

Projet FARMAN-2013 (BiMoDyM, LBPA – CMLA)

TOPDYN

TRANSITION CONFORMATIONNELLE DES PROTEINES : TOPOLOGIE « DYNAMIQUE »

DUREE DU PROJET:

2 ans

RESPONSABLES ET MEMBRES SCIENTIFIQUES :

Luba TCHERTANOV (BiMoDyM, LBPA) et Frédéric PASCAL (CMLA)

Alain TROUVE (CMLA)

INTRODUCTION ET MOTIVATIONS :

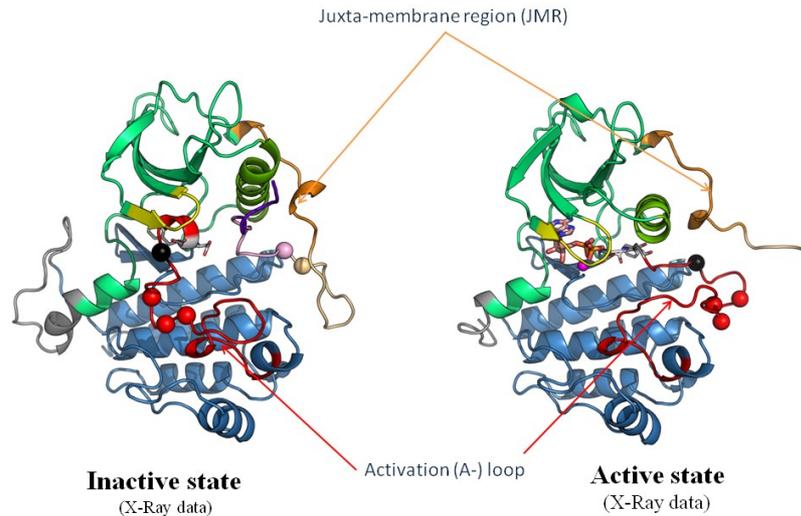
Les méthodes de bioinformatique et modélisation moléculaire – discipline essentielle de biologie computationnelle et structurale – offrent des moyens de caractériser les propriétés dynamiques et énergétiques des protéines et permettent d'accéder à des échelles de temps et d'espace difficiles à sonder expérimentalement. Combinées aux méthodes expérimentales, elles contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent les processus physiologiques dans la cellule. Elles sont utiles pour interpréter des données expérimentales, formuler des hypothèses, stimuler de nouvelles approches, et jouent souvent un rôle important dans la recherche de nouveaux médicaments.

Le développement de ces méthodes est en plein essor depuis quelques années. La puissance des ordinateurs permet désormais d'envisager de modéliser des situations de plus en plus complexes ; ce qui engendre un très grand nombre de données qu'il est nécessaire d'analyser et d'interpréter. Ce travail concerne en premier lieu les biologistes et médecins. Cependant, le besoin d'outils mathématiques nouveaux et originaux se fait sentir. Nous proposons dans ce projet d'explorer des pistes de développement de tels outils en s'appuyant d'une part sur l'expérience en image computationnelle et en géométrie statistique du CMLA et d'autre part en utilisant les données et l'expertise de l'équipe BiMoDyM.

DESCRIPTION DE LA PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE :

1) Contexte biologique, enjeux et stratégie

Les fonctions biologiques reposent sur des interactions macromoléculaires dynamiques, qui permettent la transduction de signaux à travers la cellule. Les protéines kinases (PKs) jouent un rôle crucial dans la signalisation cellulaire, en catalysant le transfert de phosphate de l'ATP à des résidus Ser/Thr ou Tyr spécifiques [9]. En particulier, les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) transmettent l'information de l'extérieur à l'intérieur de la cellule et sont assimilables à des nœuds ("hubs") dans un réseau complexe de signalisation [8]. La plasticité conformationnelle des RTKs est un élément essentiel de la spécificité de leurs interactions avec de multiples partenaires cellulaires et extra-cellulaires. L'activation du domaine kinase est caractérisée par une large transition, qui implique le réarrangement structural d'une boucle dite d'activation (boucle A). Chez les RTKs de type III, dont fait partie KIT, un deuxième segment régulateur, la région juxta-membranaire (JMR), subit un changement conformationnel lors de l'activation (Figure. 1).



16/22

Figure 1. Structure de la région cytoplasmique de KIT dans les états inactif auto-inhibé et actif. Représentation en cartoon des structures cristallographiques de KIT sauvage : (a) forme inactive auto-inhibée et (b) forme active. Les domaines composant la région cytoplasmique et des éléments structuraux clés sont étiquetés et colorés. Le lobe proximal N-terminal (lobe N) est en vert, le lobe distal C-terminal (lobe C) est en bleu et le domaine d'insertion (KID) est en gris. Les segments JM-Proximal (JM-P, en violet), JM-Buried (JM-B, en rose), JM-Switch (JM-S, en orange clair) et JM-Zipper (JM-Z, en orange) du JMR sont spécifiés. La boucle A est en rouge – son motif DFG est dessiné en bâtons blancs, l'hélice C est en lime et la boucle P en jaune. L'hélice F (HF) du lobe C est étiquetée en blanc. La position du site catalytique est indiquée dans la structure active (b), où le ligand ADP co-complexé est dessiné en bâtons et l'ion Mg^{2+} est représenté par une sphère magenta. Les positions des résidus « hot spots » de mutation sont indiqués par des sphères, avec la mutation D816V mise en valeur en noir.

2) Transition conformationnelle des RTKs de la forme inactive vers la forme active, dans les contextes sauvage et muté(s)

Pour tenter de caractériser la transition conformationnelle entre forme inactive et forme active de kinases, plusieurs études se sont basées sur des simulations MD orientées (TMD) [10,14]. Toutefois, ce type de protocole est insuffisant pour rendre correctement compte de la complexité d'une telle transition, du fait du biais qu'ils introduisent et de leur niveau d'approximation. L'équipe BiMoDyM de L. Tchertanov utilise des méthodes plus sophistiquées de détermination de chemin de réaction, qui visent à décrire une transition par un chemin d'énergie minimum ou le chemin le plus probable (Figure 2).

Deux méthodes récentes ont été appliquées à l'étude de la transition de KIT sauvage et muté: d'une part, le « path optimization and exploration (POE) framework », développé par A. Blondel au sein de l'Unité de Bioinformatique Structurale (BIS) de l'Institut Pasteur [13] ; d'autre part, la « string method with swarms-of-trajectories », développée par l'équipe de B. Roux à l'Université de Chicago, qui a été appliquée à l'étude de la transition de la kinase cytoplasmique Src [7,10].

Ces deux méthodes, conceptuellement simples, constituent des avancées importantes pour la description *in silico* de transitions complexes de biomolécules. Elles s'appuient sur des calculs MD très extensifs (totalisant plusieurs centaines de nanosecondes pour une transition). Elles présentent l'avantage de fournir une série ordonnée de conformations intermédiaires plausibles décrivant le passage d'un état A (par ex. inactif) à un état B (par ex. actif).

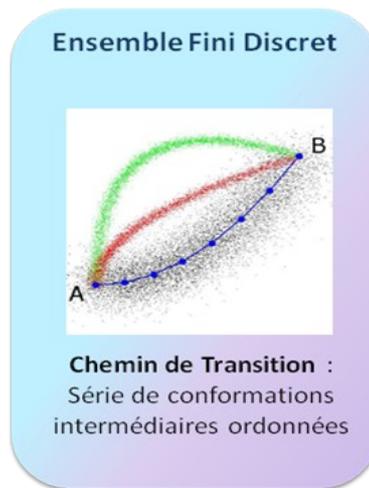


Figure 2. Chemin de transition d'état A à l'état B.

3) Résultats préliminaires :

Un chemin d'énergie minimum décrivant cette transition a été déterminé pour le KIT, un des récepteurs tyrosine kinases. Cette protéine est l'objet d'étude très détaillée par l'équipe de L. Tchertanov [1-5]. Plus particulièrement, nous avons caractérisé l'impact de la mutation D816V, située dans la boucle A (Figure 1), sur la plasticité conformationnelle et la stabilité thermodynamique de la région cytoplasmique de KIT en forme inactive. Le protocole combinant dynamique moléculaire, analyse des modes normaux (NMA) et détection de poches est mis en évidence deux effets principaux de D816V : un effet local de déstabilisation de la boucle A et un effet long-portée de structuration du JMR, distant de plus de 20 Å [7, 9]. Une NMA de plusieurs conformations MD a révélé des mouvements plus indépendants du JMR vis-à-vis du domaine kinase dans le mutant.

La méthode développée par A. Blondel a été modifiée pour ce type des molécules, contenant plusieurs régions déplaçables au cours de transition. L'approche améliore de manière drastique la méthode d'affinement par pic conjugué (« conjugate peak refinement ») et fournit une série limitée de conformations ordonnées énergétiquement plausibles [6]. Le chemin obtenu est assimilable à une représentation univoque des multiples ensembles conformationnels possiblement visités entre les deux états. Chaque conformation intermédiaire correspond à un état conformationnel énergétiquement réaliste dans le paysage énergétique de la protéine et peut servir de modèle de récepteur dans un protocole d'amarrage.

4) Axes principaux de recherche collaborative au sein de Farman :

Cette série limitée de conformations a fourni une première base de données autour de laquelle nous proposons de mettre en place un projet de recherche commun au BiMoDyM et au CMLA.

Nous proposons d'explorer la possibilité de développer des outils de caractérisation de la surface « dynamique » de la protéine en cours de transition, ainsi que de détection des poches et de leurs évolutions. Pour cela plusieurs axes principaux de recherche se dégagent.

a) Géométrie statistique

Le premier travail exploratoire consistera à regarder si les techniques développées par Alain Trouvé et son équipe au CMLA en matière de géométrie des espaces de formes pour l'analyse des phénomènes de variabilité en anatomie numérique et pour les appariements géodésiques peuvent s'appliquer dans le cas présent. On cherchera à savoir s'il convient de l'appliquer aux configurations définies par l'ensemble des atomes, ou bien à des configurations plus grossières comme celles des résidus ou du squelette. L'étude des approches récentes proposées dans [11, 12] pourra constituer un point de départ.

b) Etude des surfaces géométriques

Un autre travail exploratoire va consister à plutôt s'appuyer sur la surface de la protéine et donc sa forme globale. Il est en effet possible d'extraire la surface accessible de la protéine ou surface de Connolly. De nombreux outils d'analyse et de traitement de surface polyédrique existent. Il s'agit par exemple de la simplification [15], de la comparaison par analyse spectrale, par analyse multidimensionnelle ou par la définition d'un squelette [16,17]. Il conviendra alors d'étudier si ces outils peuvent permettre la comparaison de ces conformations et la caractérisation de la dynamique de la surface.

c) Extraction de nouvelles séries de conformations de la protéine Hsp70

Très récemment, l'équipe BiMoDyM a généré le modèle structural de la protéine humaine Hsp70 (chaperon) et son complexe avec la chaîne α de l'hémoglobine (α -globine). Il a été mis en évidence que la fixation de α -globine induit un changement conformationnel important de la structure de chaperon. Dans le cadre de ce projet Farman et afin de compléter la famille de conformations étudiées, nous planifions de faire la genèse du chemin de transition de la protéine Hsp70 déclenché par la fixation de la globine. Les deux ensembles des conformations générés (transition de KIT et transition de Hsp70) pourront servir de base pour le développement des outils proposés en a) et b).

ORIGINALITE et APPORT SCIENTIFIQUE :

Ce travail motivé à la base par des considérations biologiques et médicales combine à la fois des et des connaissances en biologie, en bioinformatique et en mathématiques. Le développement d'outils originaux adaptés aux questionnements des biologistes ne peut se faire que si une réelle collaboration sur les besoins, les attentes et le savoir-faire des uns et des autres se met en place. Farman semble être le lieu approprié pour cela.

REFERENCES :

1. Laine E., Chauvot de Beauchêne I., Perahia D., Auclair C. and Tchertanov L. (2011). Mutation D816V Alters the Internal Structure and Dynamics of c-Kit Cytoplasmic Region: Implications for Dimerization and Activation Mechanisms. *PLoS Comput Biol* 7(6): e1002068. 20 pages, doi:10.1371/journal.pcbi.1002068.
2. Chauvot de Beauchêne I., Laine E., Auclair C., Tchertanov L. (2011). Structural, dynamic and thermodynamic effects of KIT mutations: a computational multi-approach study. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 40:S103, 2011
3. Laine E., Chauvot de Beauchêne I., Auclair C., Tchertanov L. (2011). Propagation of D816V/H mutation effects across KIT receptor. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 40:S109, 2011.
4. Chauvot de Beauchêne I., Laine E., Auclair C., Tchertanov L. (2013). Differential Impact of JMR and A-loop Mutations in KIT Cytoplasmic Region: Linking Activation and Resistance (in preparation)
5. Laine, E., Auclair, C. and Tchertanov, L. (2012). Allosteric Communication across the Native and Mutated KIT Receptor Tyrosine Kinase. *PLoS Comput Biol.* 8(8): e1002661. 14 pages, doi:10.1371/journal.pcbi.1002661.
6. Ulmer TS, Soelaiman S, Li S, Klee CB, Tang WJ, Bax A (2003) *J Biol Chem* 278: 29261-29266.
7. Gan, W. X., Yang, S. C., & Roux, B. (2009). Atomistic View of the Conformational Activation of Src Kinase Using the String Method with Swarms-of-Trajectories. *Biophysical Journal* 97, L8-L10, doi:DOI 10.1016/j.bpj.2009.06.016.
8. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. (2010). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141, 1117-1134, doi:DOI 10.1016/j.cell.2010.06.011
9. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648, doi:DOI 10.1016/j.cell.2006.09.026
10. Zou J., Wang Y. D., Ma F. X., Xiang M. L., Shi B., Wei Y. Q., Yang S. Y. (2008).

- Detailed conformational dynamics of juxtamembrane region and activation loop in c-Kit kinase activation process. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 72, 323-332, doi:DOI 10.1002/prot.21928.
11. Kenobi K. and Dryden I., Bayesian Matching of Unlabeled Point Sets Using Procrustes and Configurations Models, *Bayesian*, 2012.
 12. Czogiel I., Dryden I. and Brignell C., Bayesian matching of unlabeled marked point sets using random fields, with application to molecular alignment, *Annals of Applied Statistics*, 2011.
 13. Laine, E., Goncalves, C., Karst, J. C., Lesnard, A., Rault, S., Tang, W. J., Malliavin, T. E., Ladant, D., & Blondel, A. (2010). Use of allostery to identify inhibitors of calmodulin-induced activation of Bacillus anthracis edema factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11277-11282, doi:DOI 10.1073/pnas.0914611107.
 14. Laine, E., Yoneda, J. D., Blondel, A., Malliavin, T. (2008). The conformational plasticity of calmodulin upon calcium complexation gives a model of its interaction with the oedema factor of Bacillus anthracis. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 71, 1813-1829, doi:DOI 10.1002/prot.21862.
 15. M. Garland, P. Heckbert, Surface simplification using quadric error metrics, 1997.
 16. H. Zhang, O. Van Kaick, R. Dyer, Spectral mesh processing, 2010.
 17. O. Van Kaick, H. Zhang, G. Hamameh, D. Cohen-or, a survey on shape correspondence, 2010.

FINANCEMENT DEMANDE :

Pour chacun des 2 partenaires, l'aide annuelle demandée est

-2500 Euros pour le financement de la gratification d'un étudiant

-1500 Euros pour un ordinateur portable et la documentation

soit un total de 8000 Euros dont 5000 en fonctionnement et 3000 en équipement.