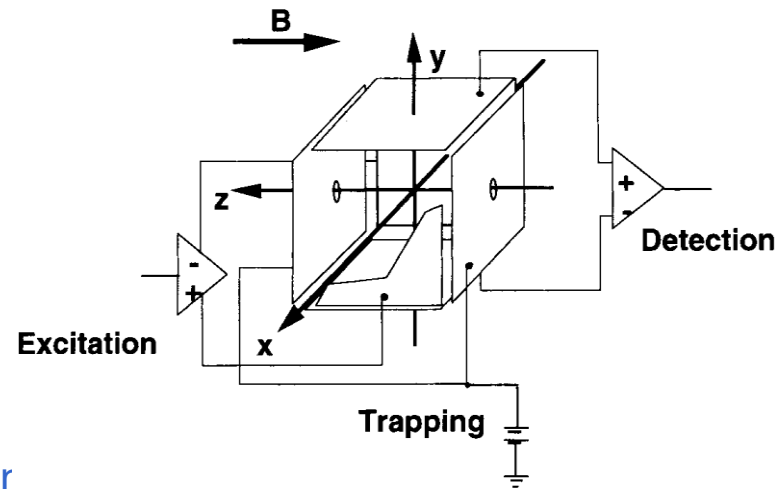


Cellule de piégeage et de mesure

- Piégeage des ions dans un champ magnétique et un champ électrique



Mouvement d'un ion dans un champ magnétique



Cellule de piégeage

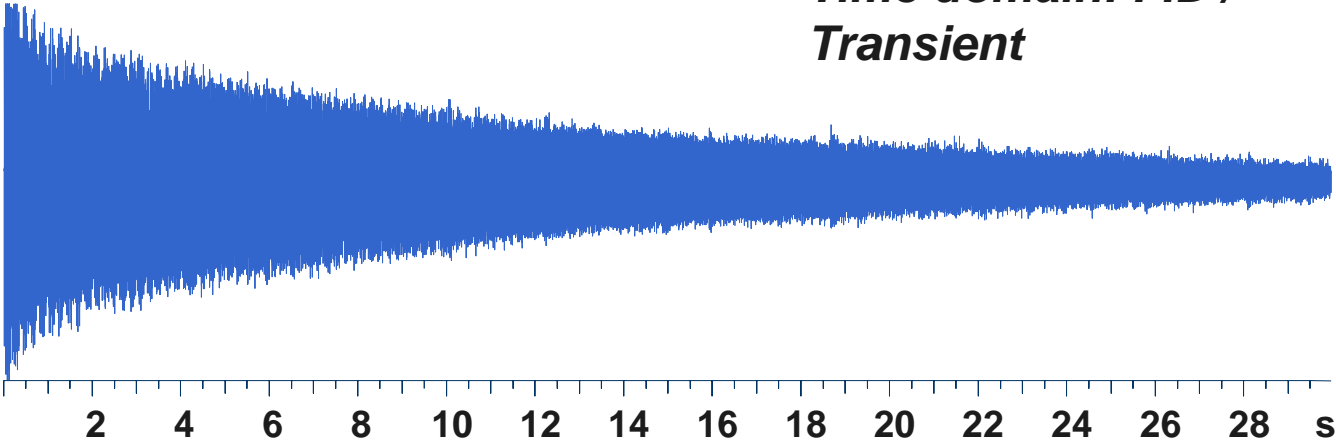
- Mesure de la fréquence cyclotronique des ions

$$\nu_c = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{qB}{m} = \frac{1.535611 \times 10^7 B}{m/z} \text{ Hz (m/z en u.m.a.)}$$

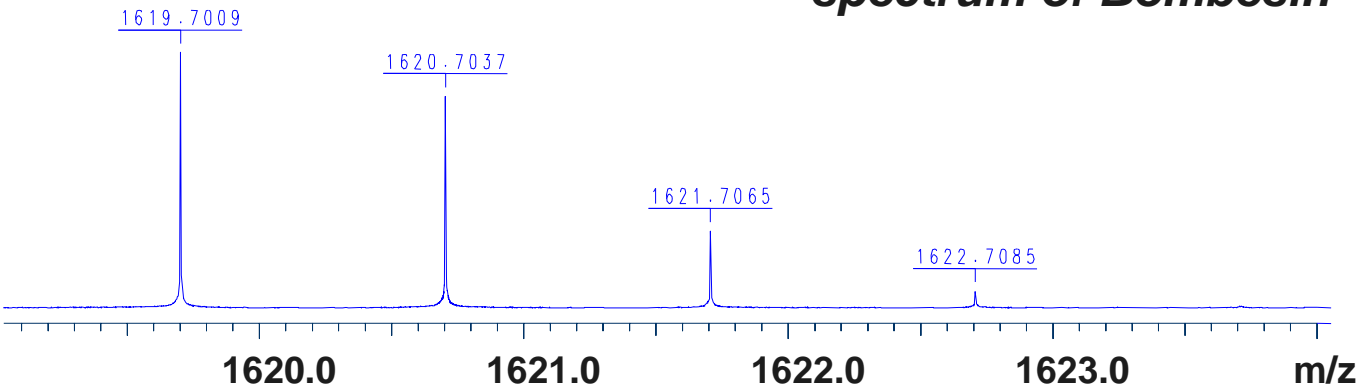
Transformée de Fourier du signal

*Time domain: FID /
Transient*

FT

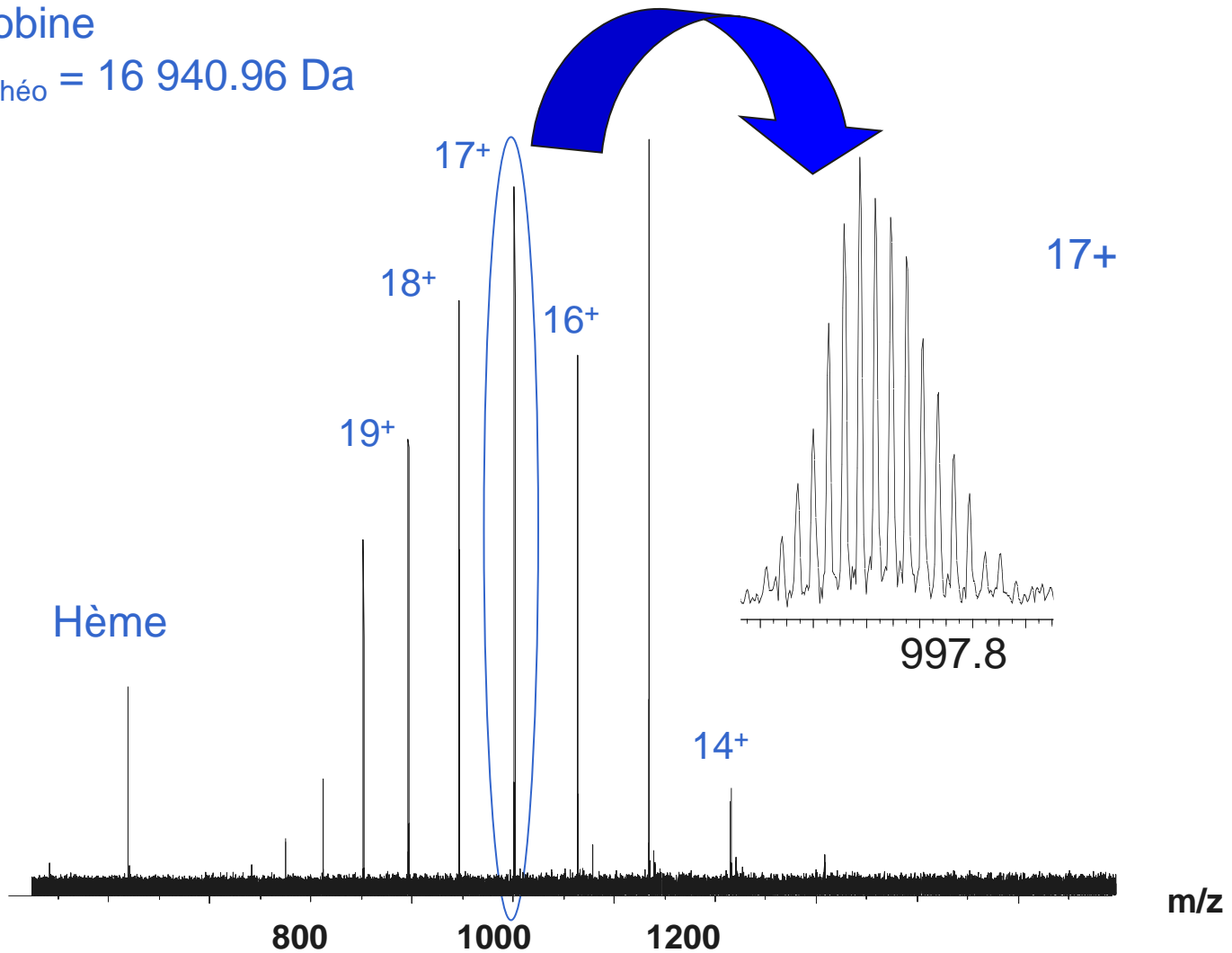


*Frequency domain: mass
spectrum of Bombesin*



Analyse d'une protéine de 17 kDa

Myoglobine
 $M_{\text{mono théo}} = 16\,940.96 \text{ Da}$



Performances du FT-ICR

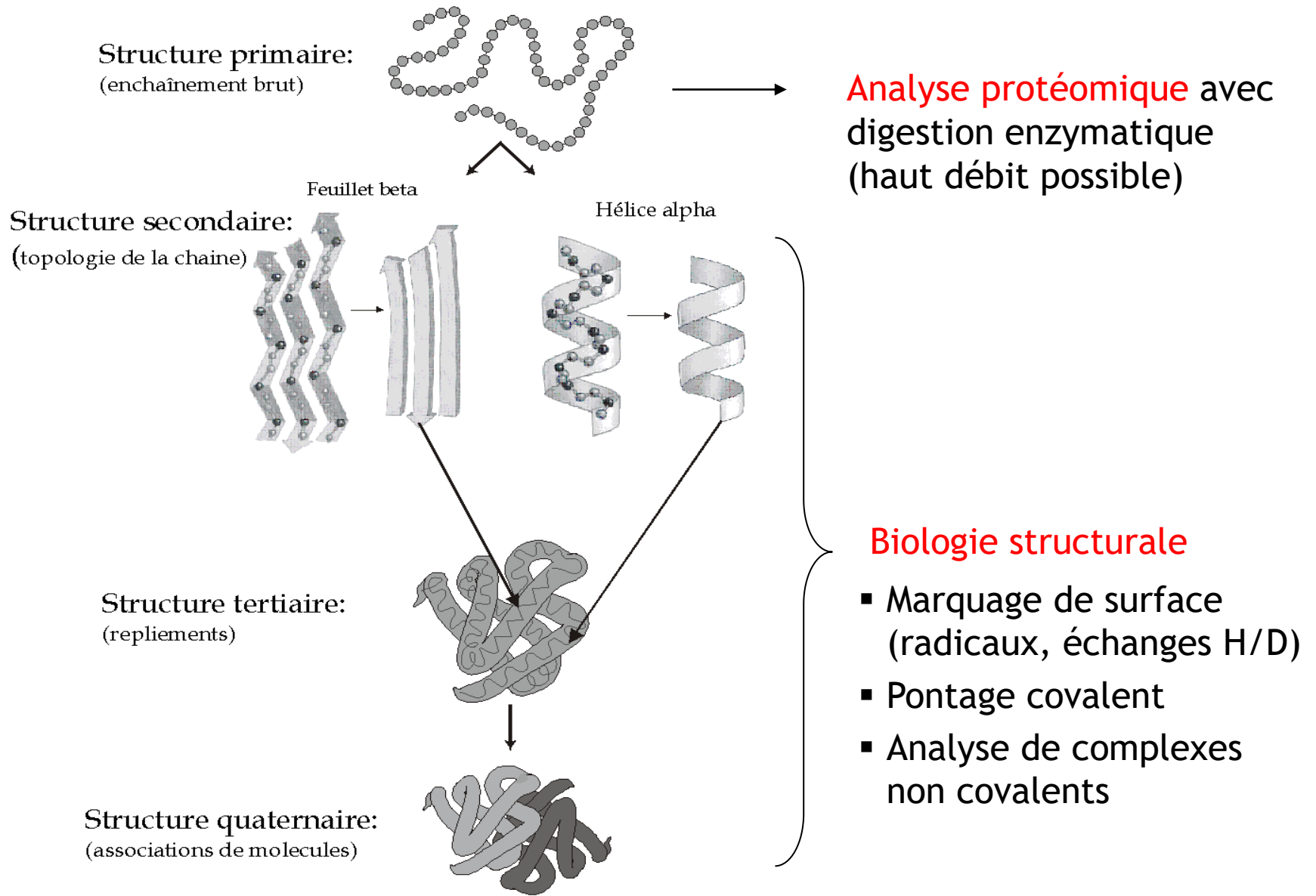
- Sensibilité
 - ✓ 10 fmol déposée sur la cible en MALDI
 - ✓ 100 fmol de produit consommé en nanospray (2 ng protéine de 20 kDa)
- Précision sur la mesure de masse
 - ✓ 3-5 ppm en calibration externe
 - ✓ 1 ppm en calibration interne (m/z 1000.001 vs 1000.002)
- Résolution ($M/\Delta M$)
 - ✓ 80 000 en routine
 - ✓ 1 000 000 en mode haute résolution
- Modes de dissociation variés

Coût d'un spectromètre de masse FT-ICR

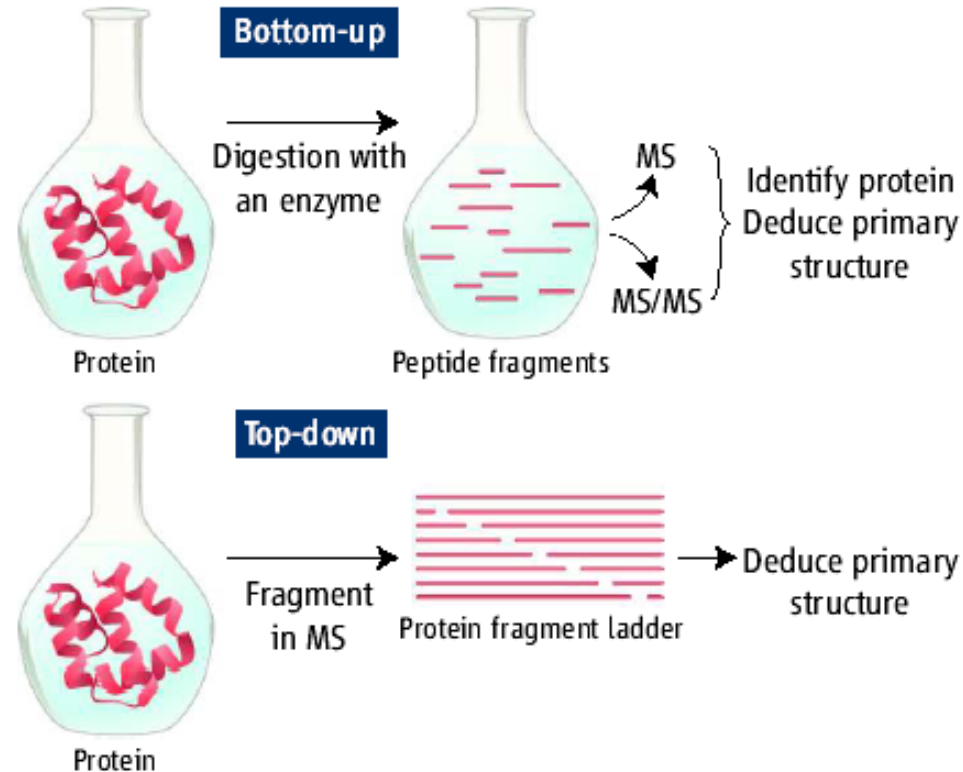


Aston Martin One-77 (1 million £)

Structure des protéines



Comment analyser une protéine en SM?



Intérêts de l'approche top-down

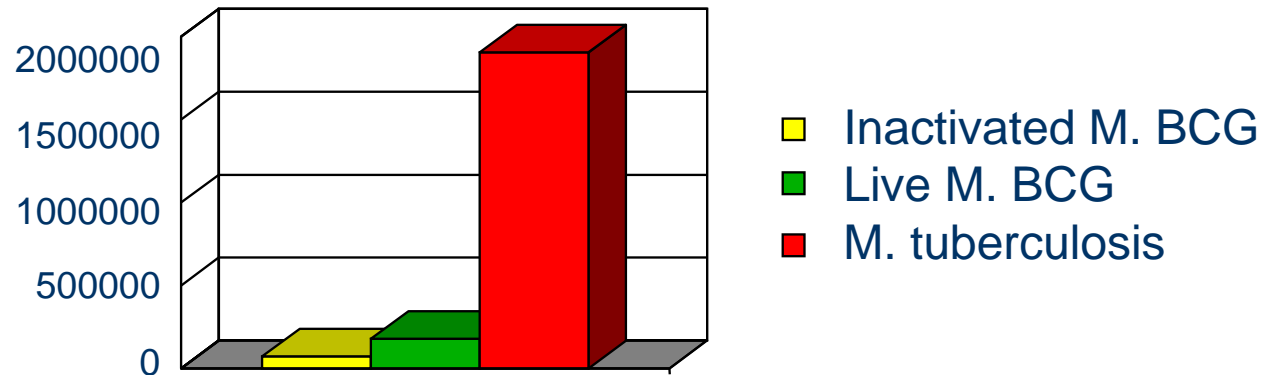
- Caractérisation structurale des protéines plus complète qu'en bottom-up (on a toutes les pièces du puzzle)
 - ✓ Erreurs de séquence
 - ✓ Polymorphismes simple nucléotide (cSNP)
 - ✓ Variants issus d'un épissage alternatif
 - ✓ Modifications post-traductionnelles

- Informations sur l'hétérogénéité moléculaire ("proteotyping ")

- La spectrométrie de masse en biologie
 - ✓ Les bases
 - ✓ Intérêt de la spectrométrie de masse à très haute résolution
 - ✓ Quelles informations structurales pour des protéines?
- Analyse structurale de protéines portant des modifications post-traductionnelles
 - ✓ Antigène de *M. tuberculosis*
 - ✓ Protéine glycosylée de *N. meningitidis*

M. tuberculosis

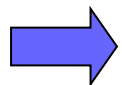
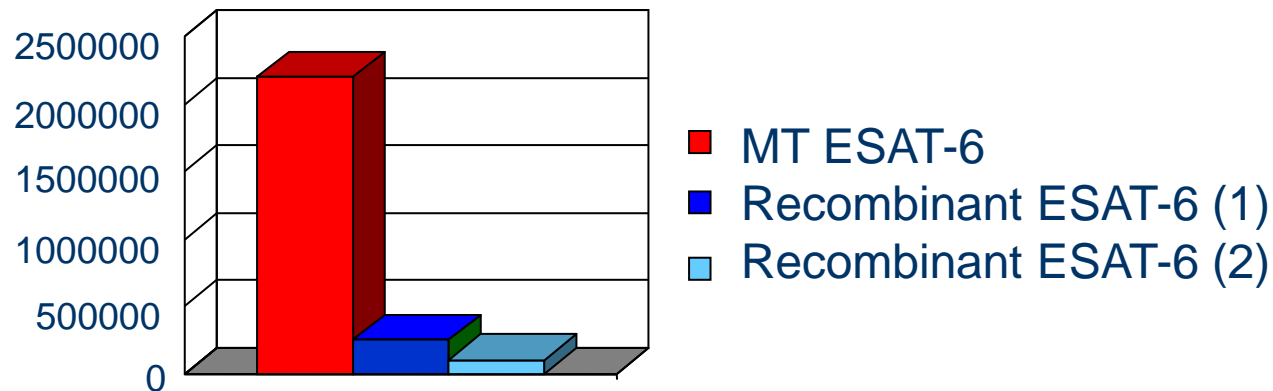
- Recherche de nouveaux antigènes mycobactériens (G. Marchal, F. Romain - Institut Pasteur)
- Activité biologique (HSR) du surnageant brut de *M. tuberculosis*



- Sélection des molécules antigéniques chez des cobayes infectés par MT et peu antigéniques chez des cobayes immunisés par le BCG

M. tuberculosis

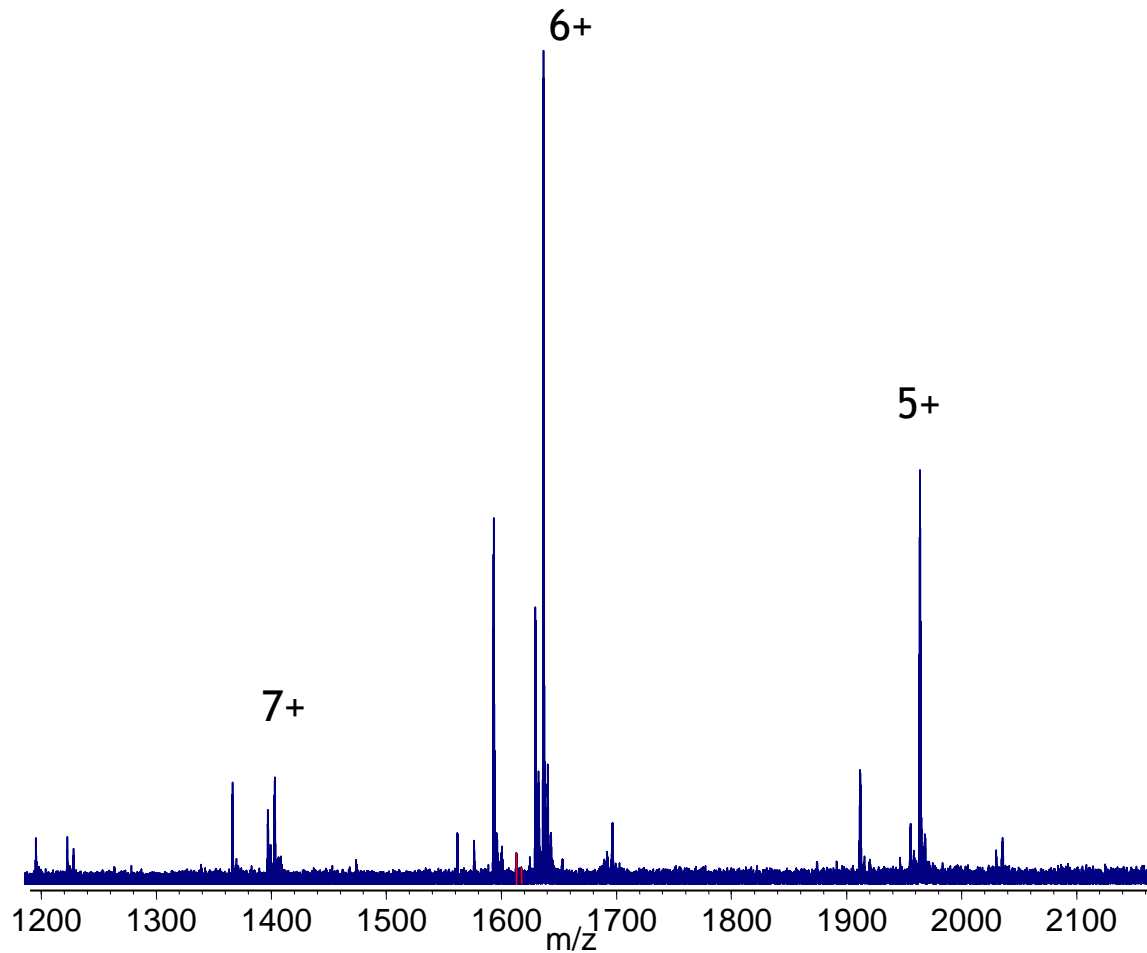
- Plusieurs étapes de fractionnement pour arriver à : **ESAT.6** (6 kDa early secretory antigenic target).
- Problème majeur : ESAT.6 recombinante n'a plus d'activité antigénique



Qu'est ce qui est responsable de l'activité d'ESAT-6 native?

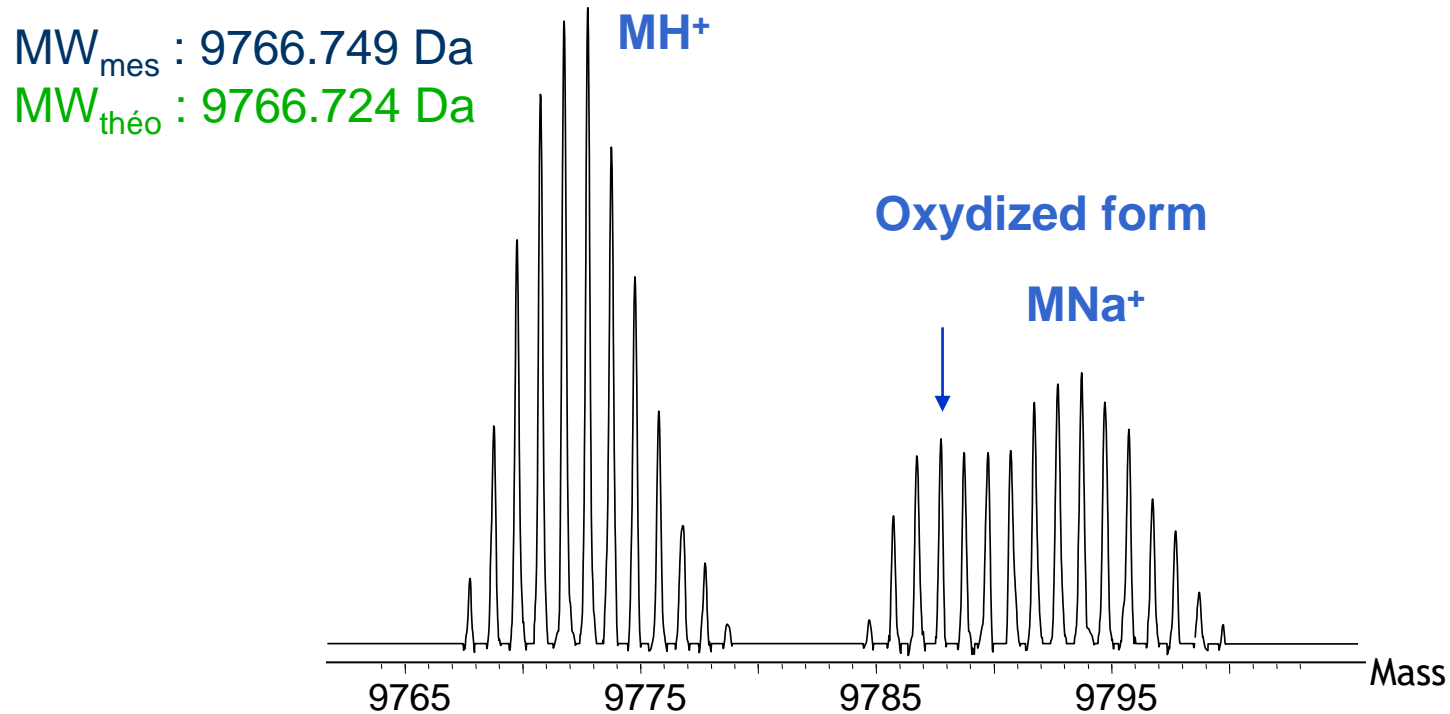
Analyse d'ESAT.6 entière

- ESAT.6 : Analyse de la fraction purifiée en nanospray-FT-ICR



Après déconvolution

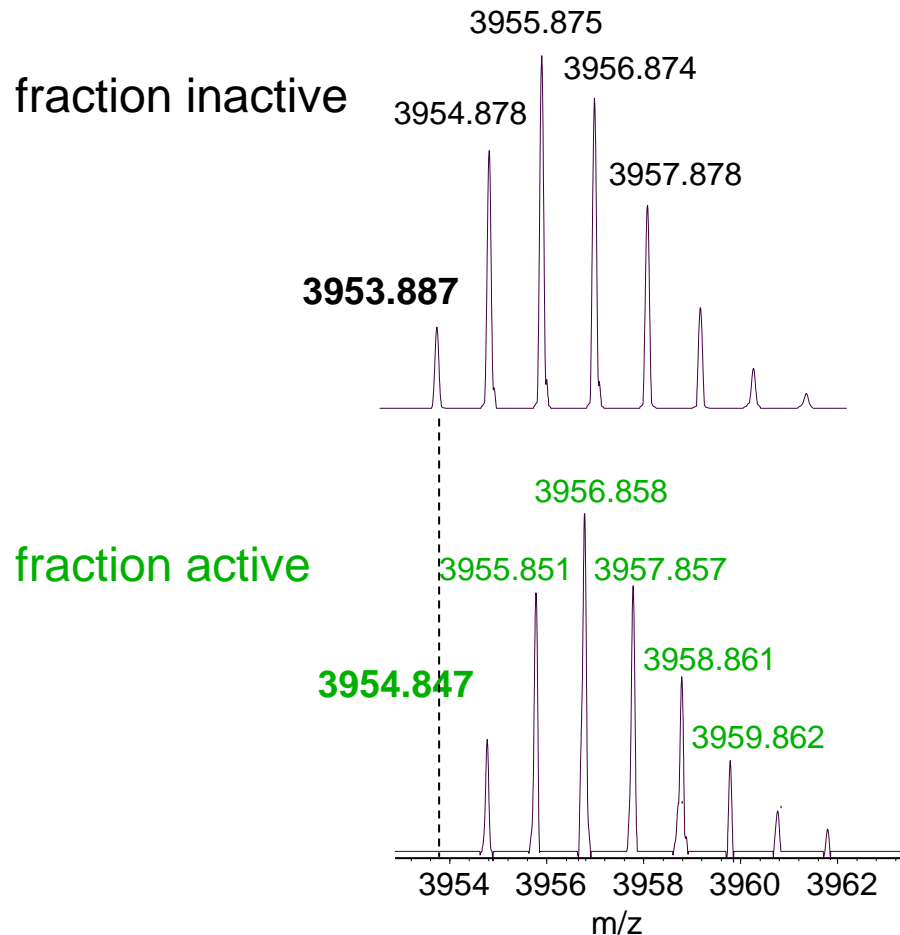
- ESAT-6 : Analyse en nanospray FT-ICR après déconvolution



- Massif isotopique déformé, légèrement décalé vers la droite

Digestion LysC

- Digestion Lys C d'ESAT.6 et séparation des fractions



TEQQW NFAGI EAAAS AIQGN
VTSIH SLLDE GKQSL TKLAA
AWGGS GSEAY QGVQQ KWDAT
ATELN NALQN LARTI SEAGQ
AMAST EGNV MFA

Delta = 1 Da

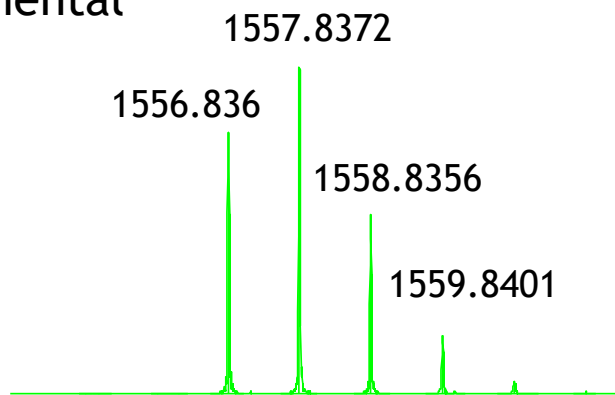


Recherche d'une déamidation dans la partie C-terminale

Combinaison de protéases

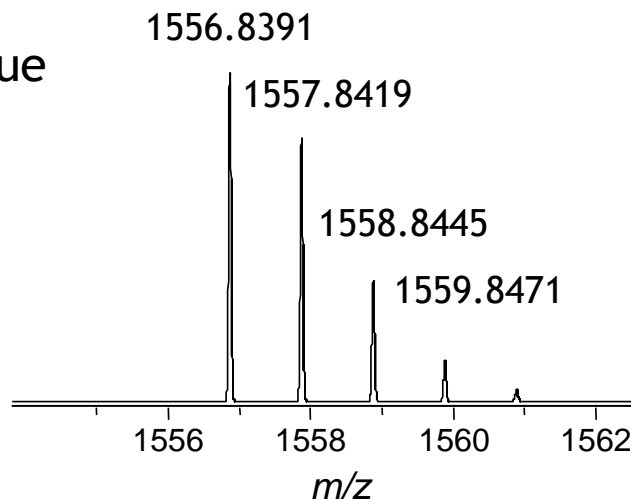
- Combinaison de protéases pour identifier le peptide modifié: LysC/V8

Massif expérimental



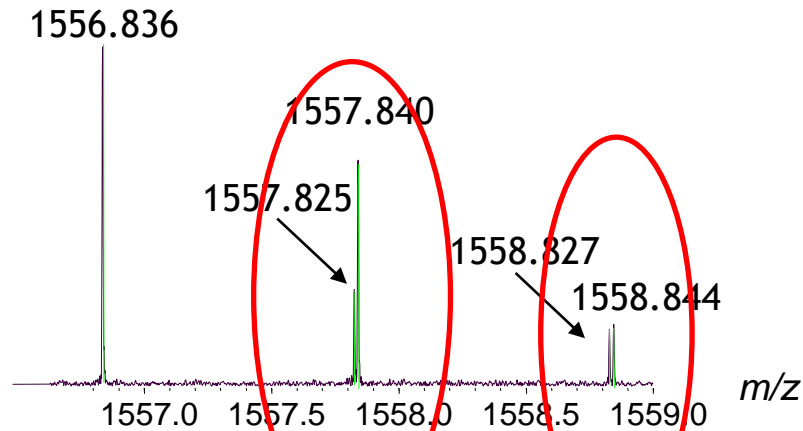
```
TEQQW NFAGI EAAAS AIQGN  
VTSIH SLLDE GKQSL TKLAA  
AWGGS GSEAY QGVQQ KWDAT  
ATELN NALQN LARTI SEAGQ  
AMAST EGNV MFA
```

Massif théorique

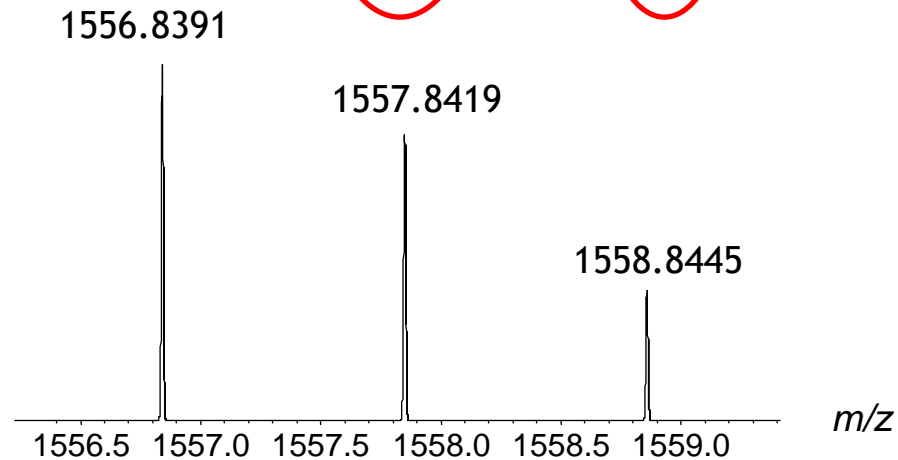


Spectre à haute résolution

Massif expérimental

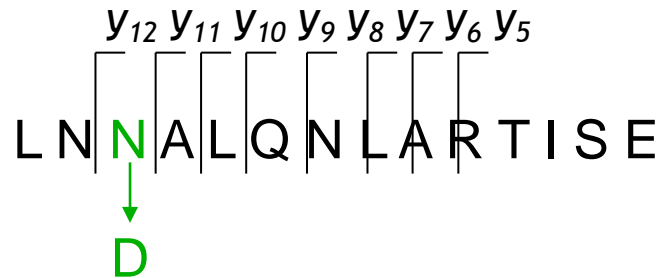


Massif théorique



Localisation de la modification

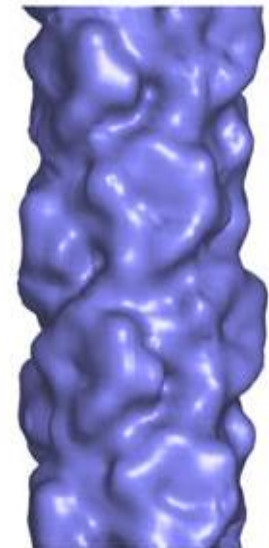
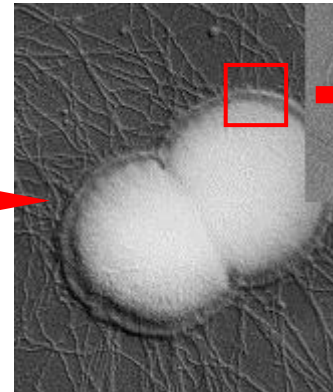
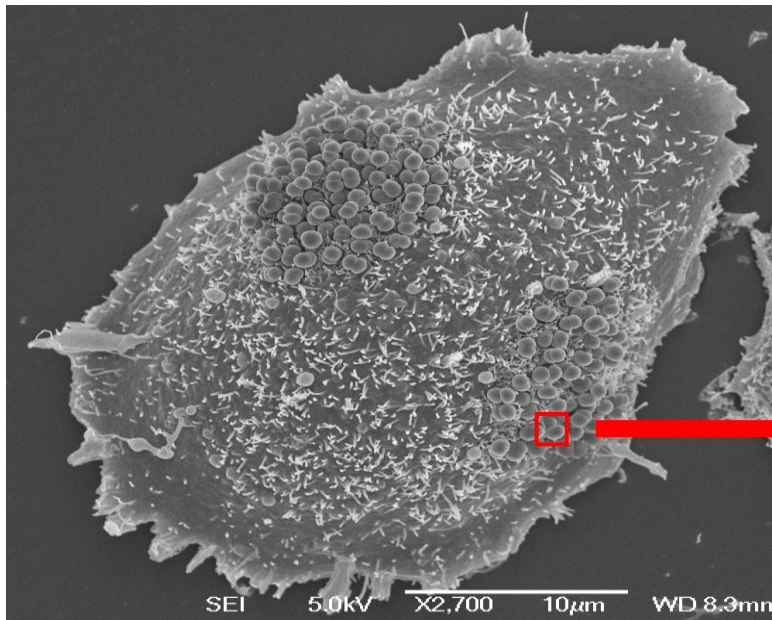
- Spectre MS/MS de m/z 1556.8 avec une sélection de tout le massif isotopique
- A partir de y_{11} : massifs isotopiques doubles



- Déamidation partielle de l'Asn66 en Asp
- Peptides de synthèse portant Asp66 conduisent à une activité antigénique

Neisseria meningitidis

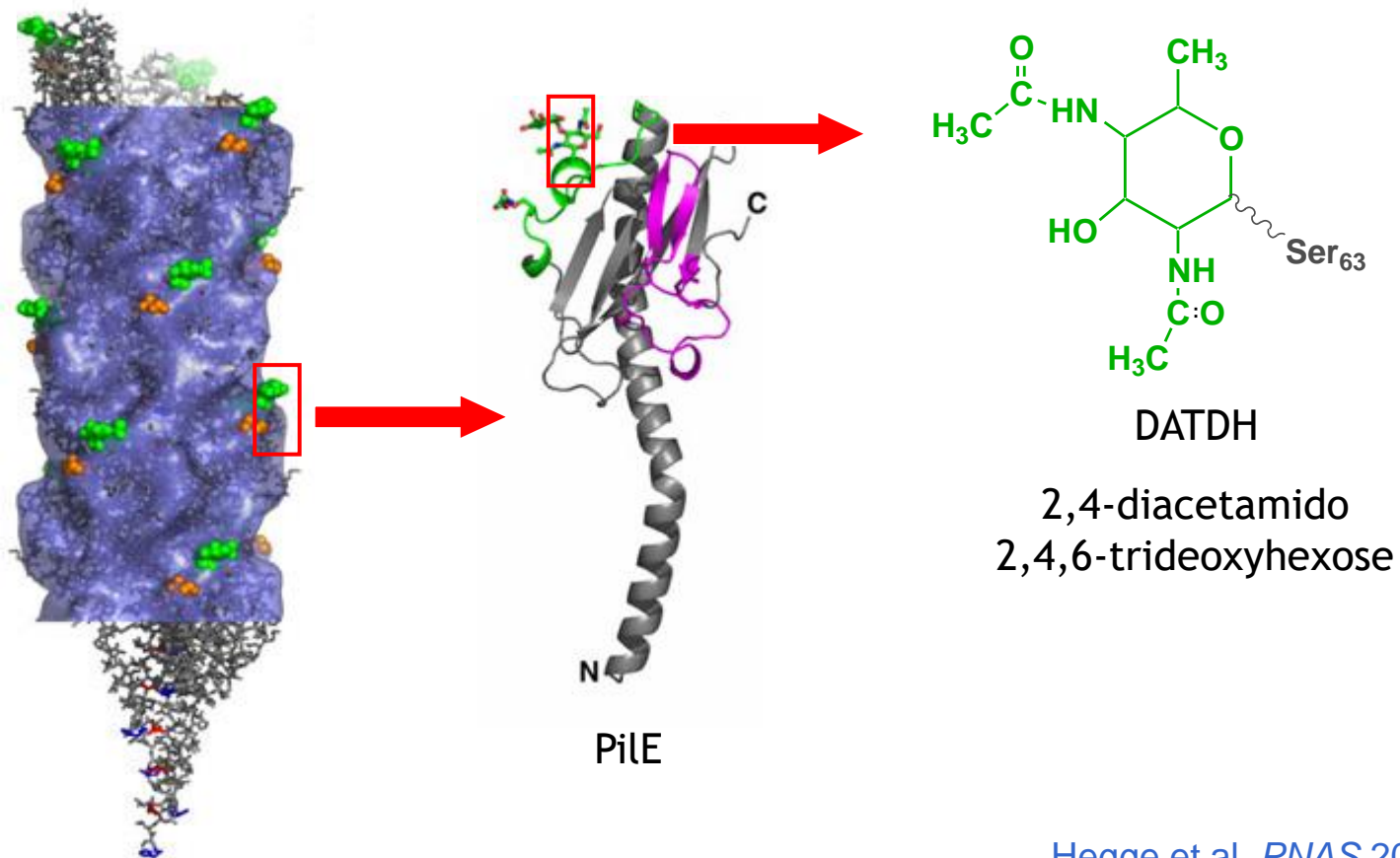
- Collaboration G. Dumenil (Necker), L. Camoin (Cochin)
- Pili de type IV responsables de l'adhésion aux cellules hôtes



Pili type IV

Pili de type IV

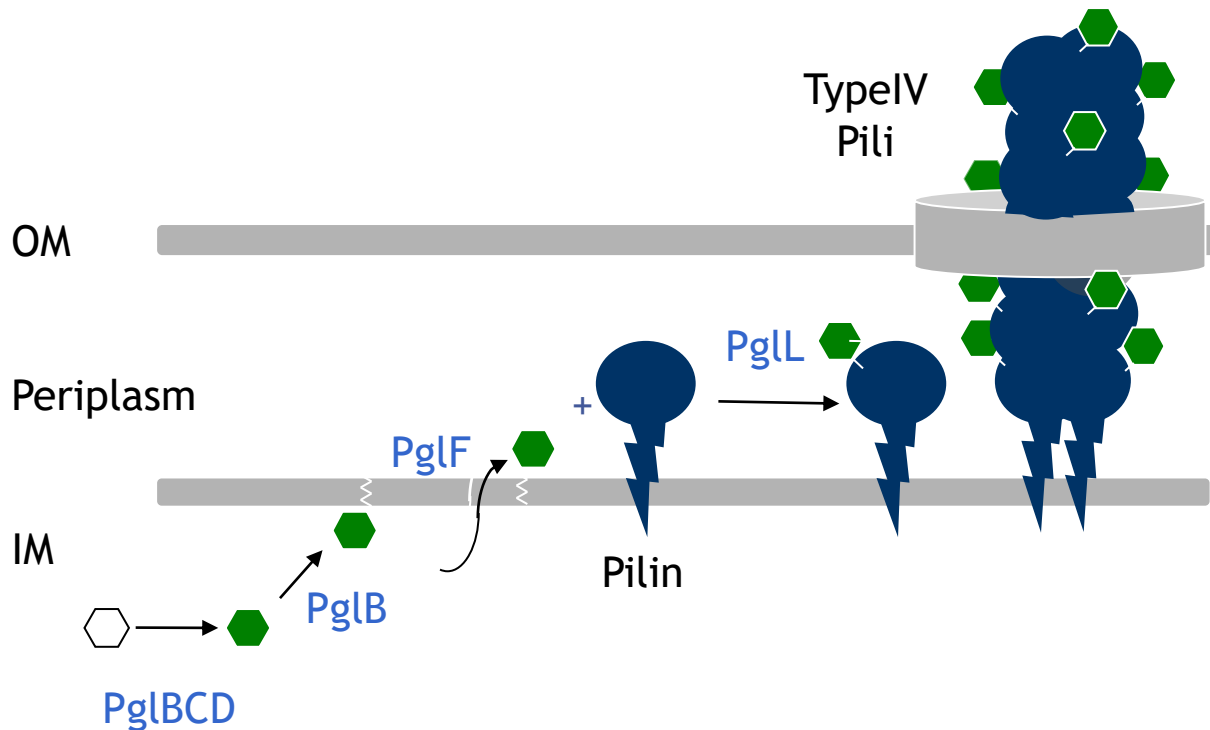
- Constituant majoritaire : protéine PilE (18 kDa) glycosylée sur Ser63 par DATDH



Hegge et al. *PNAS* 2004
Aas et al. *JBC* 2006

Biosynthèse de la glycosylation

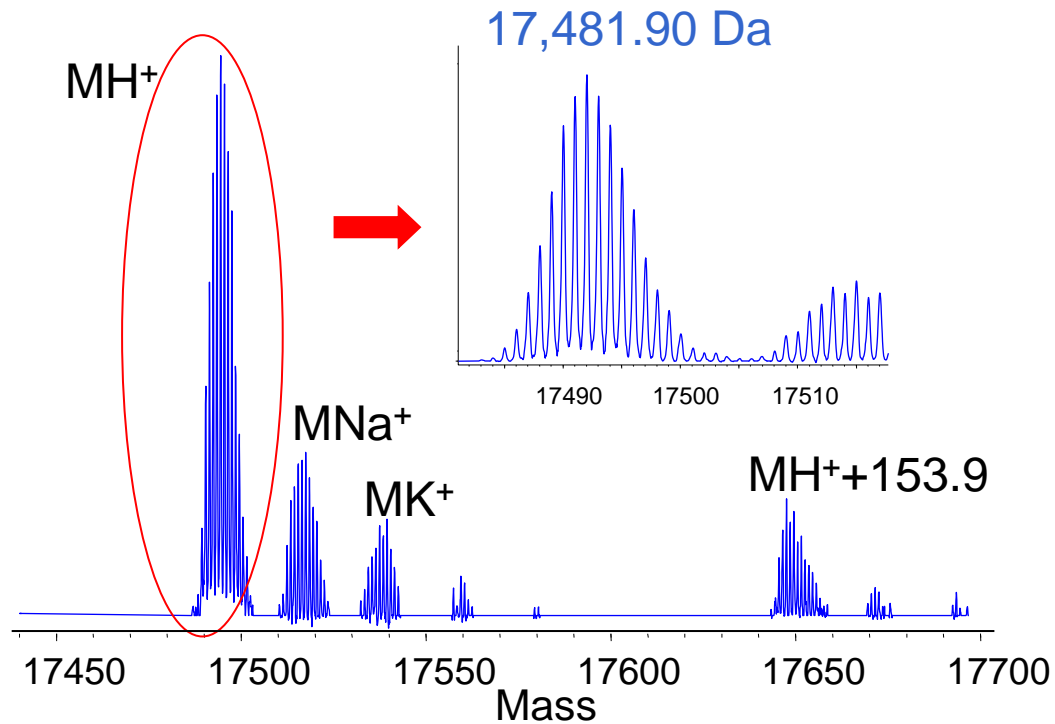
- Gènes *pgl* responsables de la glycosylation des pilines



- La moitié des isolats cliniques de *N. meningitidis* présente une insertion dans le gène *pglB* : nouvelle glycosylation?

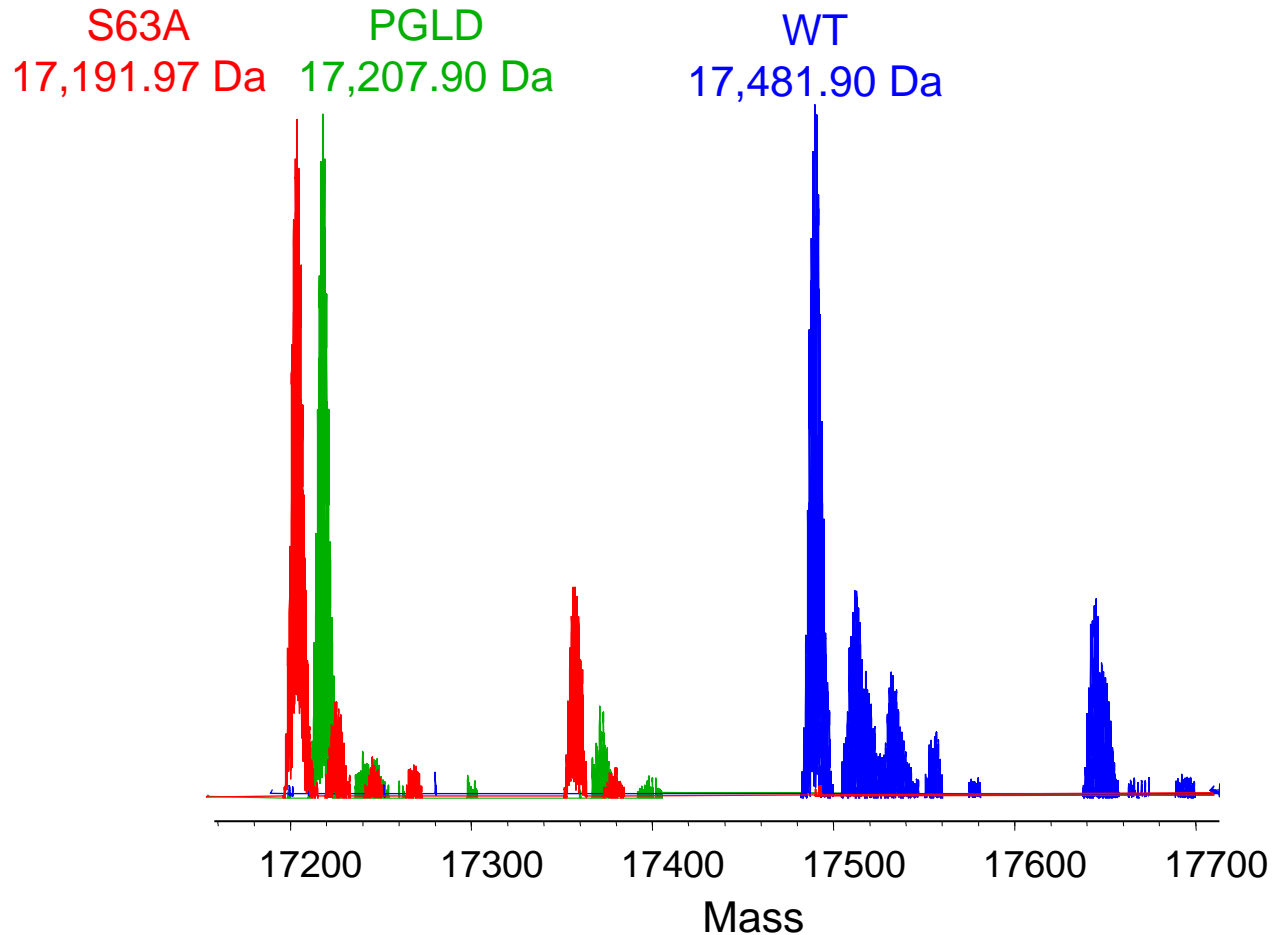
Mesure de masse entière

- Mesure de masse entière pour PilE native



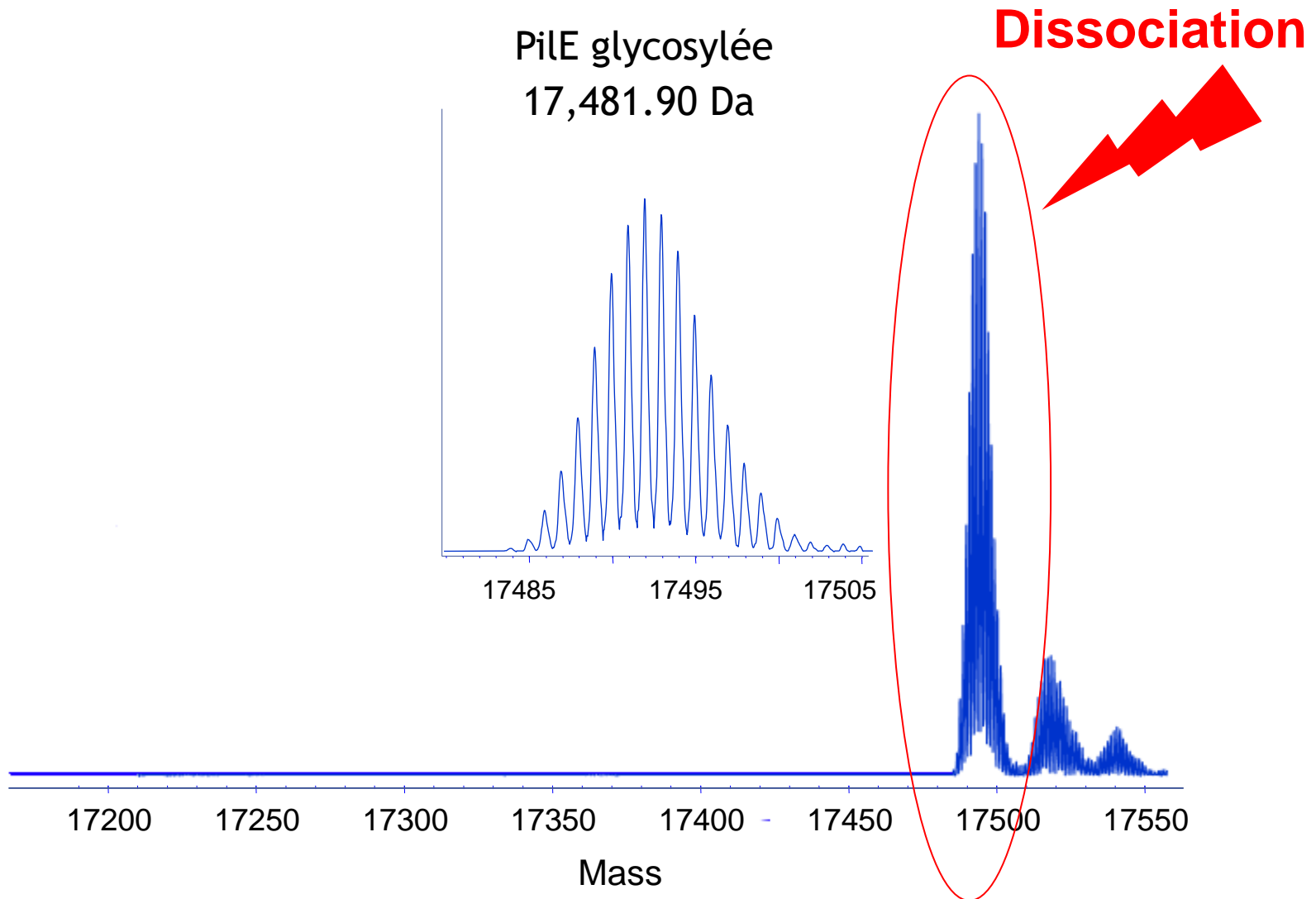
- Une forme majoritaire : 17,481.90 Da

Profiling de différents mutants

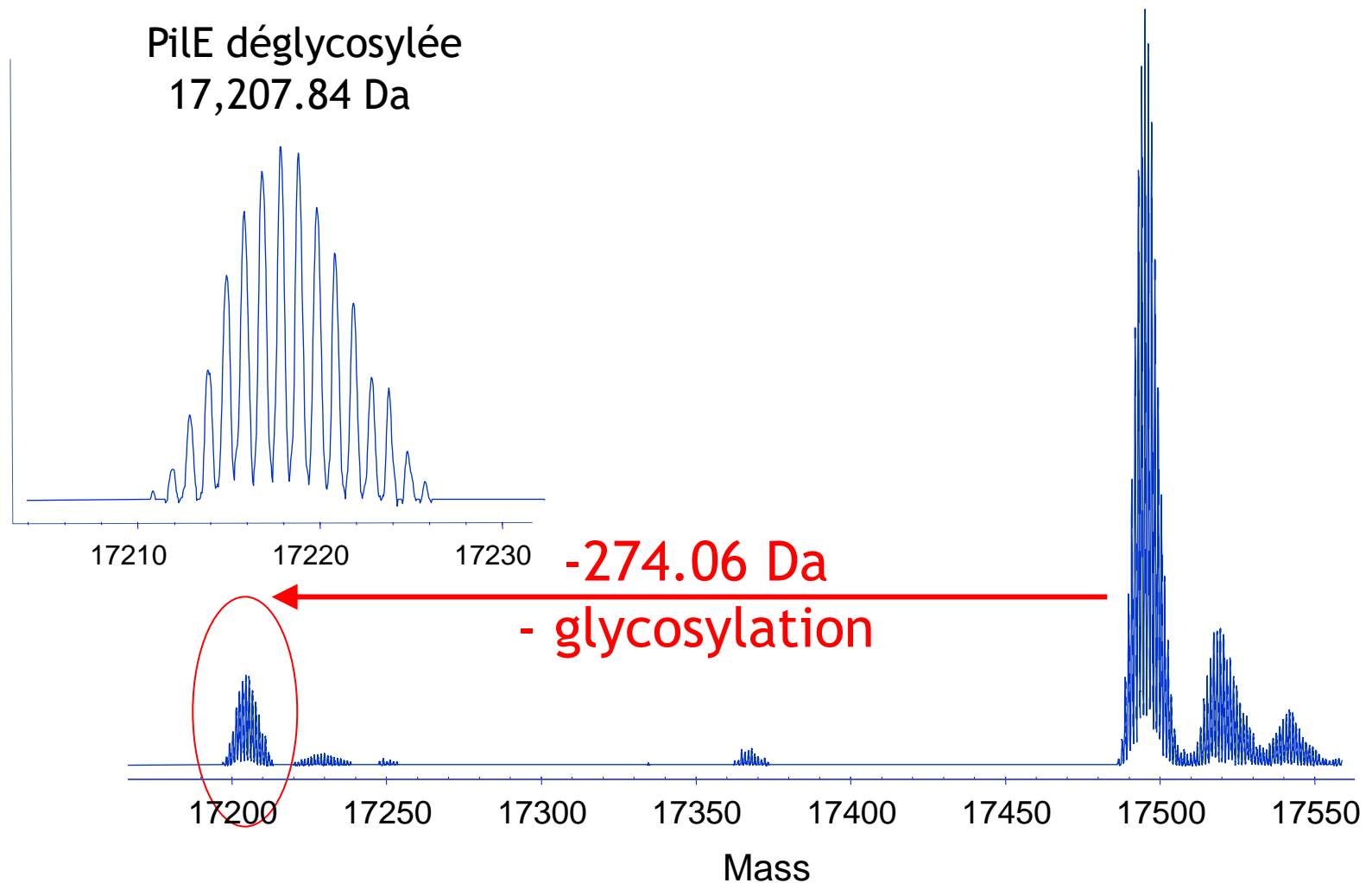


- La sérine 63 est glycosylée par un sucre de 274 Da
 $17,481.90 - 17,191.97 - 15.99$ (Ser/Ala)

Fragmentation de la protéine entière en FT-ICR

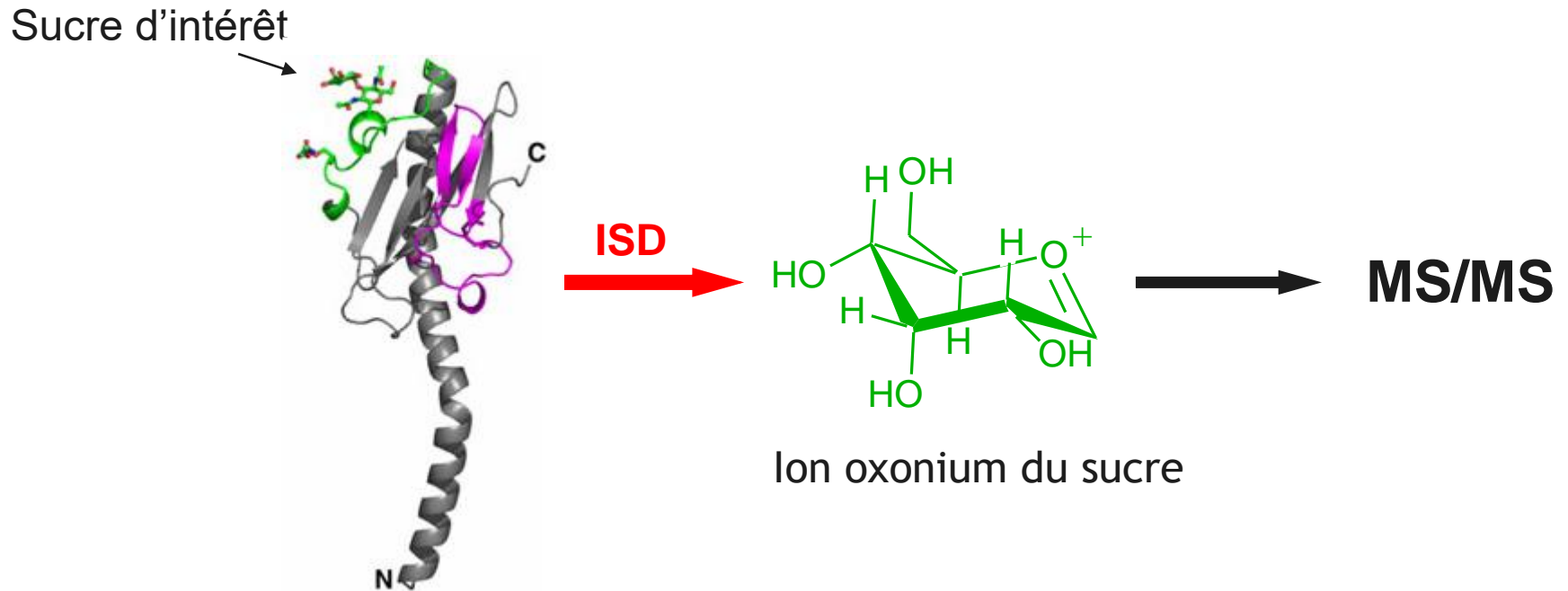


Fragmentation de la protéine entière en FT-ICR



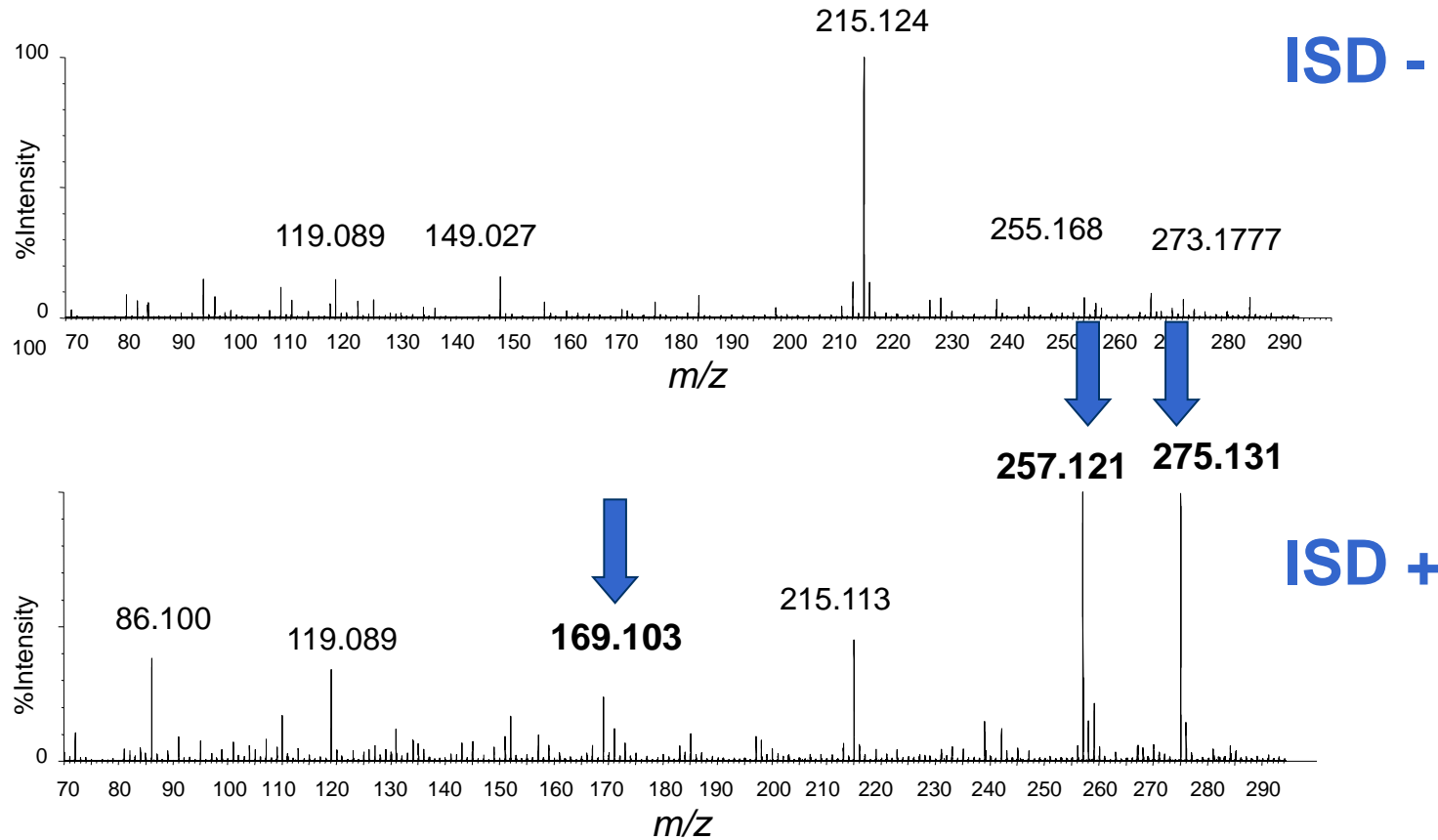
Complémentarité FT-ICR/Q-TOF Premier™

- Approche complémentaire sur le Q-TOF Premier™ : fragmentation des ions oxonium formés par Dissociation dans la source (ISD)

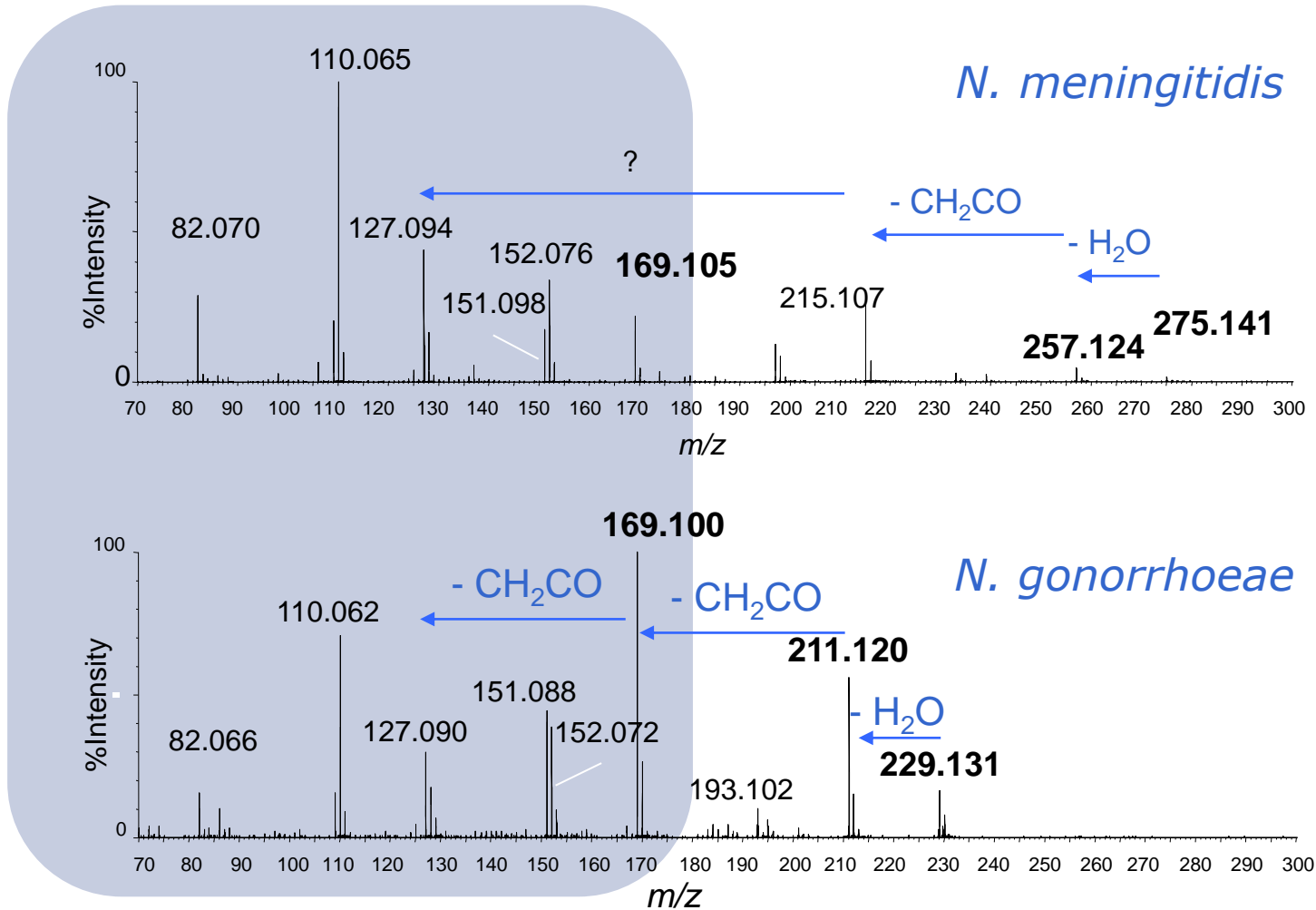


PilE *N. meningitidis*
PilE *N. gonorrhoeae*

Recherche des ions oxonium

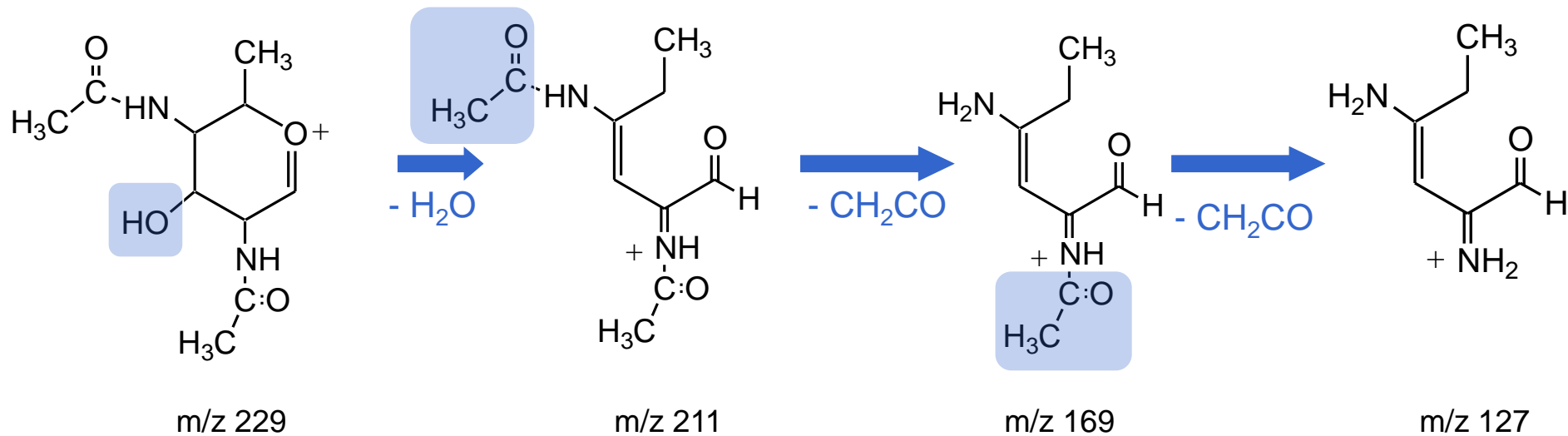
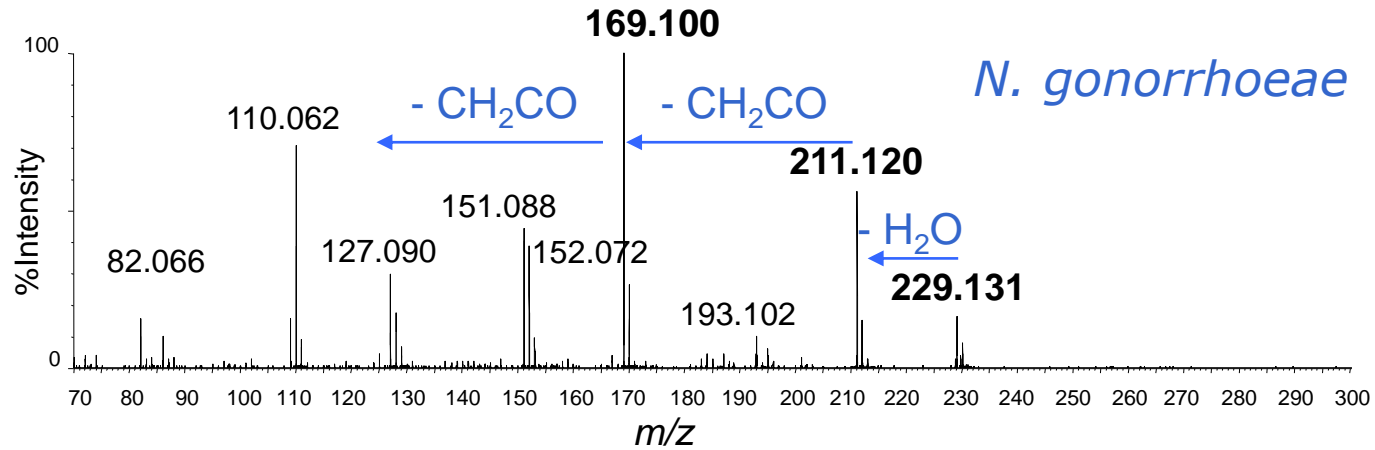


Fragmentation des ions oxonium

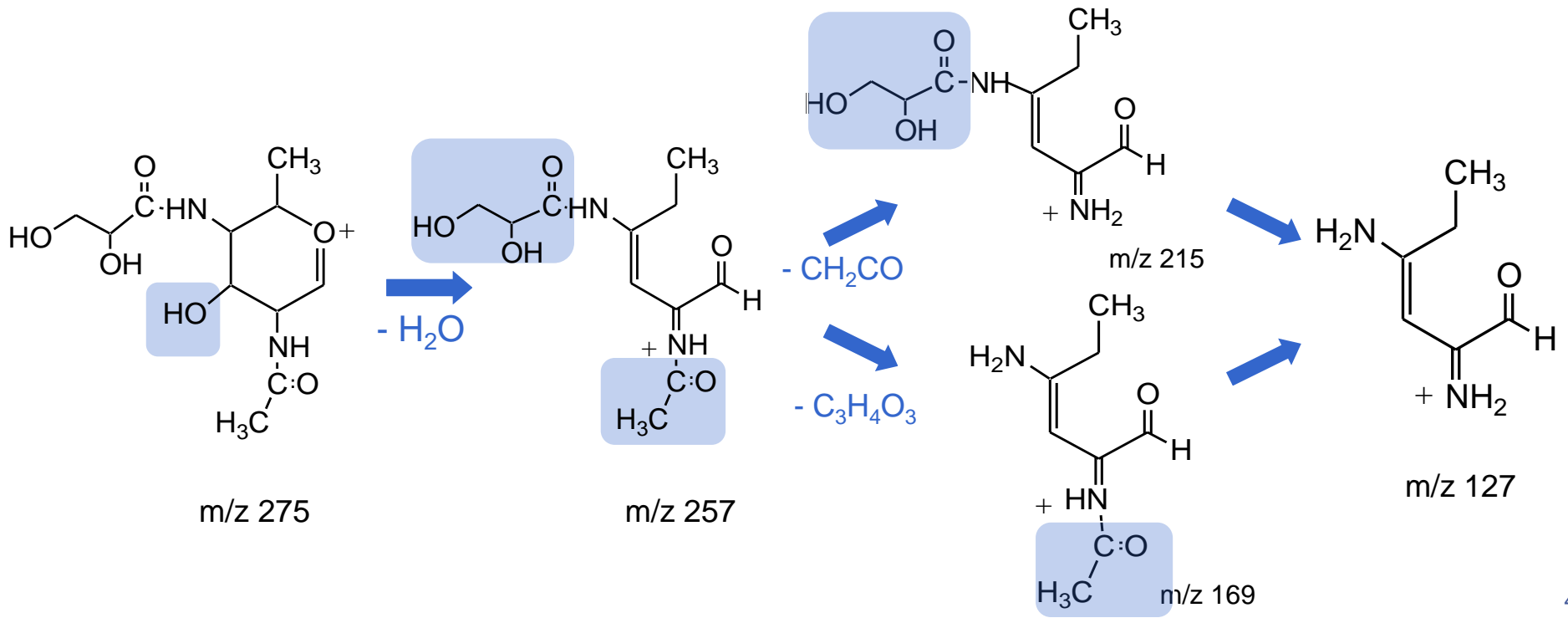
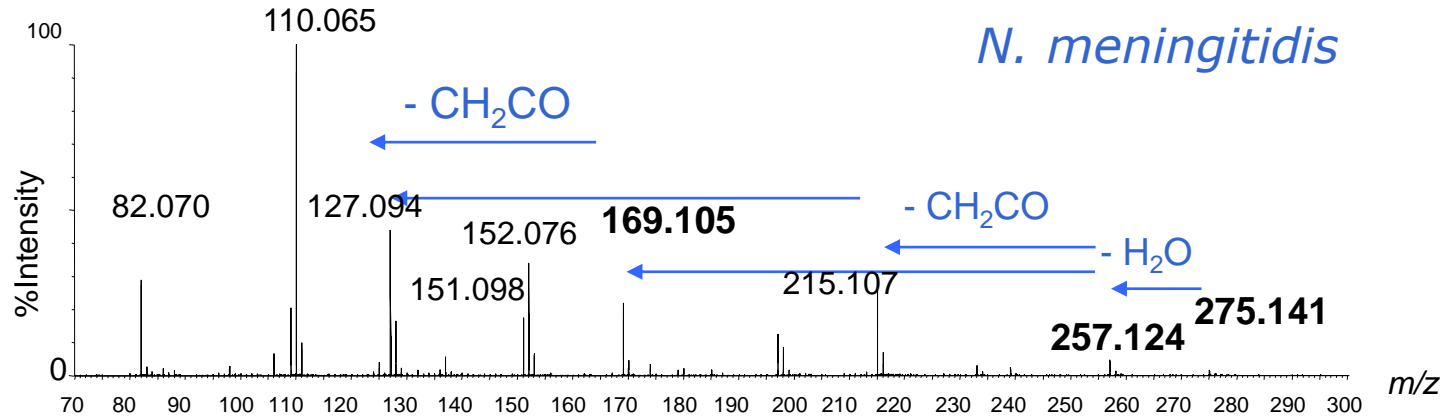


Δ masse entre les sucres = 46.01Da

Spectre MS/MS du DATDH

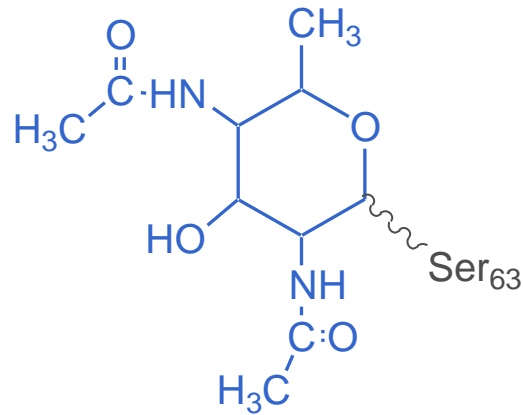


Spectre MS/MS du ??



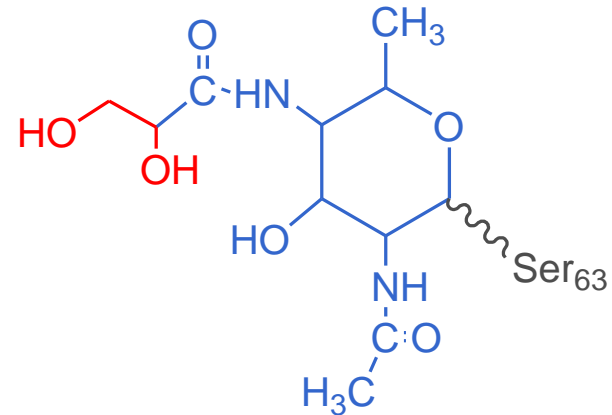
Deux glycosylations proches

- DATDH et GATDH ont des structures très proches



DATDH

2,4-diacetamido
2,4,6-trideoxyhexose



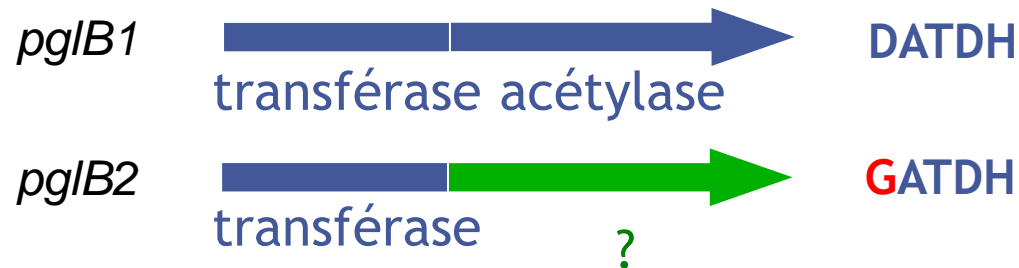
GATDH

glyceramido acetamido
2,4,6-trideoxyhexose

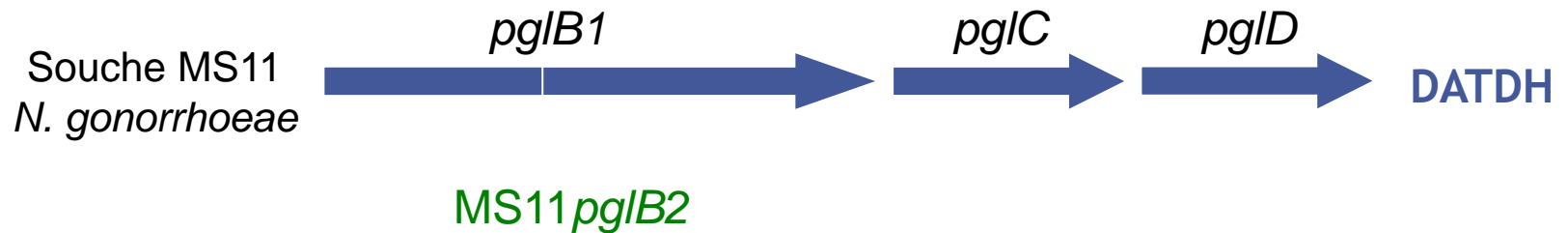
- Qu'est-ce qui détermine l'une ou l'autre de ces glycosylations chez *N. meningitidis*?

Les gènes *pgl*

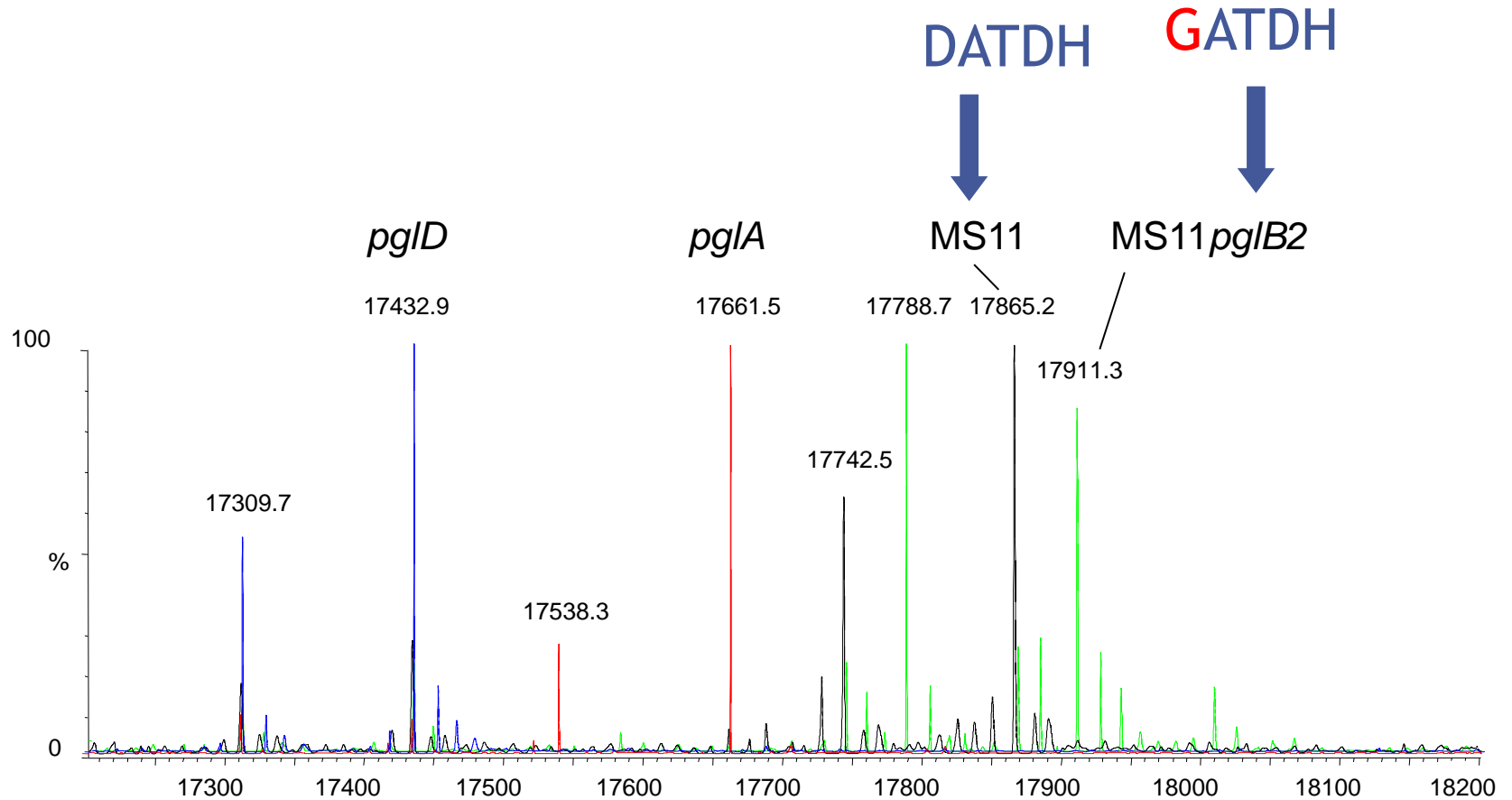
- Rôle du gène *pglB* ?



- Construction d'un souche de *N. gonorrhoeae* portant l'allèle *pglB2* de *N. meningitidis* (MS11*pglB2*)



Profiling des pilines de *N. gonorrhoeae*



- *pglB2* responsable de la glycosylation par un **GATDH**

- Mise au point d'une stratégie analytique « top-down » rapide et fiable pour caractériser les glycosylations
- **Intérêts majeurs de l'approche** : efficacité de fragmentation, sensibilité, précision sur la mesure de masse
- *N. meningitidis* : détermination d'un nouveau saccharide sur les pili de type IV et attribution d'une fonction "glyceramido transferase" pour l'allèle *pglB2*

Conclusion/Perspectives

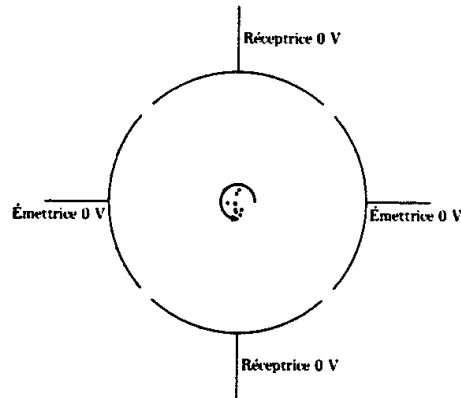
- **Approches protéomiques « classiques »**
 - ✓ Très grande sensibilité
 - ✓ Mélanges très complexes
 - ✓ Très haut débit
 - ✓ Quantification

- **Biologie structurale**
 - ✓ Information de structure fine (Modifications post-traductionnelles)
 - ✓ Structure tertiaire des protéines ou des complexes protéiques par marquage de la surface
 - ✓ Possibilité de travailler sur des protéines ou des complexes de haut poids moléculaire
 - ✓ Complémentaire de la RMN

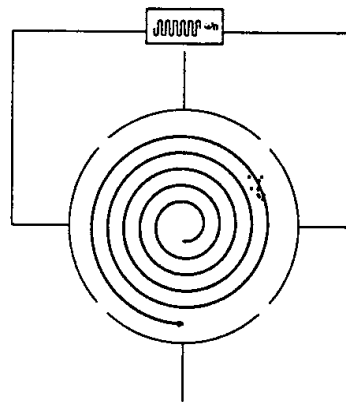
Remerciements

- DCMR – Ecole Polytechnique (CNRS)
G. van der Rest
C. Malosse
G. Ohanessian
- Plate-forme protéomique Paris 5
L. Camoin
- ICSN
J-P. Le Caer
- Faculté de médecine Necker
G. Duménil
G. Mikaty
X. Nassif
- Institut Pasteur
G. Marchal
F. Romain

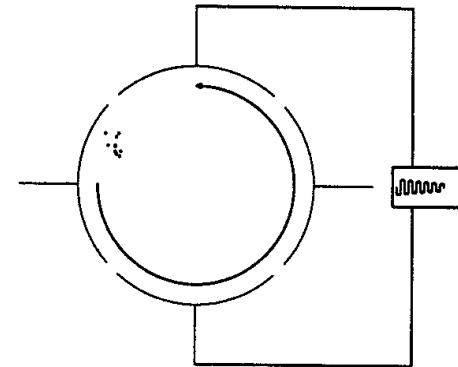
Séquence d'analyse



Ions thermalisés



Excitation des ions



Détection du courant induit

Excitation: Tous les ions présents dans une gamme de masse qu'on souhaite étudier sont excités et mis en phase par un balayage en fréquence (*frequency-chirp*).

Détection: Le signal obtenu est la combinaison des sinusoides décroissant exponentiellement aux fréquences des différents ions excités présents dans la cellule. Pour retrouver les masses des ions, le signal obtenu est traité par transformée de Fourier.