

Proposition de sujet de thèse

Acronyme : DOCIN-KIT

**Titre : Modélisation du domaine cytoplasmique intégral du récepteur KIT :
une ouverture à la simulation de son *interactom***

**Title: Modeling the full cytoplasmic domain of the KIT receptor:
The first step to the simulations of its *interactom***

Résumé : La description des phénomènes d'activation et/ou de résistance des protéines kinases au niveau atomique est devenue un enjeu majeur en vue de la conception de nouvelles molécules capables de surmonter les résistances aux composés actuels. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) jouent un rôle crucial dans la transmission de signaux cellulaires et la dérégulation de leurs fonctions, compromises par les mutations, peut conduire à différentes maladies prolifératives. Nos études du rôle des mutations sur la plasticité conformationnelle et la stabilité thermodynamique de la région cytoplasmique de récepteurs KIT et CSF-1R ont été réalisées sur le domaine kinase non-complet. Le domaine KID, ayant de multiples sites de phosphorylation contrôlant la cascade de signalisation cellulaire, est absent systématiquement dans toutes les structures de RTKs. La génération de modèles 3D du domaine cytoplasmique complet du KIT ouvre l'opportunité pour l'étude des voies de signalisation de ce récepteur au niveau atomique. L'objectif de la thèse est l'obtention de modèles valides de repliements locaux du KID et l'étude de l'effet de la phosphorylation des tyrosines du KID (3 sites de phosphorylation) sur ces repliements locaux. Ces modèles de récepteur ouvrent la voie à l'exploration des voies de signalisation par les voies KID et JMR – la prédiction d'*interactom* de KIT.

Thématique du projet : Il s'inscrit dans le cadre de l'École Doctorale EDMH – Paris Saclay (École Doctorale de Mathématique Hadamard).

Établissement: ENS Cachan Université Paris-Saclay

Laboratoire ou Unité de Recherche : CMLA Centre de Mathématique et de Leurs Applications (UMR CNRS 8536)

Encadrement :

- Luba Tchertanov : Directrice de recherche CNRS – Laboratoire CMLA
- Alain Trounev : Professeurs des Universités ENS Cachan - Laboratoire CMLA
- Zoltan Palmay : Post Doctorant à ENS Cachan – Laboratoire CMLA

Description de projet de thèse

Introduction: Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) jouent un rôle crucial dans la transmission de signaux cellulaires, à travers des événements de phosphorylation. Les RTKs se caractérisent par une région extracellulaire, comportant le site de fixation du ligand, reliée par la région transmembranaire à un domaine cytoplasmique (DC) doué d'une activité enzymatique d'autophosphorylation sur des résidus tyrosine (**Fig. 1**). L'autophosphorylation du récepteur a deux conséquences: (i) elle stimule l'activité catalytique intrinsèque du récepteur; et (ii) elle génère des tyrosines phosphorylées qui représentent alors des sites pour la reconnaissance et le

recrutement de protéines nécessaires à la **transduction du signal** et forment ainsi le complexe récepteur de signalisation (*receptor signalling complex*). Considérant la complexité des cascades de transduction à l'intérieur d'une cellule, avec les nombreuses connexions entre les différentes voies, il est clair que la dérégulation de l'activation d'un RTK peut avoir de graves conséquences sur les réponses biologiques finales. La dérégulation de l'activation des récepteurs, compromise par des mutations, peut conduire à différentes maladies prolifératives. Nous nous sommes investis dans l'étude du rôle des **mutations oncogènes** sur la structure et la dynamique des protéines à activité tyrosine kinase, KIT [1-3] et CSF-1R [4] et des protéines de signalisation (STAT5 [5], VHL[6]) – des cibles importantes dans le contexte de divers cancers. Ces mutations changent non seulement l'activation des protéines mais aussi les voies de signalisation. En particulier, différemment de KIT natif, la protéine mutée (D816V) est impliquée dans l'interaction directe avec STAT5 [7].

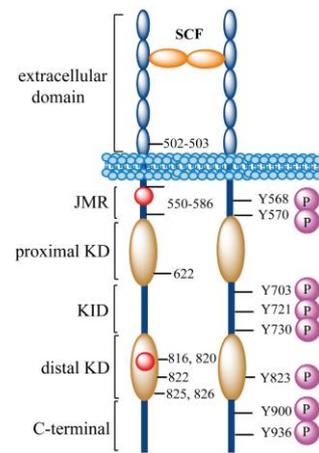


Figure 1. Structure de RTK KIT.

Les études de KIT et CSF-1R ont été réalisées à partir de structures cristallographiques dans lesquelles un insert de 60 résidus dans le domaine kinase, le KID, a systématiquement été retiré et remplacé par un court pseudo-KID. Il n'existe à ce jour aucune donnée structurale sur ce KID. Des études *in vitro* ont montré qu'il ne participe pas à l'activité kinase et que sa suppression ne modifie pas la structure du reste du domaine kinase de KIT. Il est en revanche essentiel à la fonction de signalisation du récepteur, puisqu'il contient trois tyrosines phosphorylées au cours de l'activation, reconnues par trois protéines de signalisation (Pi3K, Grb2 et PLC γ respectivement. **Fig. 2 B**) et initiant trois différentes voies de signalisation. Il est possible que le KID participe directement à dimérisation du KIT, première étape de toutes les voies de signalisation de KIT. La recherche d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine ciblant les voies de signalisation de KIT nécessite donc la connaissance de la structure tridimensionnelle de la partie cytoplasmique complète de KIT. C'est pourquoi l'**obtention de modèles tridimensionnels du KID constitue un enjeu majeur** pour l'inhibition pharmacologique de ce récepteur, et constitue une étape indispensable de notre projet.

Modélisation du domaine cytoplasmique complet de KIT: Nous avons réussi à modéliser en 3D le KID de KIT par deux différentes approches indépendantes: des simulations de repliement de fragments du KID par méthode de recuit simulé, et une modélisation par Rosetta. Les modèles (20 modèles parmi 2000 générés) ont été insérés à la structure du domaine

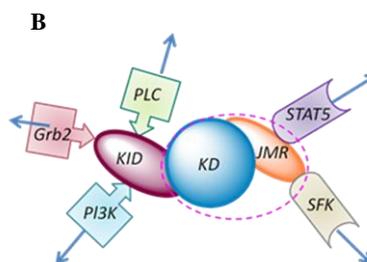
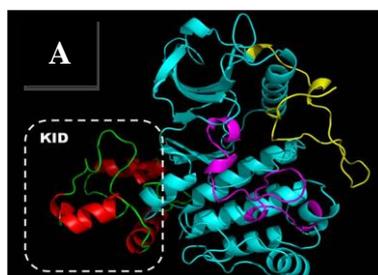


Fig.2. (A) Modèle du domaine cytoplasmique de KIT. Le domaine kinase en cyan, JMR en jaune, la boucle A en magenta, le KID *in situ* en rouge/vert. (B) Schéma d'interaction de KIT: les protéines partenaires interagissant avec KIT par KID et JMR.

cytoplasmique incomplet de KIT, pour produire les premiers pro-modèles de KIT comprenant l'intégralité du domaine cytoplasmique de KIT (**Fig. 2 A**)

Les objectifs de la thèse sont les suivants: (i) l'optimisation des modèles générés et les simulations de leur dynamique moléculaire. Cette étude sera finalisée par l'**obtention des**

premiers modèles validés du domaine cytoplasmique d'un RTK, KIT. Par la suite, les modèles optimisés serviront pour (ii) l'étude de rôle du KID à l'activation du récepteur natif et muté. L'obtention de modèles du KID permettra (iii) d'étudier l'effet de la phosphorylation des tyrosines du KID contenant trois sites de phosphorylation, sur ces repliements locaux. Ces modèles de récepteur ouvrent la voie à (iv) l'exploration des voies de signalisation par les voies KID et JMR – la **prédiction d'interactom de RTKs (Fig. 2 B)**. (v) La caractérisation des chemins de communication dans KIT et ses complexes (avec la méthode MONETA [8-9] ainsi que (vi) le dispositif de visualisation 3D stéréoscopique SHIVA [10]) seront les composants fondamentaux de ce projet. Pour la simulation Marie-Laure utilisera le cluster de calcul du CMLA (TopDyn, cluster hybride CPU-GPU) et les centres de calcul nationaux (IDRIS, CINES, CURIE).

Le projet DOCIN-KIT - un projet ambitieux visant le développement d'un modèle des interactions du KIT avec ses partenaires cellulaire – un pas primordial vers la description compréhensive de la signalisation de ce récepteur au niveau atomistique. Ce projet est lié avec notre recherche sur des récepteurs de tyrosine kinases en contexte de nombreux cancers. Nous menons cette recherche en collaboration avec les cliniciens de l'Institut Gustave Roussy et le Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille. Les résultats étendus de la thèse contribueront à la recherche de nouvelles pistes pour développer des produits médicamenteux d'une nouvelle génération.

Références

1. Laine E., Chauvot de Beauchêne I., Perahia D., Auclair C., 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. doi:10.1371/journal.pcbi.1002068
2. Chauvot de Beauchêne I., Alain A., Panel N., Laine E., Trouvé A., Dubreuil P. and Tchertanov L. (2014). Oncogenic mutations of KIT receptor differentially modulate tyrosine kinase activity and drug susceptibility. *PLoS Comput. Biol.*10(7):e1003749. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003749.
3. Vita M, Tisserand J C, Chauvot de Beauchêne I, Panel N, Tchertanov L, Mescam-Mancini L, Agopian J, Fouet B, Fournier B, Dubreuil P, Bertucci F, and De Sepulveda P. (2014). Characterization of S628N, a novel KIT mutation found in a metastatic melanoma. *JAMA Dermatol.* 2014 Oct 8. doi: 10.1001/jamadermatol.2014.1437.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, doi:10.1371/journal.pcbi.1002661.
4. Da Silva Figueiredo Celestino Gomes P., Panel N., Laine E., Pascutti P. G., Solary E. and Tchertanov L. (2014). Differential effects of CSF-1R D802V and KIT D816V homologous mutations on receptor tertiary structure and allosteric communication. *PLoS ONE.* May 14; 9(5):e97519. doi: 10.1371/journal.pone. 0097519.
5. Langenfeld F., Guarracino Y., Arock M., Trouvé and Tchertanov L. (2015). How intrinsic molecular dynamics controls intramolecular communication in Signal Transducers and Activators of Transcription Factor STAT5. *PLoS ONE.* Submitted at 31-03-2015
6. Gardie B., Couvé, S., Ladroue, C., Laine, E., Mathouk, K., Guégan, J., Gad, S., Lejeune, H. Lecomte, B. , Pagès, J.-C., Collin, C., Lasne F., Bressac de Paillerets, B., Feunteun, J. Dessen, P., Lazar, V., Tchertanov, L., Mole, D., Kaelin, W., Ratcliffe, P., Richard, S. (2014). A comprehensive study of germline mutations in the VHL gene reveals the importance of precisely tuned dysregulation of the hypoxia pathway in oncogenesis. *Cancer Res.* 2014 Nov 15; 74(22):6554-64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1161
7. Chaix A, Arcangeli ML, Lopez S, Voisset E, Yang Y, Vita M, Letard S, Audebert S, Finetti P, Birnbaum D, Bertucci F, Aurrand-Lions M, Dubreuil P, De SP (2013) KIT-D816V oncogenic activity is controlled by the juxtamembrane docking site Y568-Y570. *Oncogene.* onc201312 [pii];10.1038/onc.2013.12 [doi].
8. 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, doi:10.1371/journal.pcbi.1002661.
9. Allain A., Chauvot de Beauchêne I., Langenfeld F., Guarracino Y., Laine E., and Tchertanov L. (2014). Allosteric Pathway Identification through Network Analysis from Molecular Dynamics Simulations to Interactive 2D and 3D Graphs. *Faraday Disc.*, DOI: 10.1039/C4FD00024B. 169, 303-321.
10. De Vuyst F., Guillas S., KendiraA., Labourdette C., Tchertanov L. (2014). L'ENS Cachan voit grand avec le mur d'image SHIVA. *HPC Today.* 26 sept. 2014. <http://www.hpctoday.fr/regional/lens-cachan-voit-grand-avec-le-mur-dimages-shiva>.