

Étude des propriétés mécaniques des protéines par modélisation moléculaire

Direction : Richard Lavery

Université Paris 7
Denis Diderot



Laboratoire de Biochimie
Théorique - IBPC



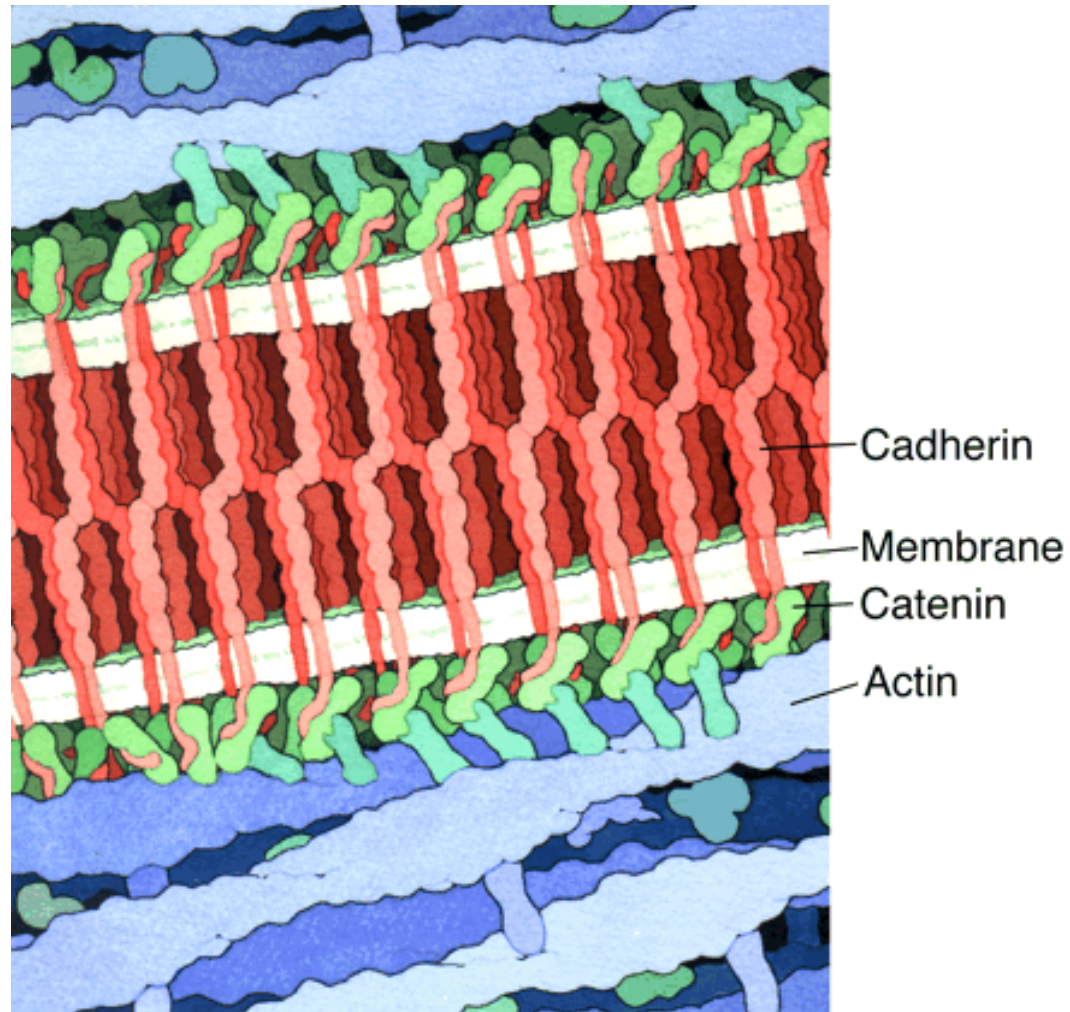
Problématique

- ▶ Insuffisance de l'information structurale
- ▶ Rôle dans l'activité biologique :
 - Moteurs moléculaires
 - Protéines d'adhésion
 - Réactions enzymatiques
 - Thermostabilité
- ▶ Nanomanipulations et simulations

Axes de recherche

- ▶ Mise au point d'une nouvelle mesure de la flexibilité des protéines à l'échelle du résidu
- ▶ Étude dynamique des E-cadhérines
- ▶ Développement d'un nouveau modèle de représentation des protéines pour des études dynamiques

Étude des E-cadhérines

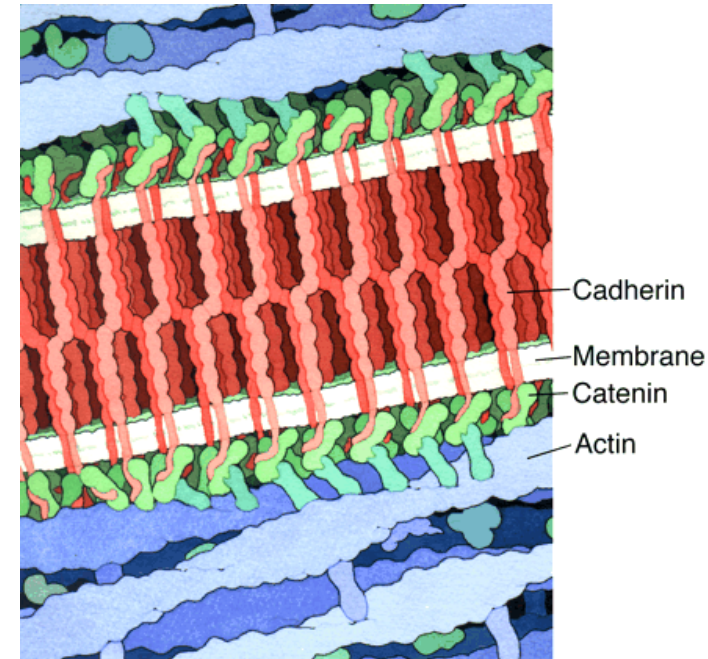


Goodsell, D.S. – The oncologist 2002; 7 : 467-468

Caractéristiques des cadhérines

- ▶ Protéines transmembranaires impliquées dans des mécanismes d'adhésion cellulaire spécifique

- ▶ Importance biologique :
 - Développement embryonnaire
 - Entretien des tissus
 - Développement de cancers



Goodsell, D.S. – The oncologist 2002; 7 : 467-468

- ▶ Activité régulée par la présence d'ions calcium

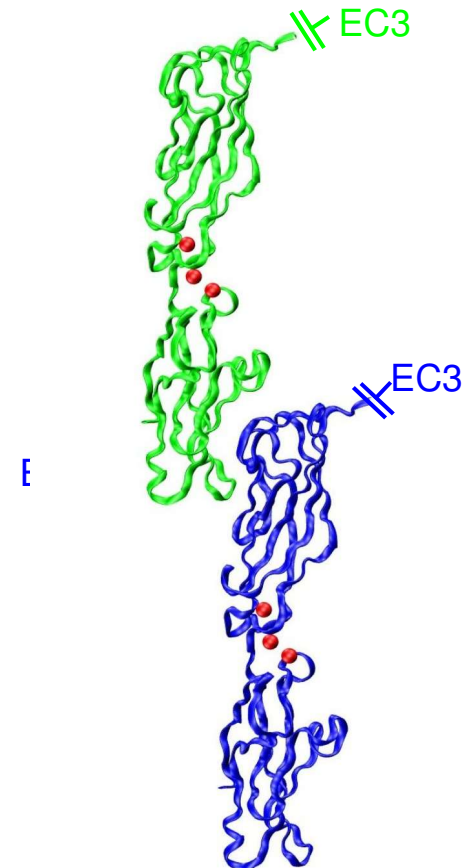
Domaine extracellulaire des E-cadhérines

- ▶ 5 domaines (EC1-5) de type immunoglobuline
- ▶ 3 ions Ca^{2+} à l'interface entre 2 domaines
- ▶ Interactions spécifiques au niveau du module EC1 et régulées par le calcium
- ▶ Mode d'interaction toujours en question
- ▶ 3 interfaces dimériques observées pour le fragment EC1-2 :

■ *Brin échangé BE (1Q1P)*

■ *Brin non-échangé BN (1FF5)*

■ **Contact non symétrique EC1 / EC2 décalé**



Contact

EC1 / EC2

But de l'étude

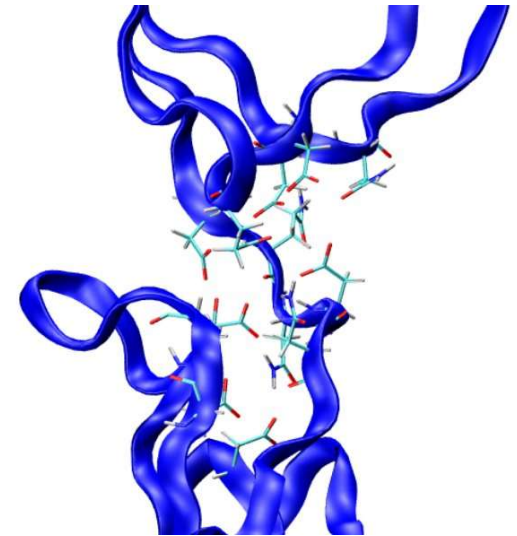
- ▶ Rôle des ions Ca^{2+} sur :
 - La dynamique du monomère de EC1-2
 - La formation du dimère *BN*
- ▶ Comparaison des dimères de EC1-2 :
 - Aspects structuraux
 - Stabilité thermodynamique
 - Spécificité des interfaces

Méthodologie

Étude par DM :

- ▶ Logiciel AMBER
- ▶ Paramètres parm99
- ▶ Eau explicite TIP3P
- ▶ $[KCl] = 0.15 \text{ mol.L}^{-1}$
- ▶ 80000 à 230000 atomes
- ▶ Production : 10 à 15 ns

- 3 Ca^{2+} : C3
- 2 Ca^{2+} : C2
- 0 Ca^{2+} : C0

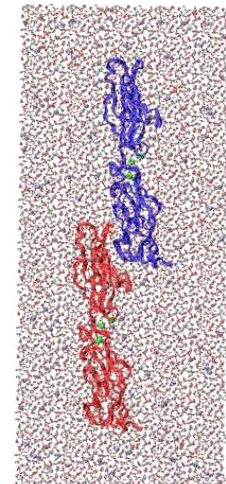


BN :

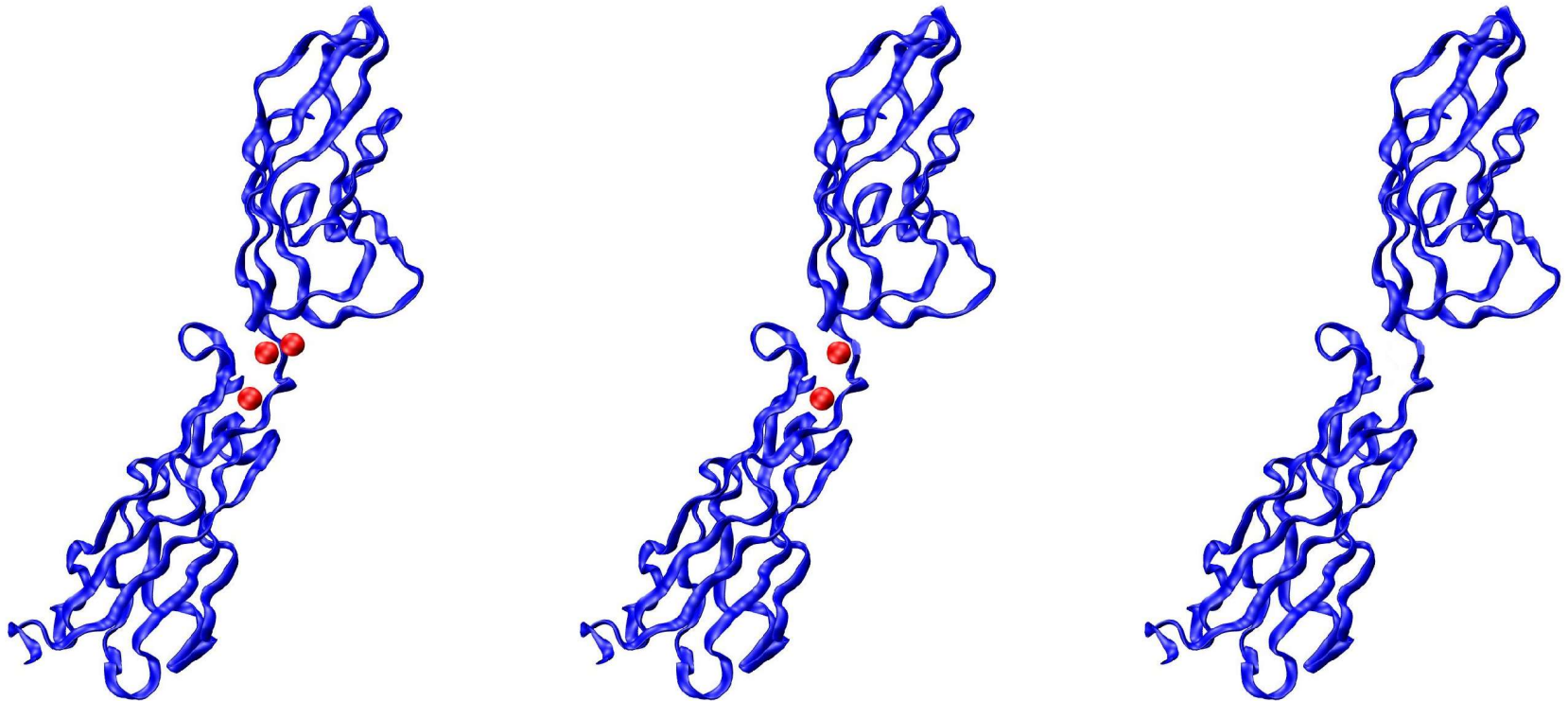
- DN6 : 6 Ca^{2+}
- DN0 : 0 Ca^{2+}

BE : DE6

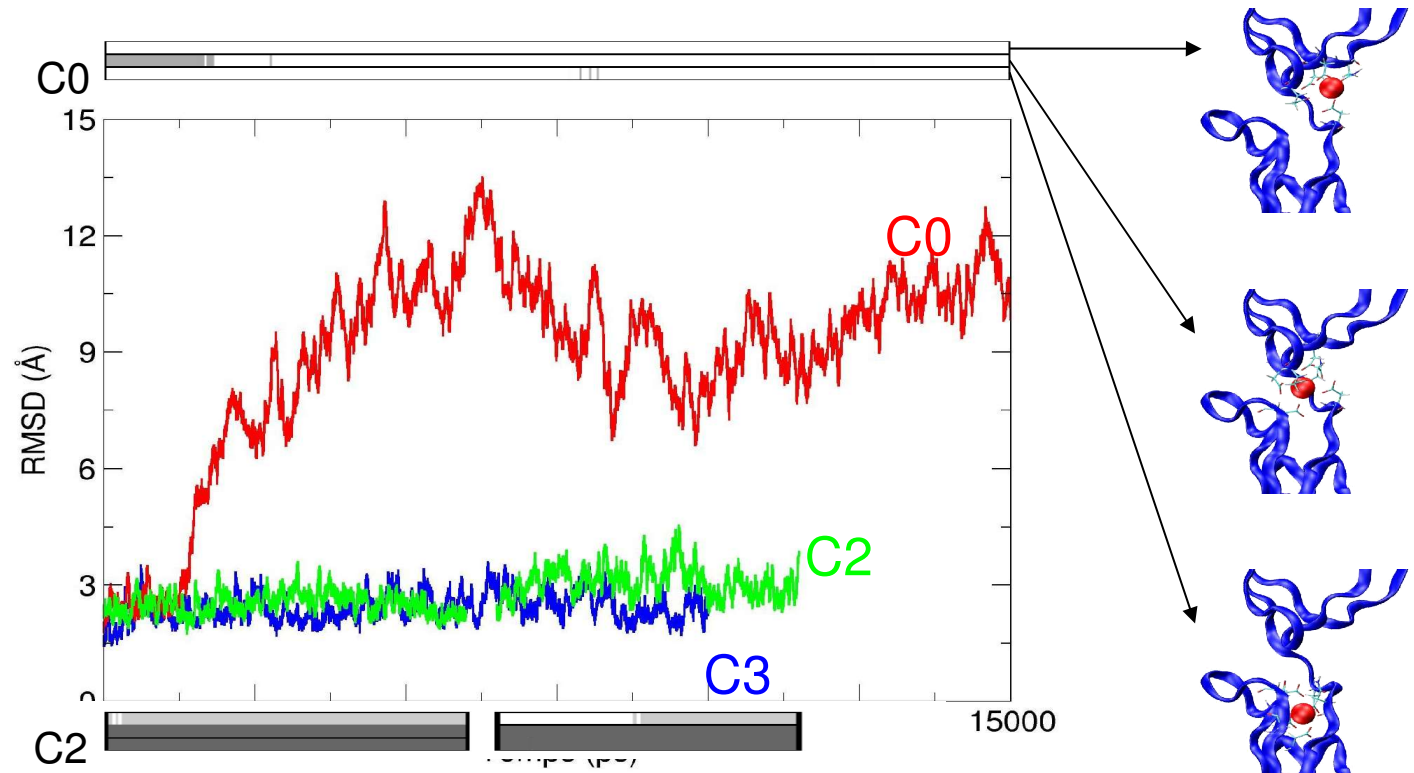
Décalé : DD6



Dynamique du monomère EC1-2

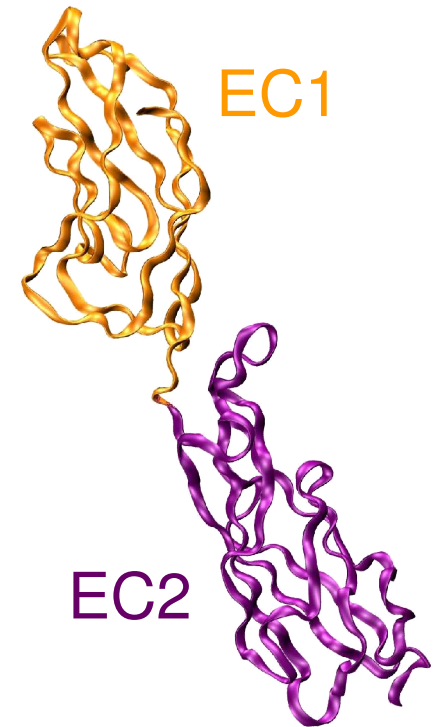
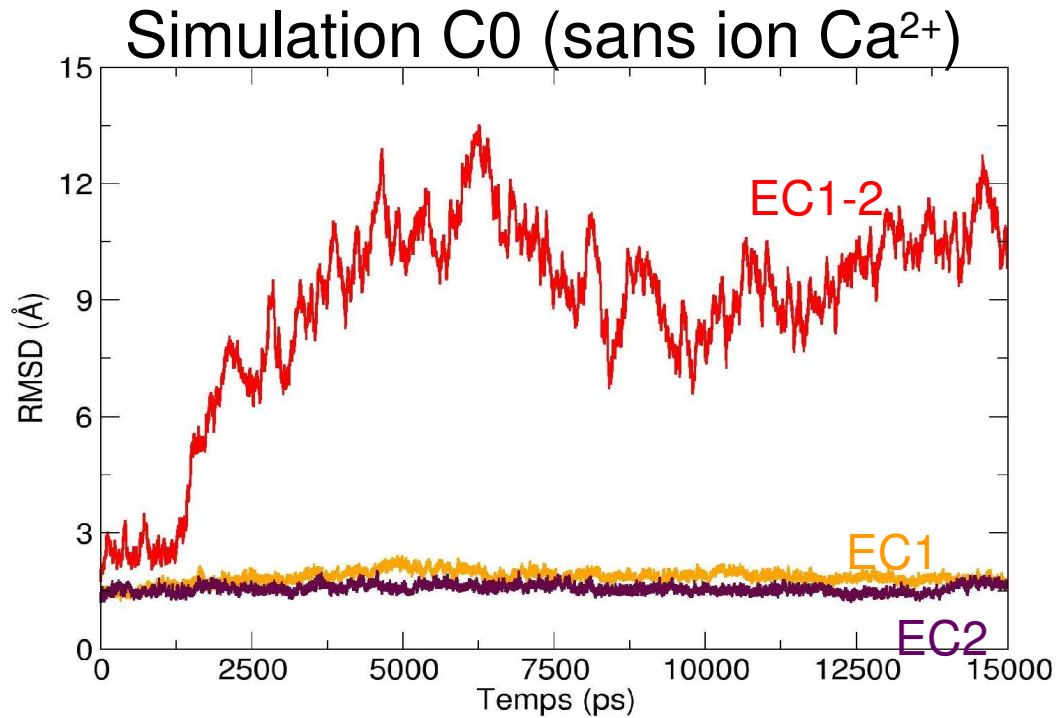


Monomères : RMSD



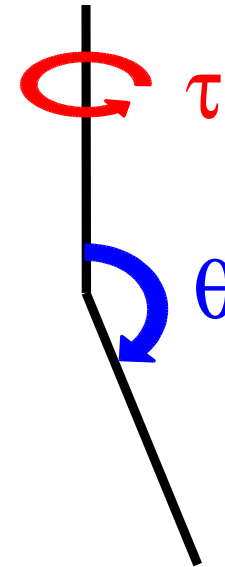
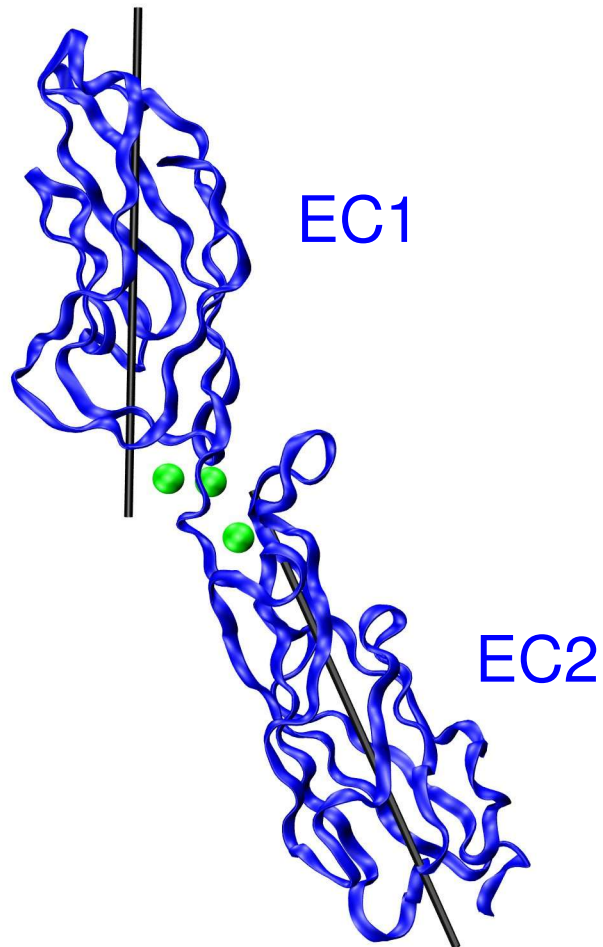
- ▶ Structure stable en présence d'ions Ca^{2+}
- ▶ Changement de conformation de liaison du calcium Ca^{2+} en présence d'ions K^{+} aux sites de liaison du calcium Ca^{2+}

Monomères : RMSD



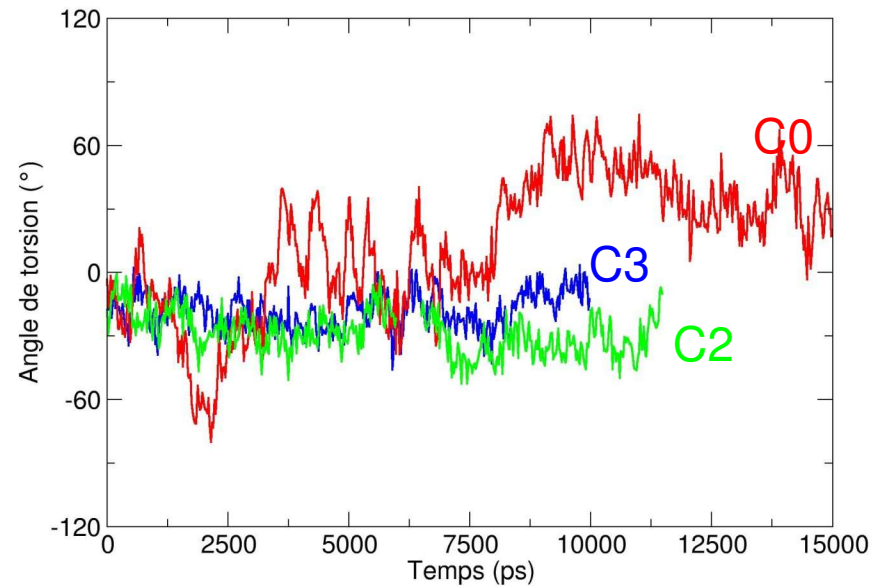
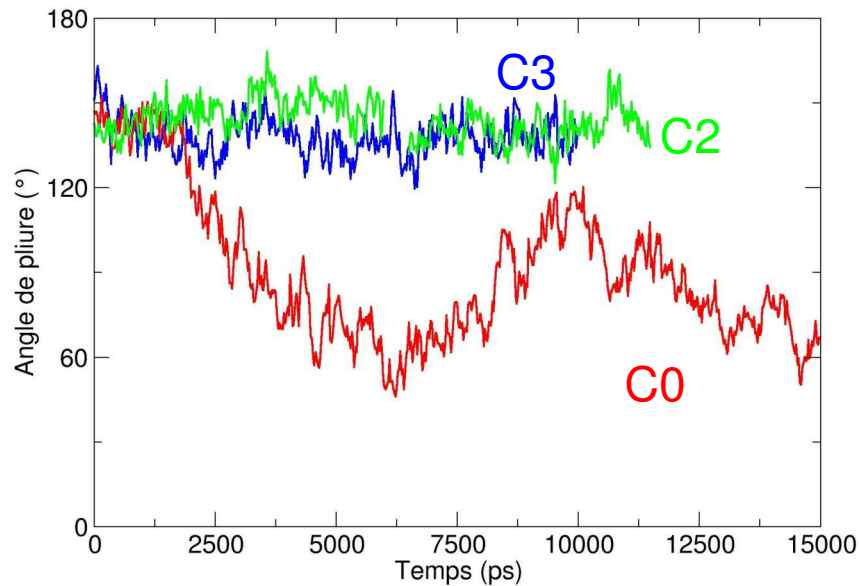
Structures des domaines EC stables en l'absence d'ions Ca^{2+}

Caractérisation de la déformation



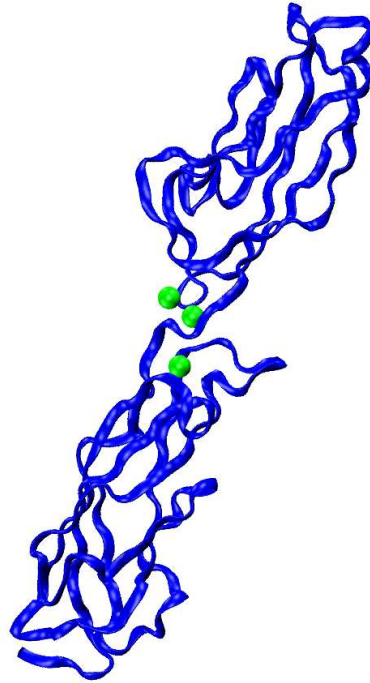
- Angle de pliure θ
- Angle de torsion τ

Monomères : Mouvements inter-domaines

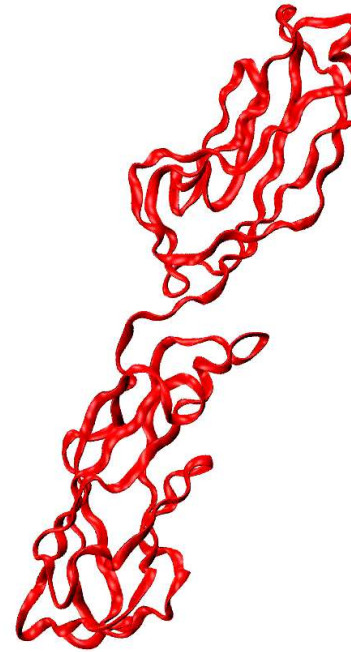


- ▶ Importance majeure de la fixation des ions Ca^{2+}
- ▶ Fixation de l'ion Ca^{2+} le plus exposé au solvant sans influence sur la structure de EC1-2

Monomères : Dynamique

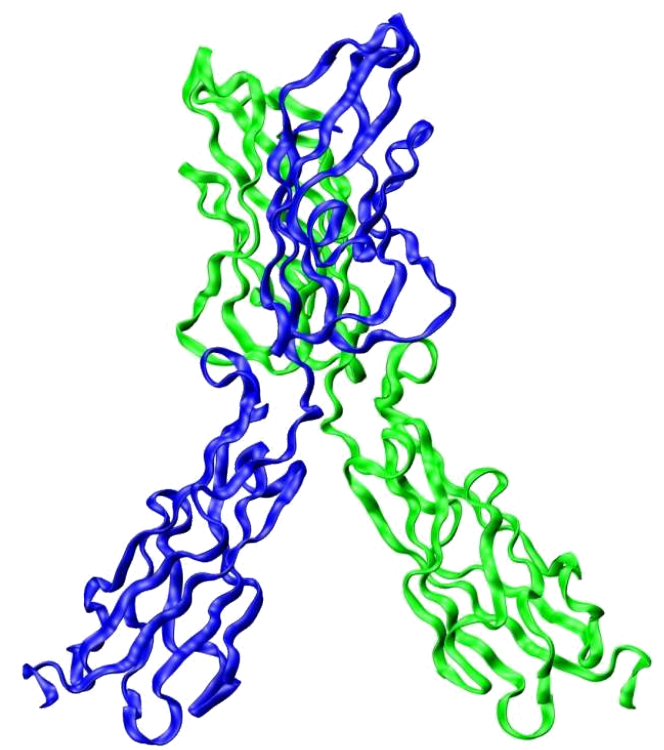
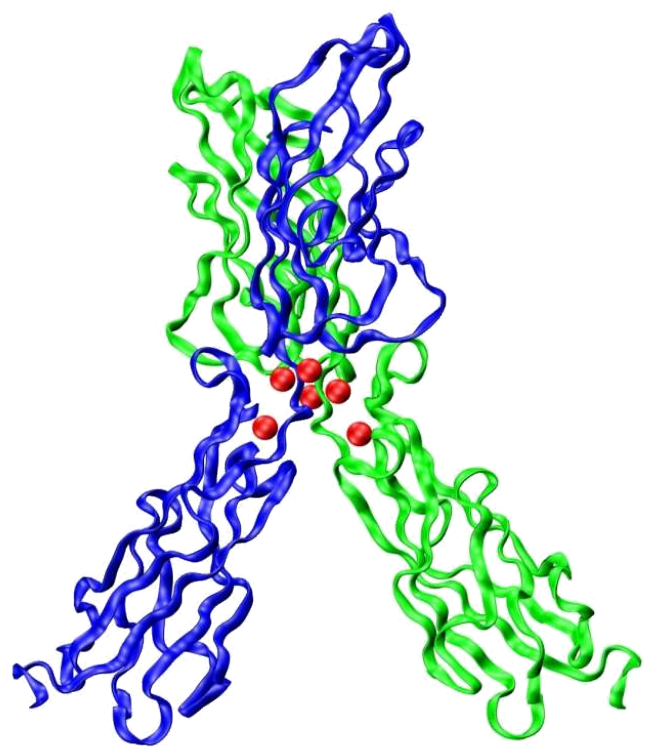


C3 : 10 ns



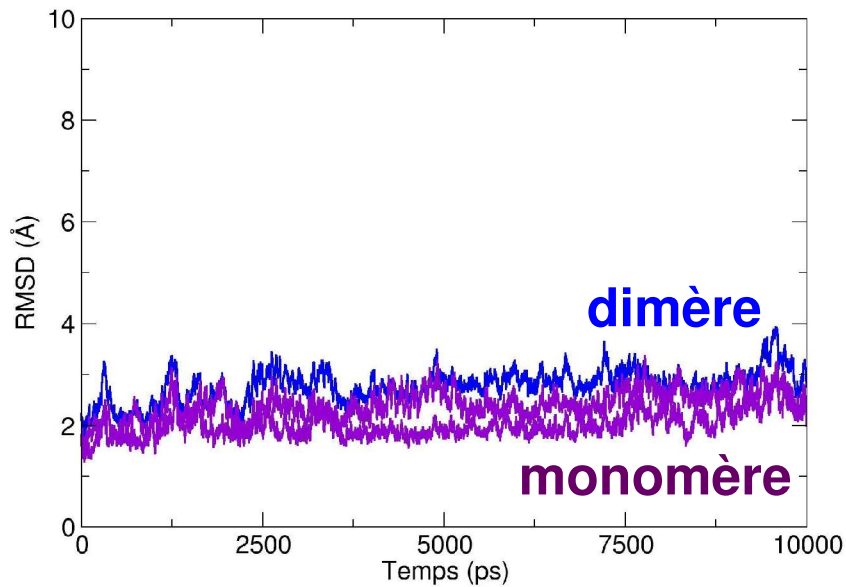
C0 : 15 ns

Ca²⁺ et dimère *BN*

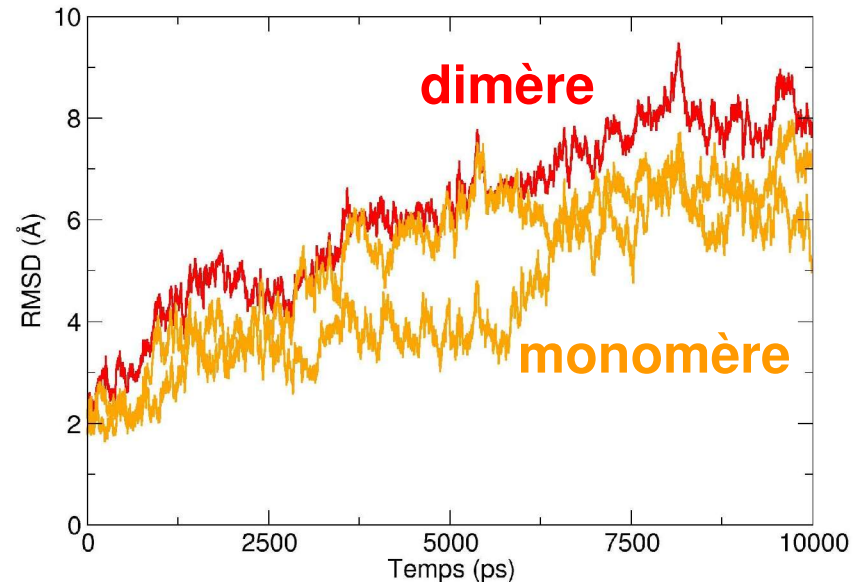


Dimères *BN* : RMSD

Avec Ca^{2+}

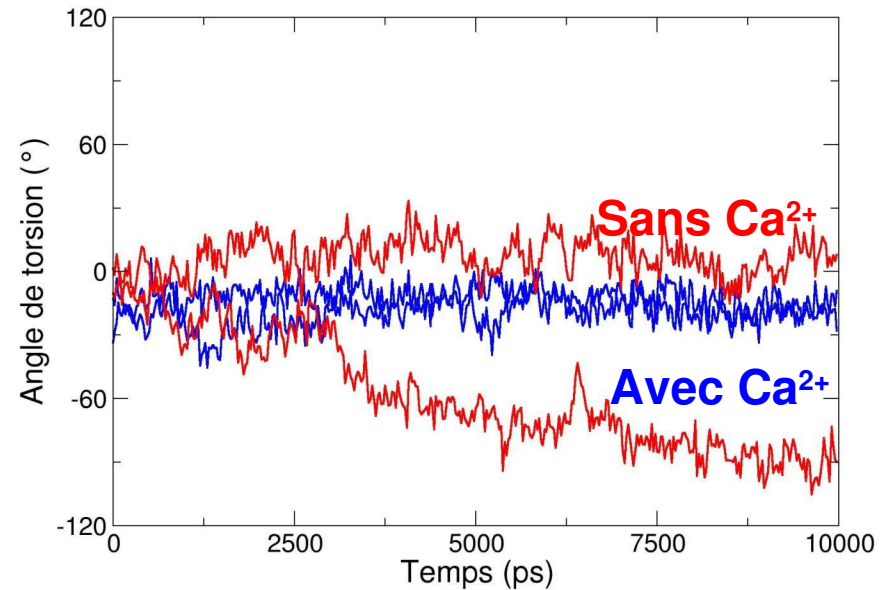
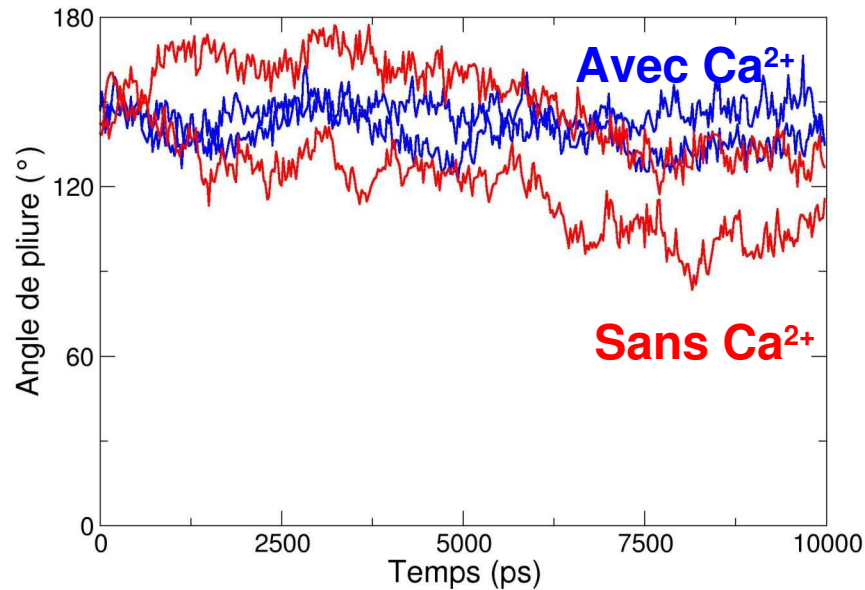


Sans Ca^{2+}



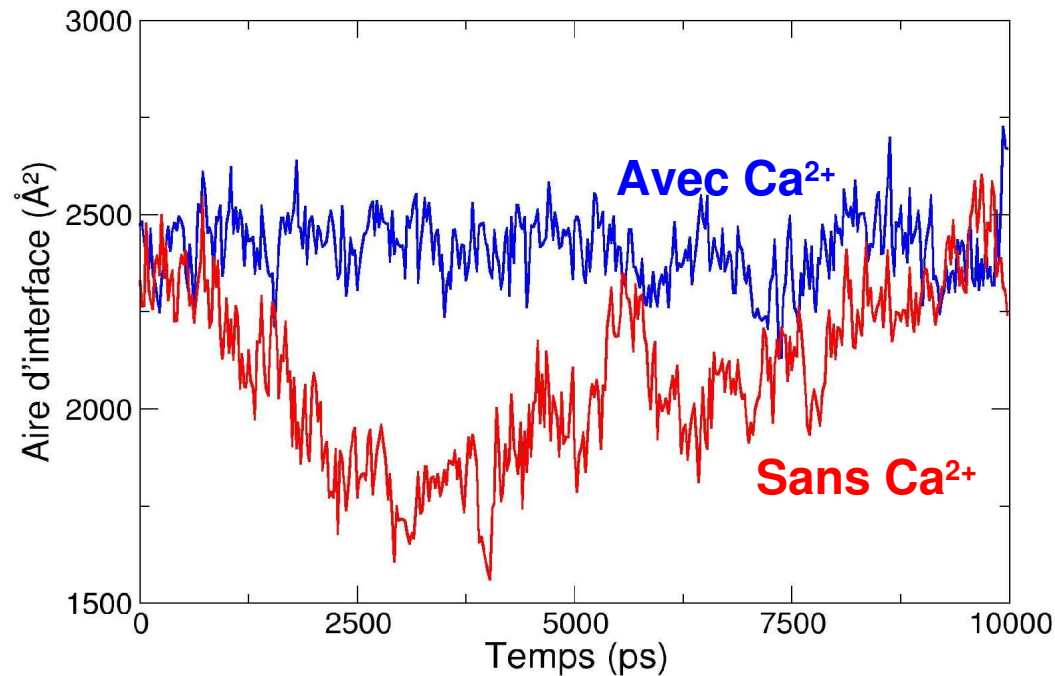
Dimère *BN* instable en l'absence d'ions Ca^{2+}

Dimères *BN* : Mouvements inter-domaines



- ▶ Comportement des dimères similaires à celui du monomère en présence d'ions Ca²⁺
- ▶ Grande flexibilité en l'absence d'ions Ca²⁺

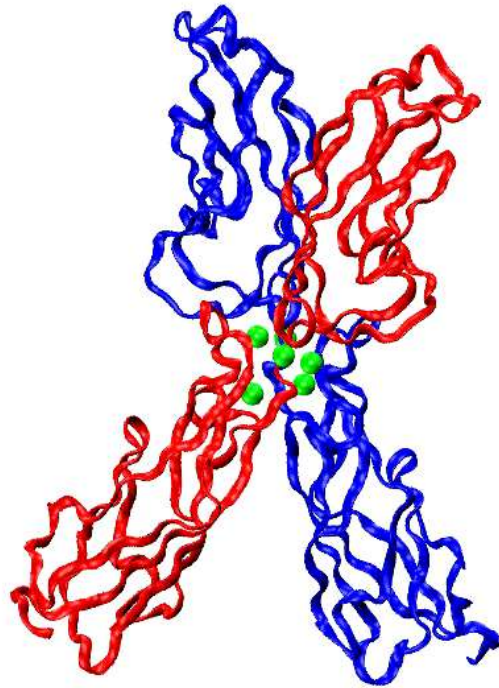
Dimères *BN* : Surface d'interaction



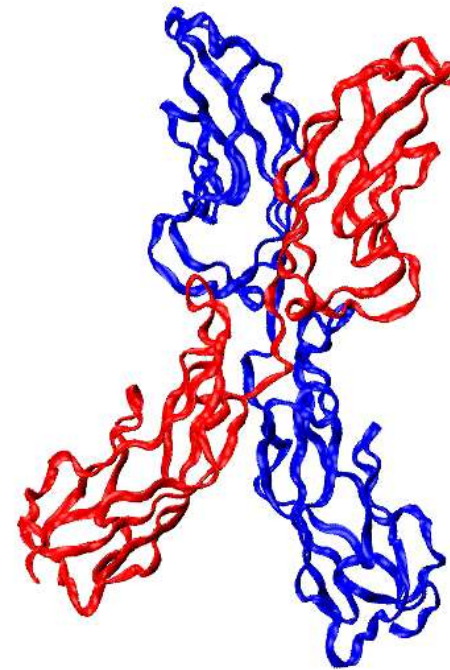
$$\text{Aire d'interface} = (ASA_1 + ASA_2) - ASA_{\text{dim}}$$

- ▶ Surface d'interaction importante dans le dimère
- ▶ Modification significative de l'interface en l'absence d'ions Ca^{2+}

Dimères *BN* : Dynamique

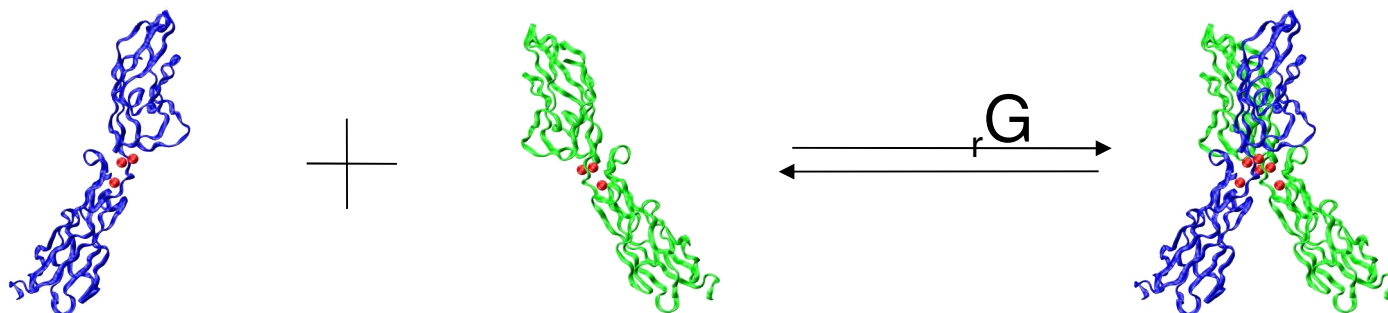


DC6 : 10 ns



DC0 : 10 ns

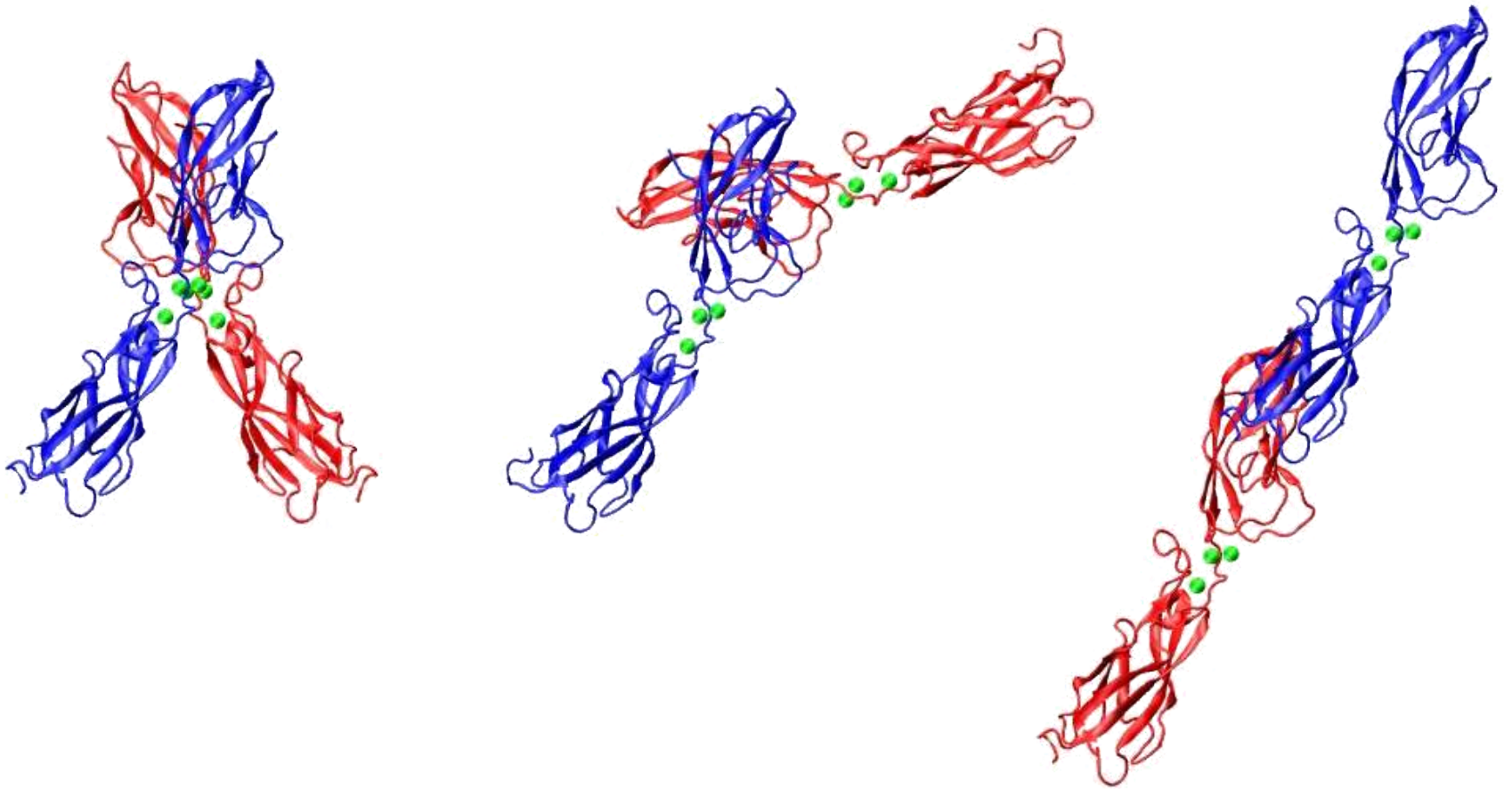
Dimères *BN* : Calcul de rG



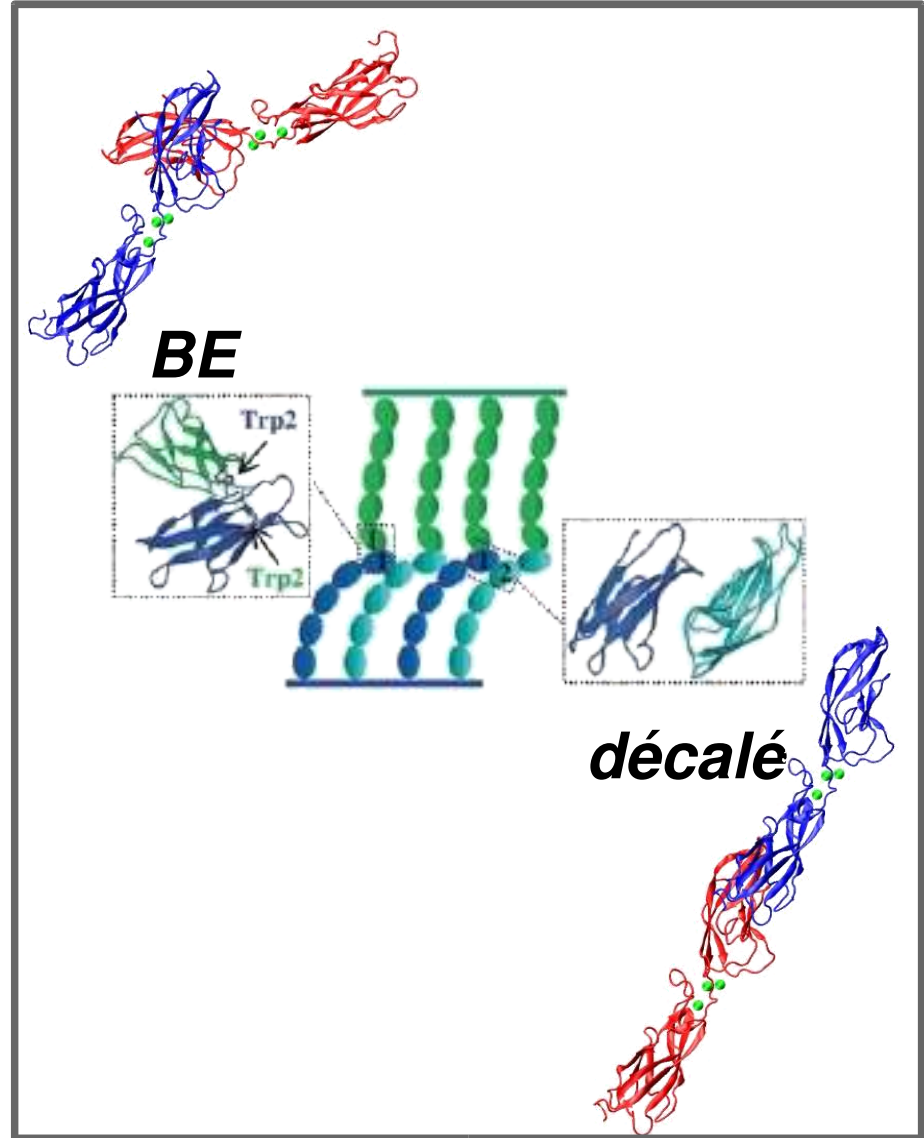
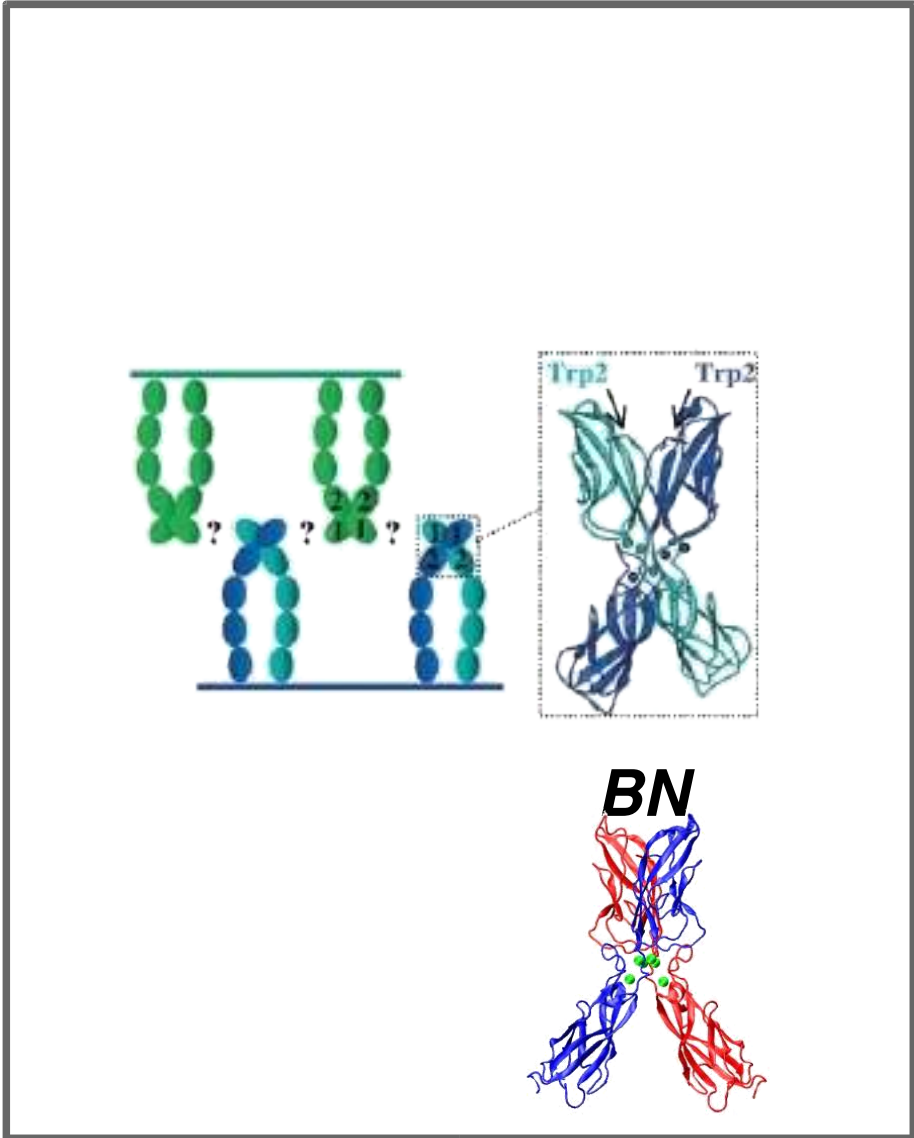
- ▶ Expérimentalement : pas de dimérisation en absence de Ca^{2+}
- ▶ Calculs de type MM-PBSA :

	Avec Ca^{2+}	Sans Ca^{2+}
rG (kcal.mol ⁻¹)	-29	149

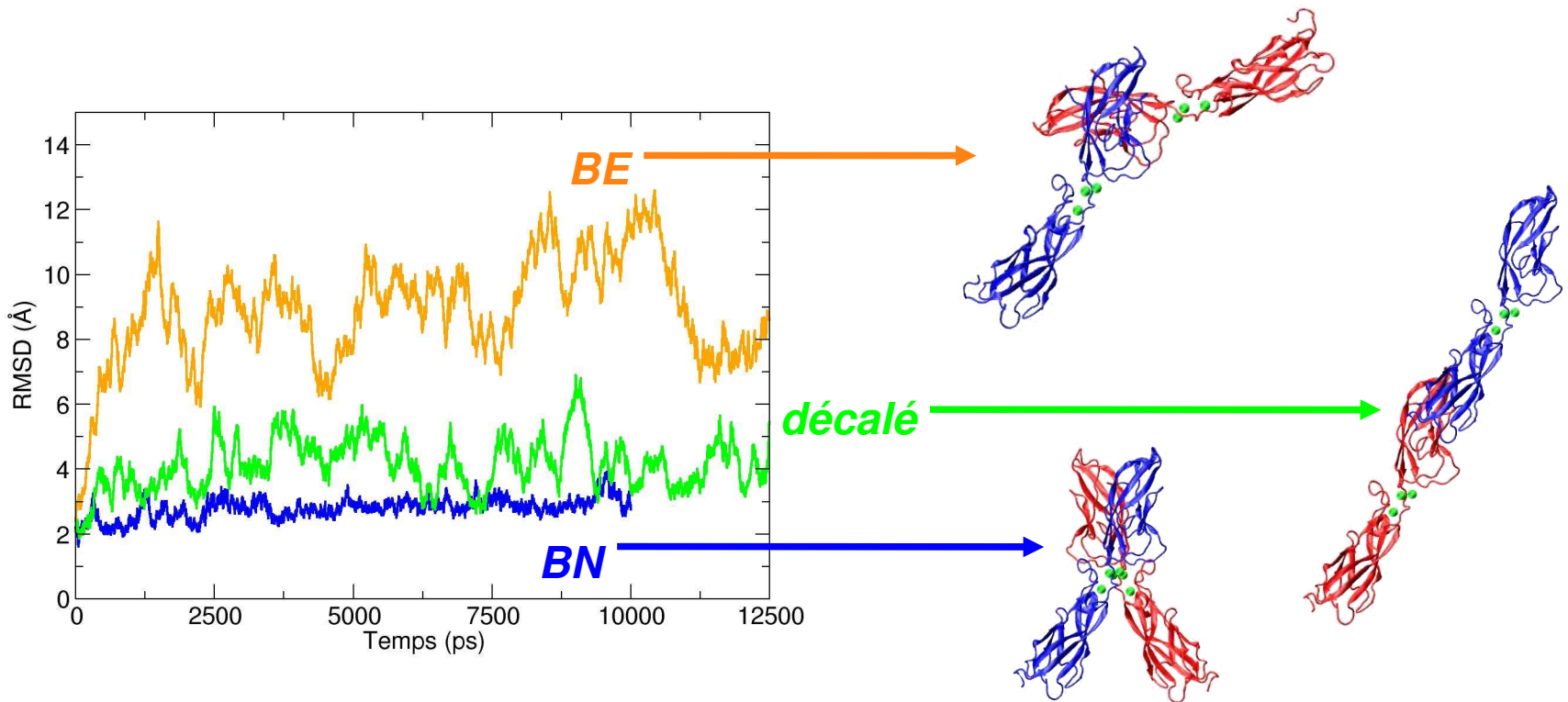
Dimères *BN* / *BE* / décalé



Modèles d'interaction



Dimères : Structure



Changements structuraux importants pour le dimère *BE*

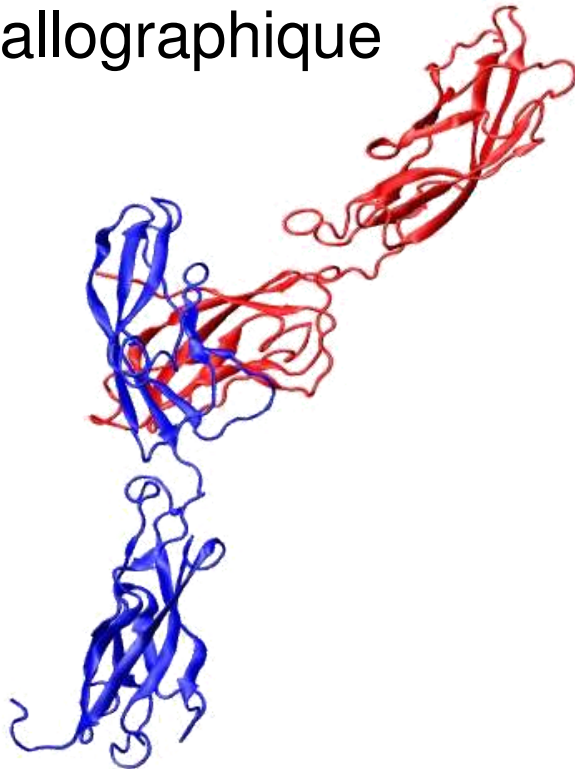
Monomères au sein des dimères

Simulation	Pliure (°)	Torsion (°)
Structure RX	148 : 154	-21 : -16
monomère	137 ± 6	-18 ± 9
dimère <i>BN</i>	138 ± 7 147 ± 5	-16 ± 6 -15 ± 7
dimère <i>BE</i>	141 ± 7 134 ± 9	-18 ± 8 -19 ± 8
dimère <i>décalé</i>	138 ± 8 152 ± 9	-29 ± 9 -17 ± 9

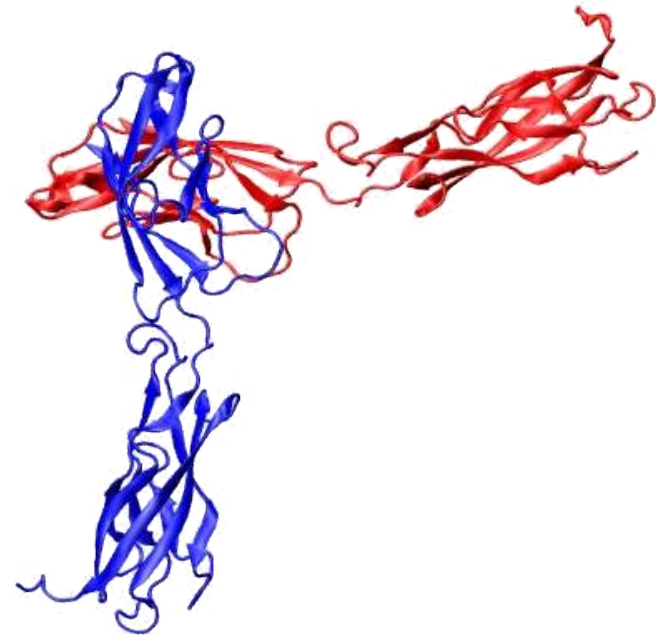
Dynamique des monomères non altérée au sein des dimères

Dimère *BE* : Changement conformationnel

Structure
cristallographique

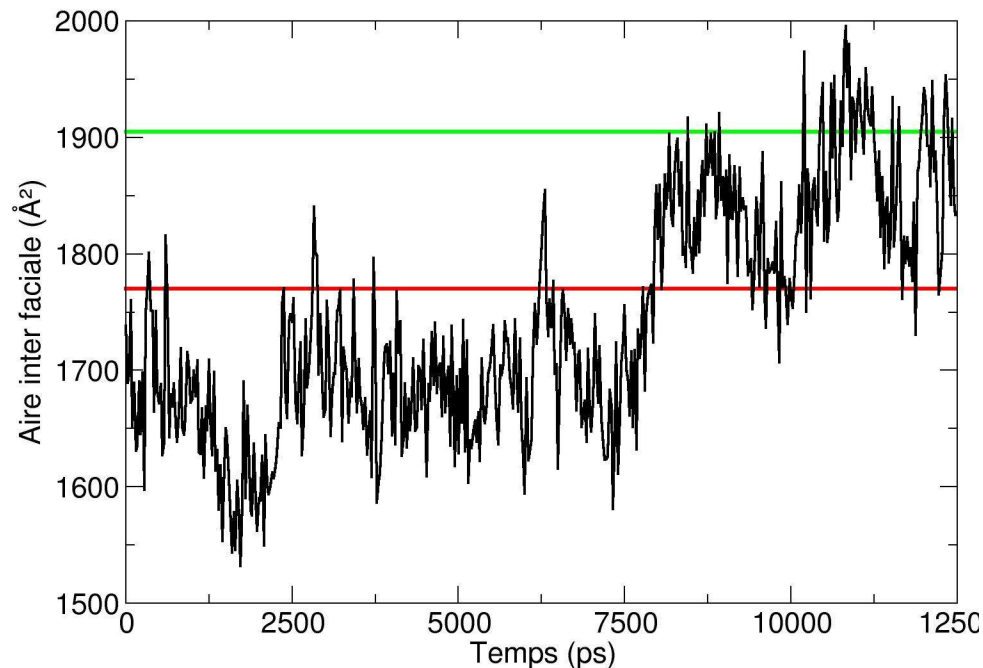


Moyenne DM



Rotation d'un monomère par rapport à l'autre

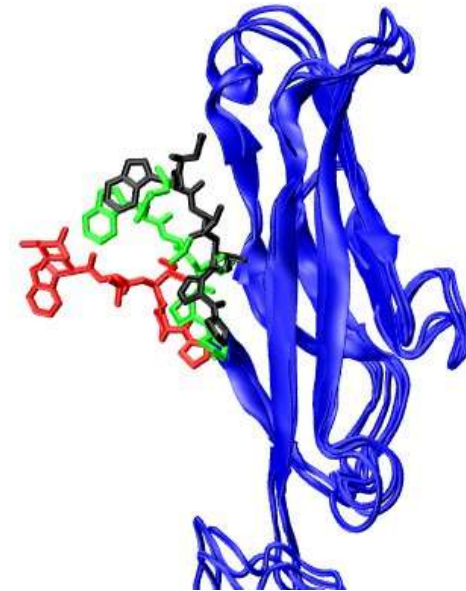
Dimère *BE* : Évolution de l'interface



Structure RX E-cadhérine

Moyenne DM

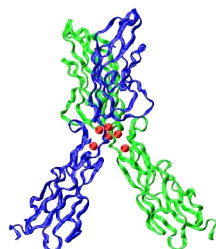
Structure RX C-cadhérine



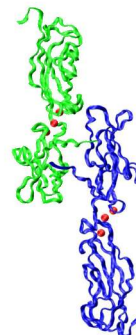
- ▶ Augmentation de l'aire inter-faciale
- ▶ Similitudes structurales avec la C-cadhérine

Dimères : Stabilité thermodynamique

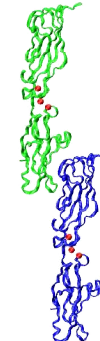
Dimère BN



Dimère BE



Dimère *décalé*



Interface (Å²)

2420

1866

1081

$\Delta_r H$ (kcal.mol⁻¹)

-84

-75

-45

$-T \Delta_r S$ (kcal.mol⁻¹)

55

34

34

$\Delta_r G$ (kcal.mol⁻¹)

-29

-41

-11

- ▶ Petite interface pour le dimère *décalé*
- ▶ Stabilité relative : $BE > BN > \textit{décalé}$

Dimères : Spécificité des interactions

	N-Cad	C-Cad	E-Cad
E-Cad	✗	✓	✓
C-Cad	✓	✓	
N-Cad	✓		

- ▶ Spécificité des interactions non totales
- ▶ Existence d'interactions entre E- et C-cadhérines

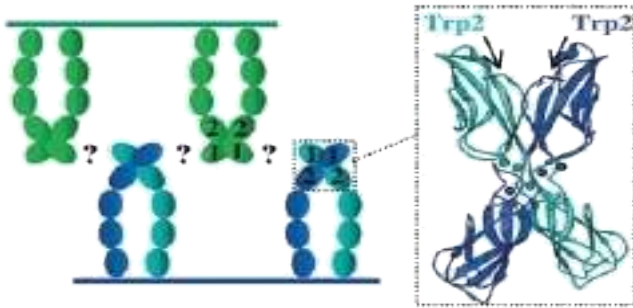
Dimères : Spécificité des interactions

- ▶ Interface *BE* peu spécifique (identique pour E- et C-cadhérines)
- ▶ Interfaces *BN* et *décalée* plus spécifiques

Conclusions : Rôle des ions Ca^{2+}

- ▶ Maintien de la structure monomérique
- ▶ Importance mineure de l'ion Ca^{2+} le plus exposé au solvant
- ▶ Stabilisation du dimère *BN*
- ▶ Accord avec les données expérimentales

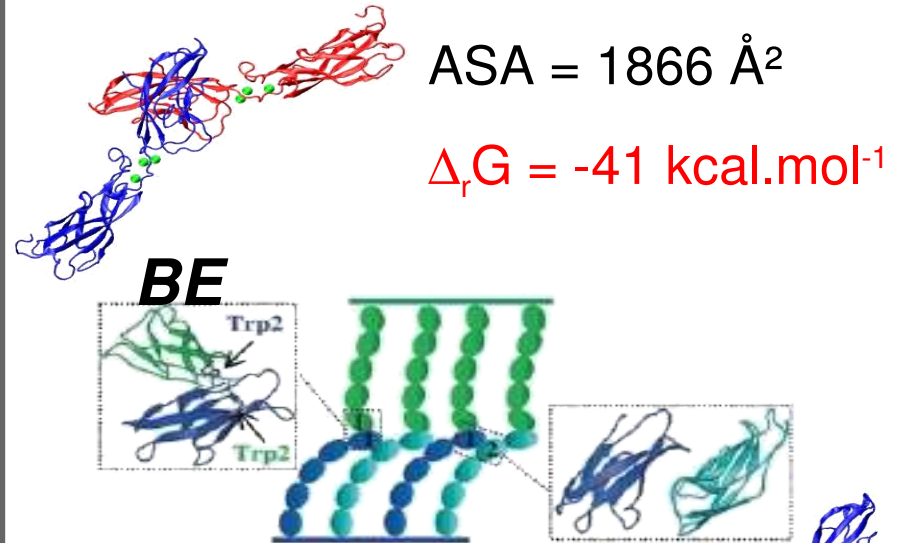
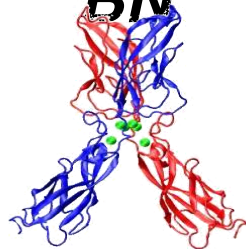
Conclusions : Structures dimériques



BN

$$ASA = 2420 \text{ \AA}^2$$

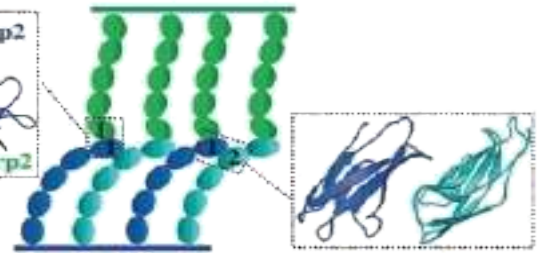
$$\Delta_r G = -29 \text{ kcal.mol}^{-1}$$



BE

$$ASA = 1866 \text{ \AA}^2$$

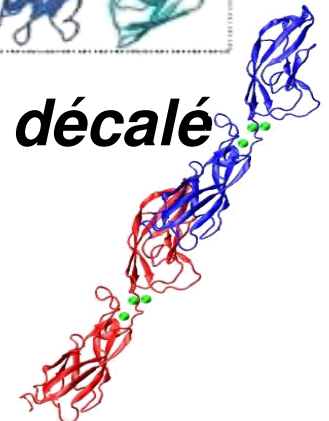
$$\Delta_r G = -41 \text{ kcal.mol}^{-1}$$



décalé

$$ASA = 1081 \text{ \AA}^2$$

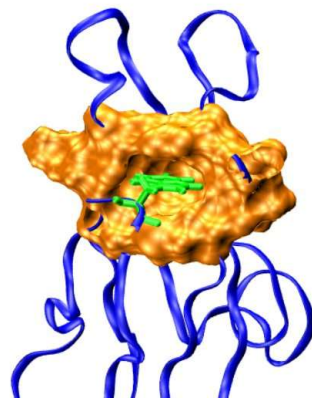
$$\Delta_r G = -11 \text{ kcal.mol}^{-1}$$



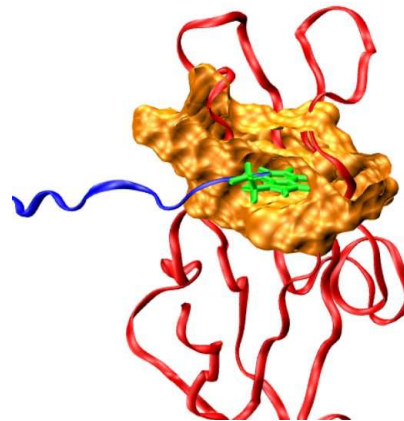
- ▶ Stabilité des trois dimères en présence de Ca^{2+}
- ▶ Spécificité des interactions en accord avec les données expérimentales

Perspectives

- Étude du rôle du Trp2 dans les phénomènes de dimérisation (dynamiques sous contraintes)



BN



BE

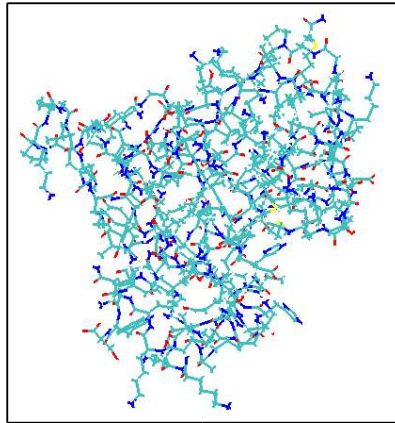
- Étude de l'effet de mutations sur la dimérisation

Limitations et modèles de représentation

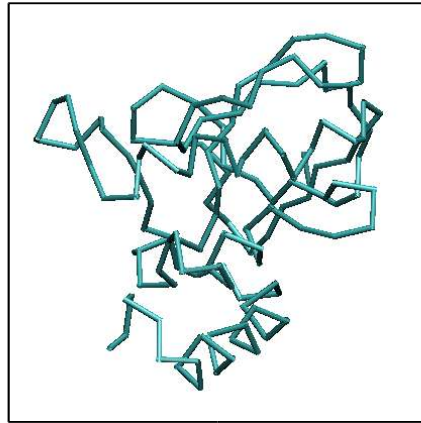
- ▶ Étude du dimère *BE* :
 - ~ 230000 atomes
 - ~ 74000 molécules d'eau
 - Temps CPU pour 10ns de DM : ~ 700 jours

- ▶ Réduction du temps de calcul :
 - Solvatation implicite (GB, PB...)
 - Représentations simplifiées des protéines

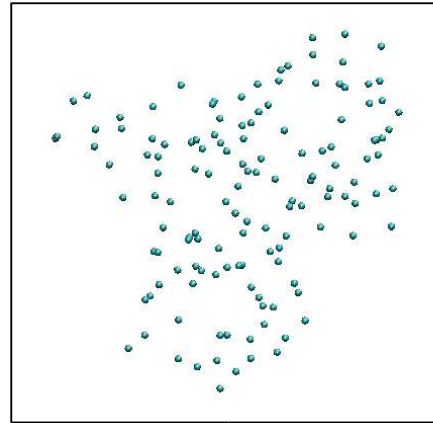
Utilisation d'une représentation simplifiée



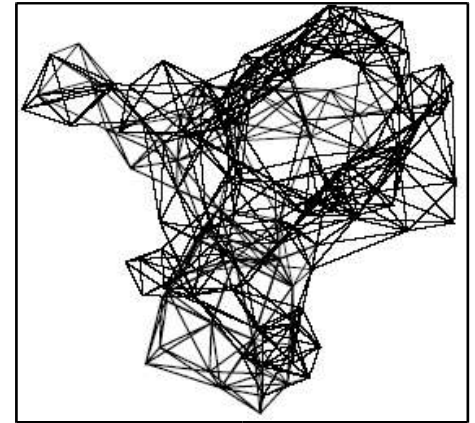
Tout atome



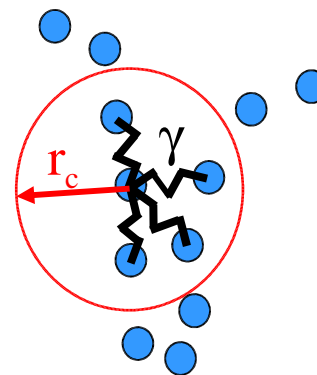
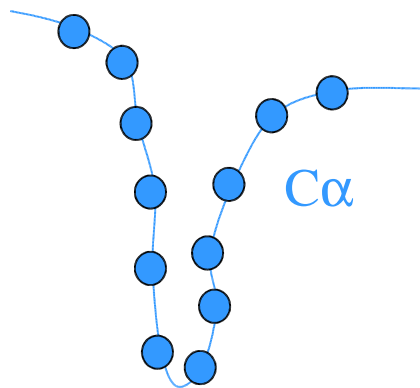
Trace



$C\alpha = \text{sites}$



Réseau élastique

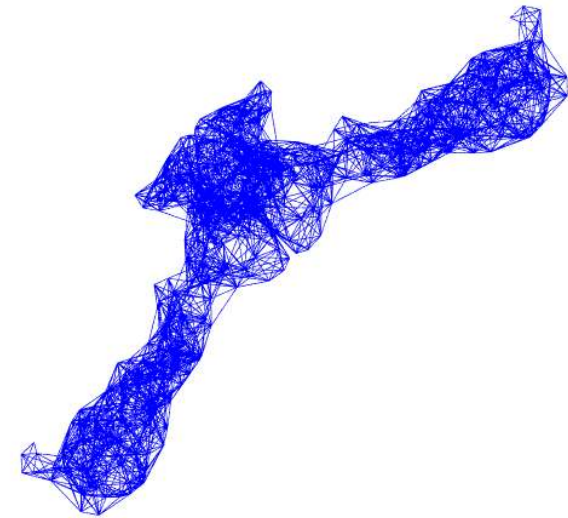
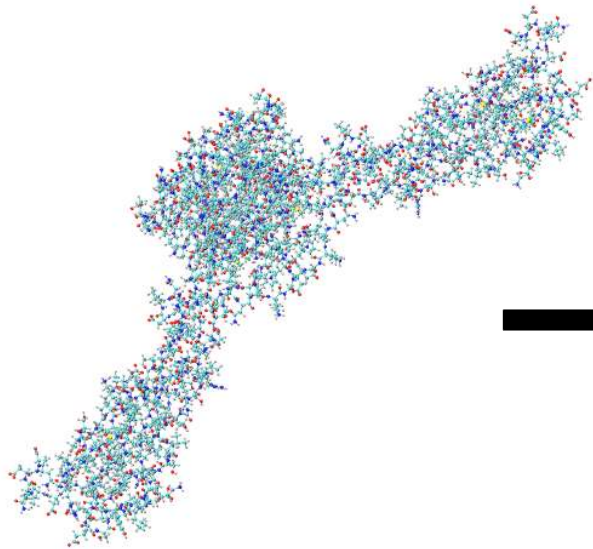


- ▶ Nombre d'atomes réduit et solvation inutile
- ▶ Perte d'information importante

Représentation multi-échelle des protéines

Tout atome

Réseau élastique

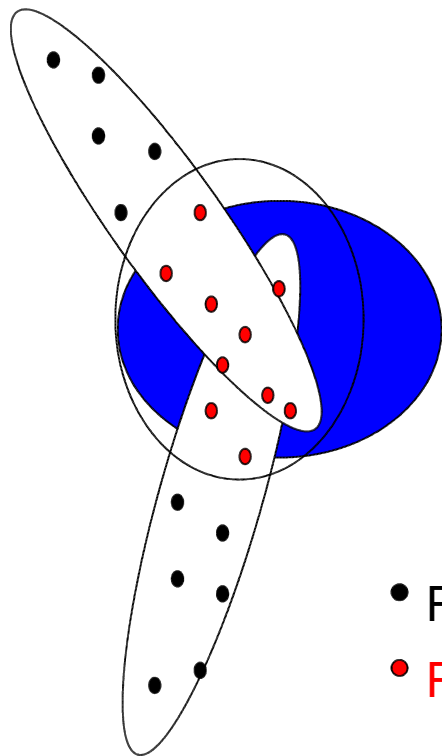


- ▶ Précis
- ▶ Calculs longs

- ▶ Grossier
- ▶ Rapidité de calcul

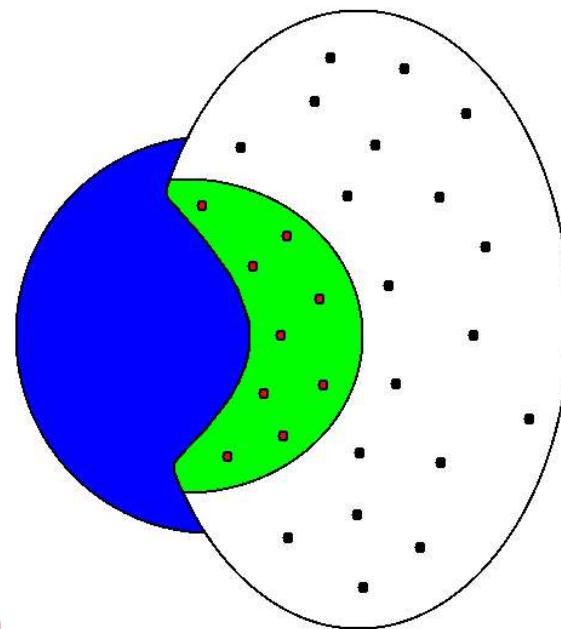
Principe – Exemples d'application

Surfaces d'interaction



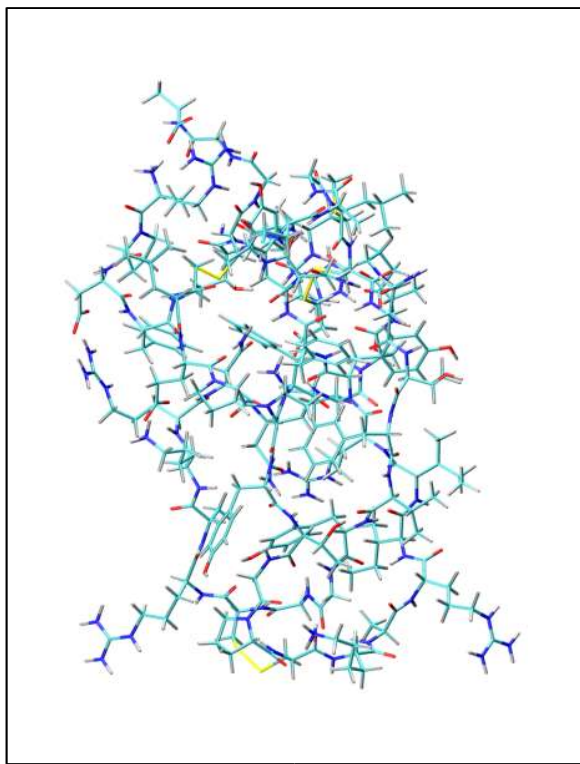
- Résidus "Gros grains" (CG)
- Résidus "Tout Atome" (MM)

Sites actifs enzymatiques

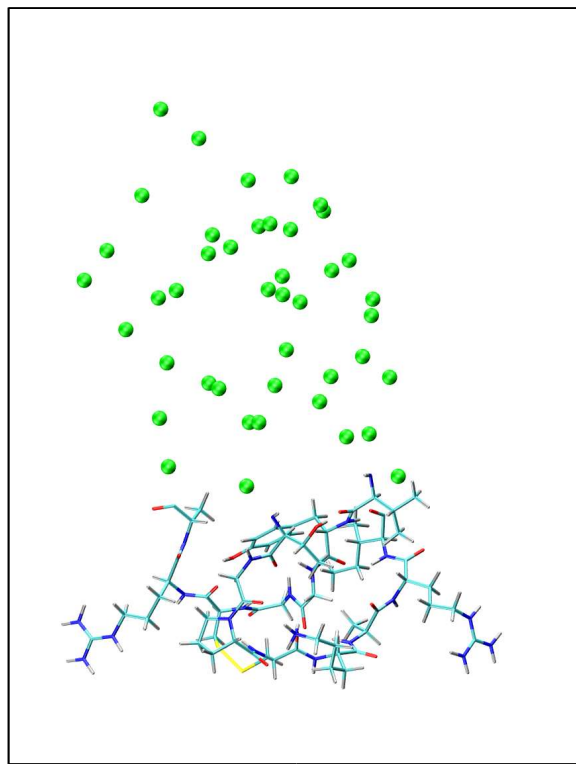


- ▶ Représentation précise dans la zone d'intérêt
- ▶ Réduction de la partie à solvater
=> Gain de temps de calcul

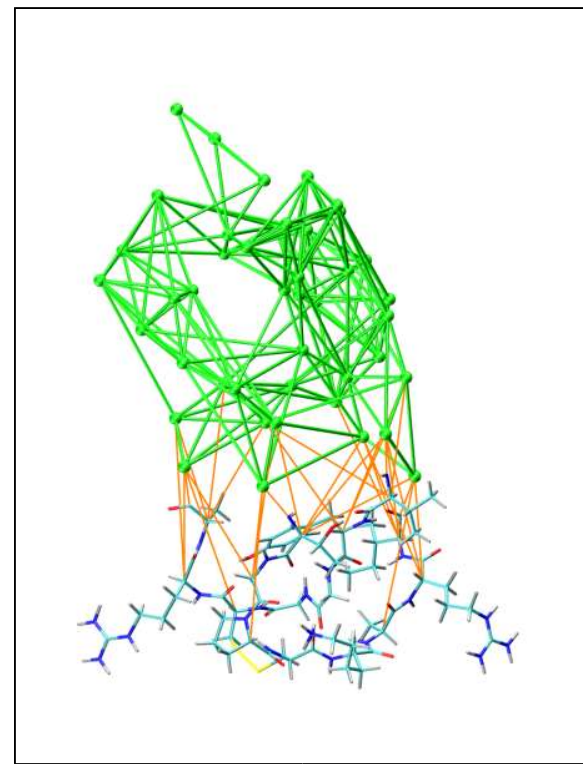
Construction du modèle MM/CG



Représentation
"tout atome"

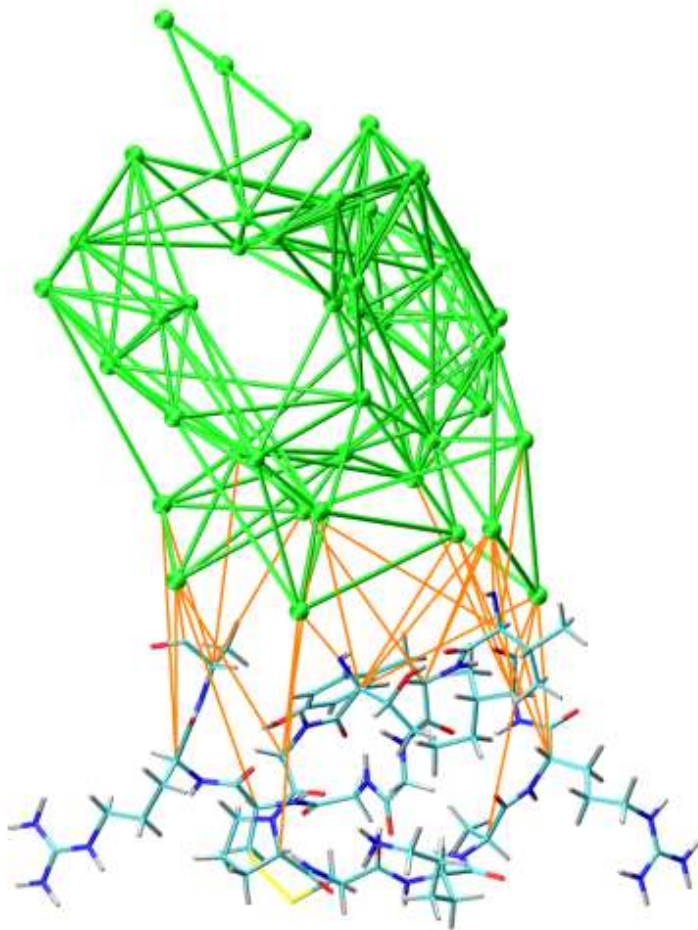


Sélection de la
zone "tout atome"



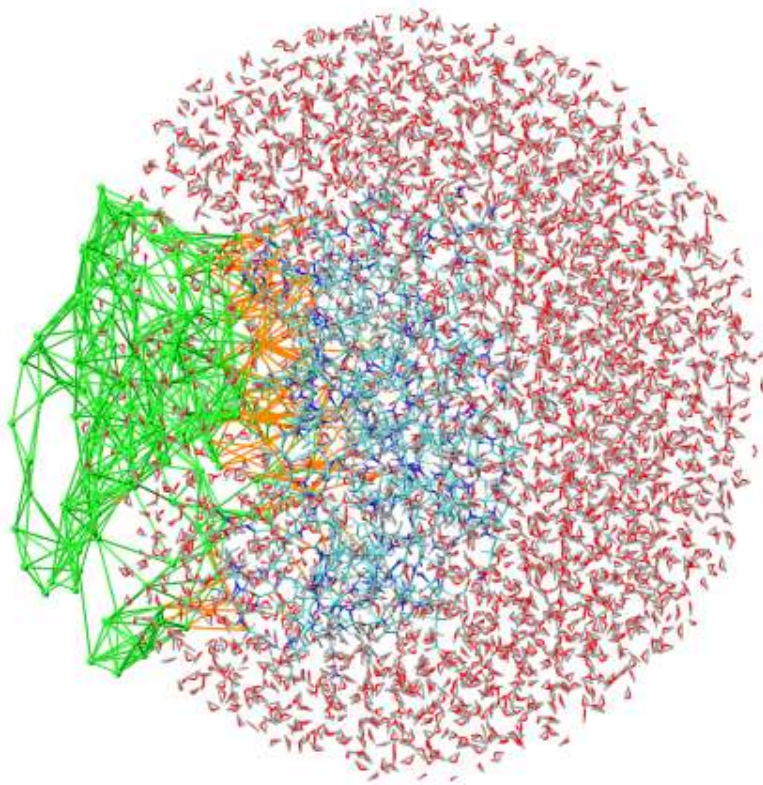
Représentation
MM/CG

Définition de la représentation hybride



- ▶ 20 nouveaux types d'acides aminés : CGX
- ▶ $\text{Masse}(\text{CGX}) = \text{Masse}(\text{X})$
- ▶ $\text{Charge}(\text{CGX}) = 0$
- ▶ Réseau élastique impliquant les résidus CGX
- ▶ Pas d'interaction de van der Waals impliquant les résidus CGX et les résidus de la protéine
- ▶ Interactions de van der Waals répulsives entre les résidus CGX et les molécules d'eau

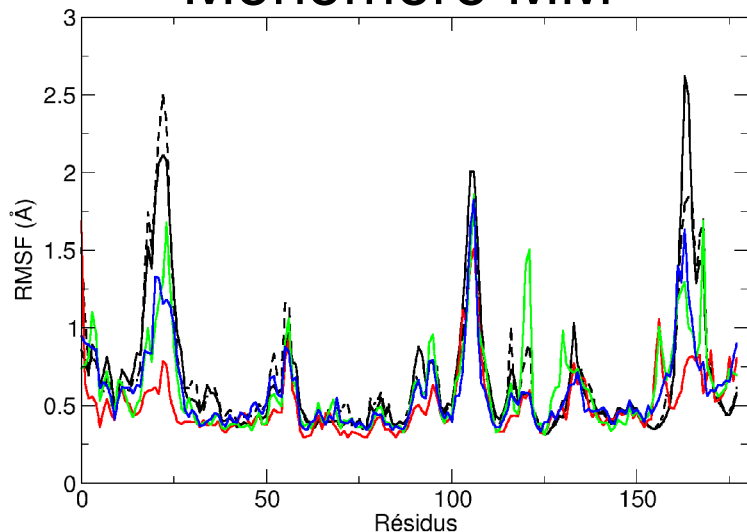
Étude d'un homo-dimère



- ▶ APRTase
- ▶ 2×178 résidus
- ▶ 1 monomère MM
- ▶ 1 monomère CG

Fluctuations globales

Monomère MM



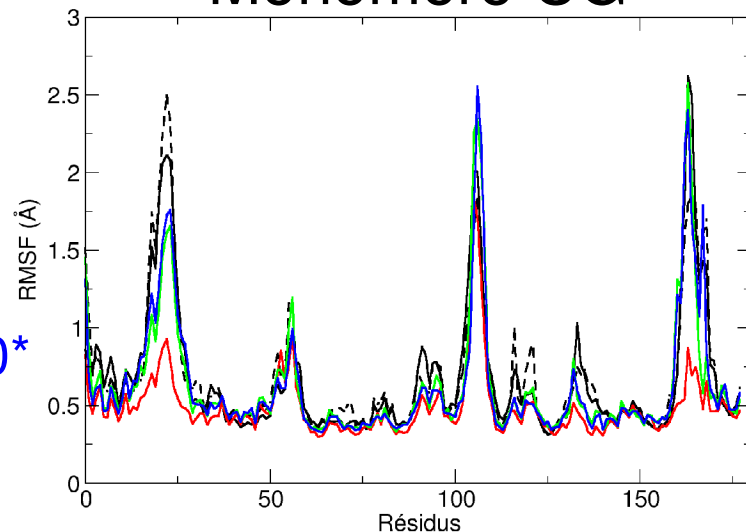
"Tout atome"

MM/CG - T0*

MM/CG - T7*

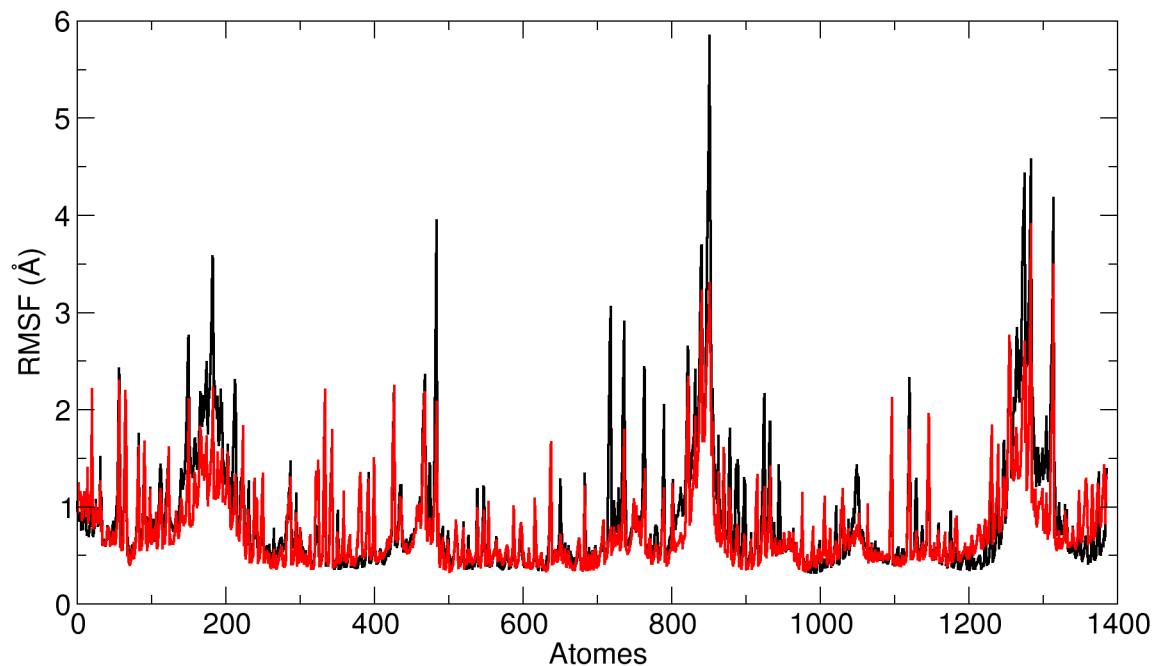
MM/CG - T10*

Monomère CG



- ▶ Fluctuations globales bien reproduites
- ▶ Influence de la structure initiale
- ▶ Mouvements de basse fréquences bien reproduits

Fluctuations atomiques



"Tout atome"

MM/CG – T10

Coefficient de
corrélacion : 0,89

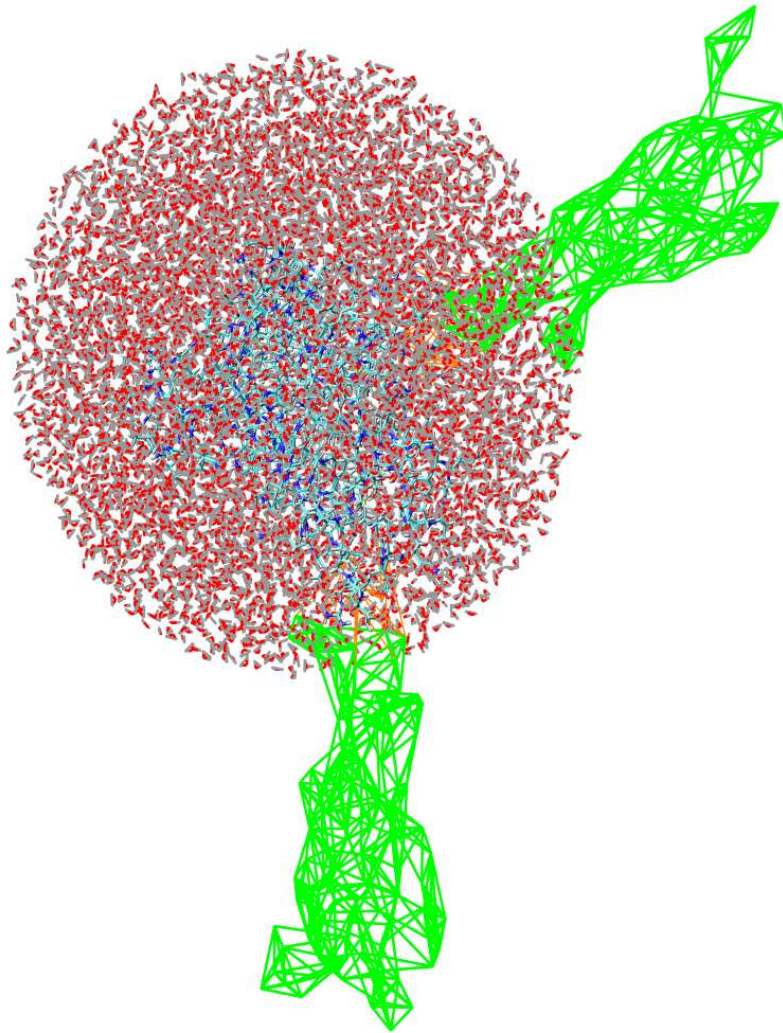
Mobilité des atomes au sein de la zone MM bien reproduite

Temps de calcul

Modèle de représentation	Nombre d'atomes	Temps CPU pour 100 ps de simulation (h)
"tout-atome" conditions périodiques	43900	104
MM/CG gouttelette d'eau	13500	32

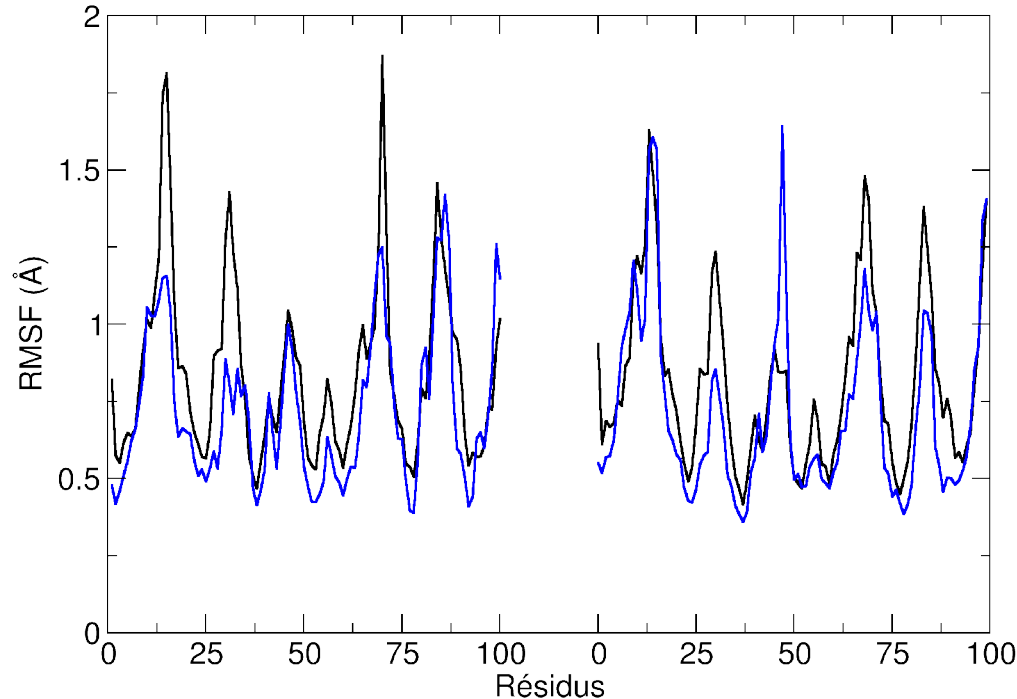
- ▶ Traitement de l'électrostatique non optimisé
- ▶ Temps de simulation divisé par un facteur 3

Application aux cadhérines



- ▶ Zone d'interaction à résolution atomique
- ▶ Autres domaines en réseau élastique
- ▶ Étude de mutations

Premiers résultats sur les cadhérines



"Tout atome"

MM / CG

Fluctuations globalement bien reproduites
avec le modèle MM/CG dans la zone MM ($r=0,82$)

Conclusions et perspectives

► Conclusions :

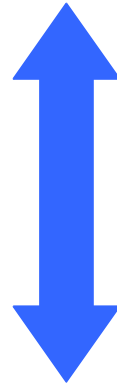
- Trajectoires stables avec le modèle MM/CG
- Reproduction des fluctuations globales et atomiques
- Diminution du temps de calcul

► Perspectives :

- Traitement plus réaliste des interactions électrostatiques (fonction de *switch* ou de *shift*)
=> Gain de temps de calcul
- Application aux mutants de E-cadhérine

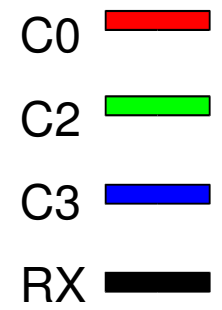
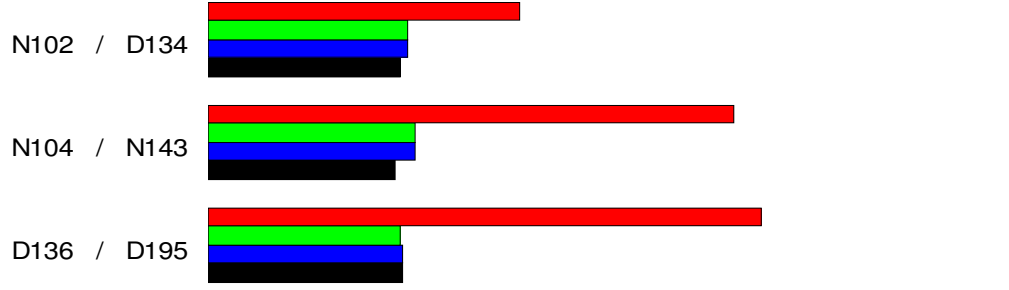
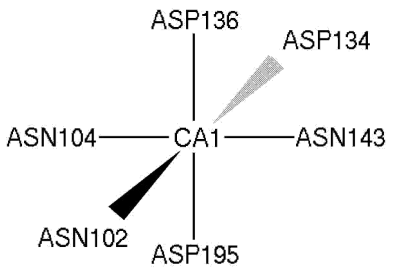
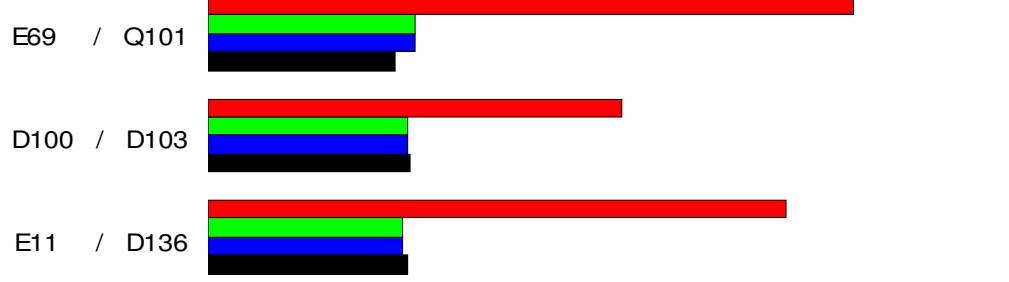
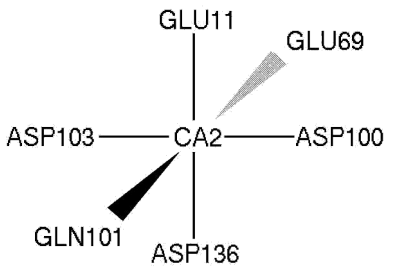
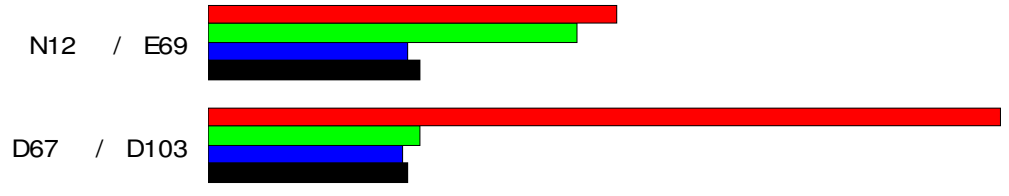
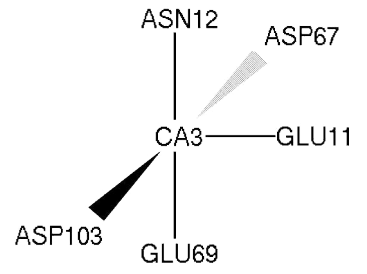
Conclusion générale

- ▶ Étude des propriétés mécaniques des E-cadhérines



- ▶ Développements méthodologiques pour l'étude des propriétés mécaniques des systèmes biologiques

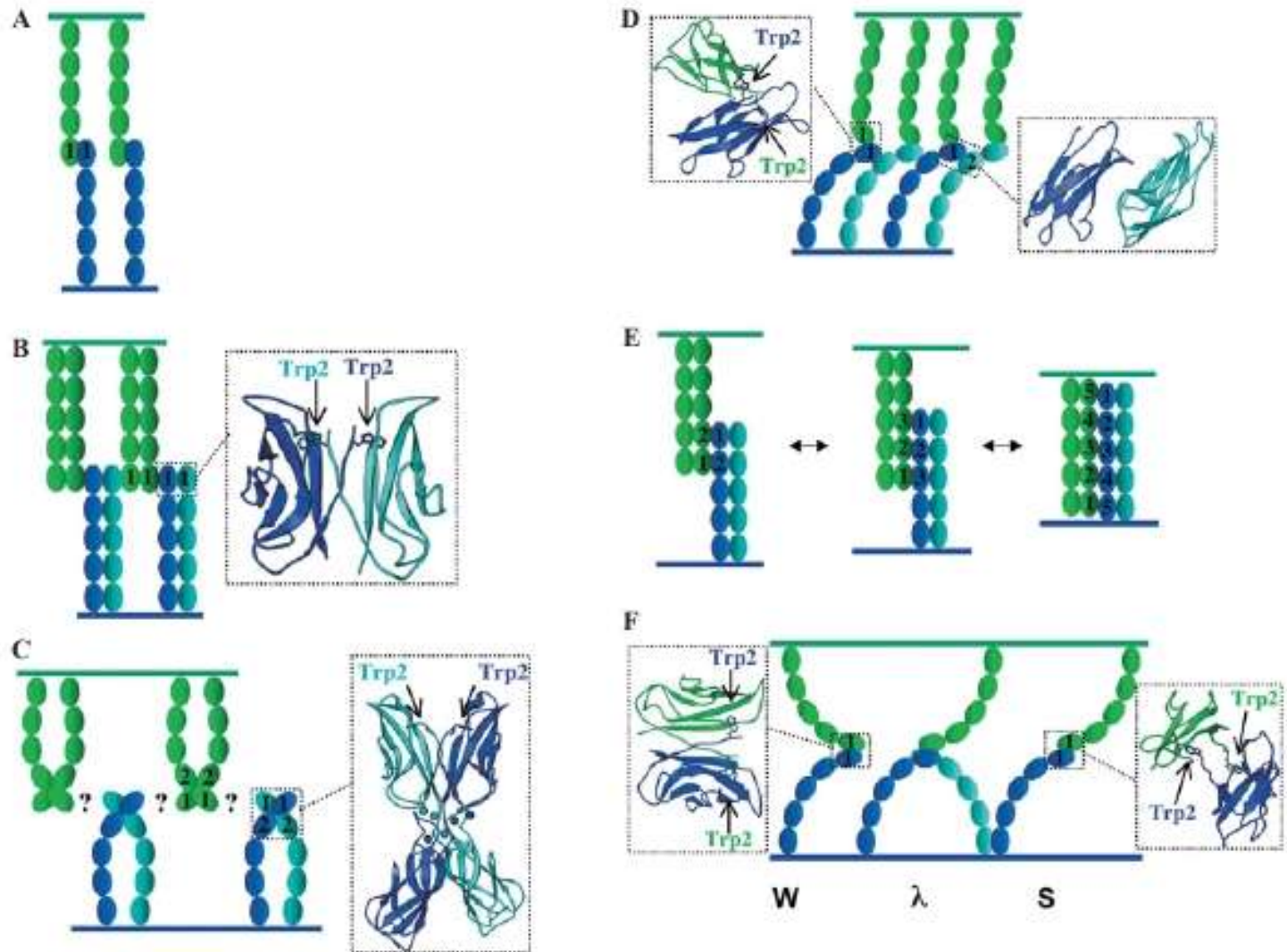
Monomères : Sites de liaison du calcium



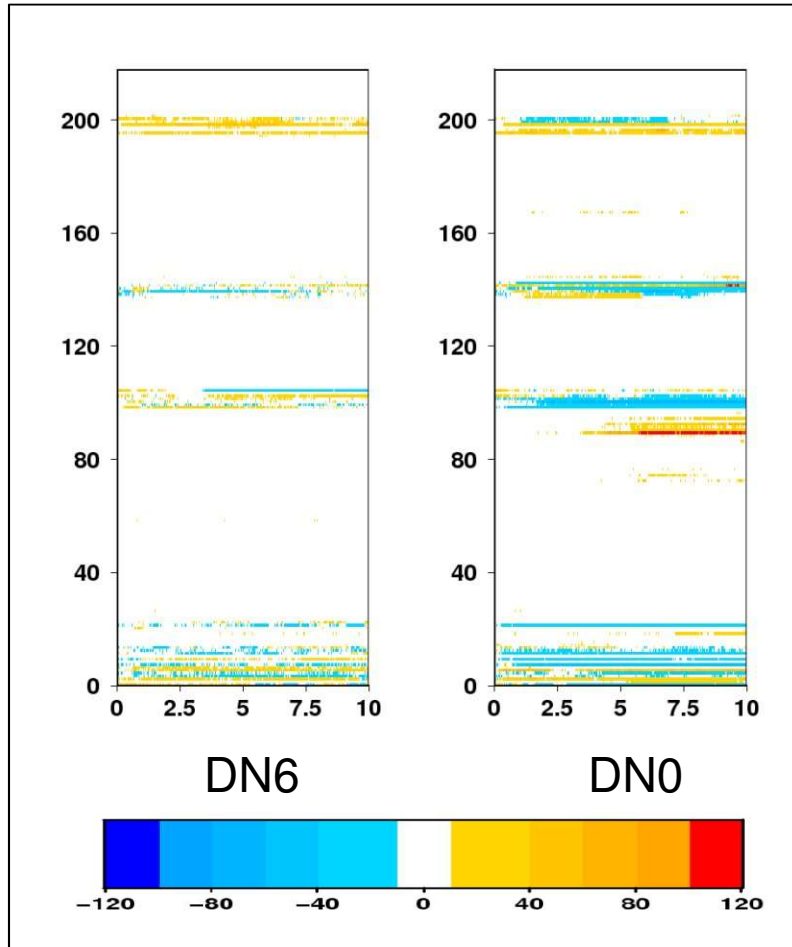
0 5 10 15 20 25 30

Distance (Å)

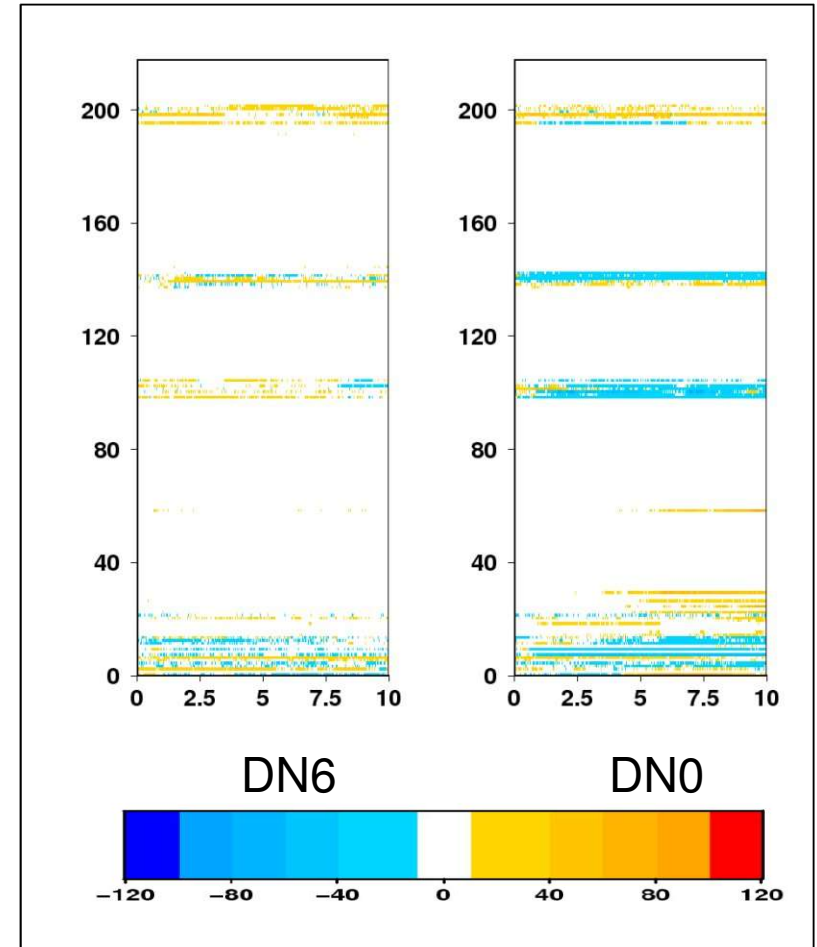
Modèles d'interaction



Dimères *cis* – Surface d'interaction



Monomère A



Monomère B

Destruction de l'interface au niveau des sites de fixation des Ca^{2+}

Calculs MM-PBSA

- ▶ Extraction de 500 structures protéiques (eau et contre-ions exclus) sur les 5 dernières ns de chaque simulation
- ▶ Calcul de l'enthalpie :
 - Paramètres parm99
 - Rayons "mbondi" pour le calcul de g_{solv}
 - Moyenne sur les 500 snapshots
- ▶ Calcul d'entropie :
 - 10 snapshots extraits des 5 dernières nanosecondes
 - Entropie vibrationnelle : calcul de modes normaux avec un solvant
= 4r
 - Entropie rotationnelle et translationnelle : formules de thermodynamique statistique
 - Moyenne sur les 10 snapshots
- ▶ $G = (H_{\text{dim}} - TS_{\text{dim}}) - 2 \times (H_{\text{mon}} - TS_{\text{mon}})$

Calculs MM-PBSA

Avec Ca^{2+}

	DN6	C3	ca
H_{int}	8665.5	4340.4	-15.3
H_{vdW}	-1504.5	-700.8	-102.9
G_{elec}	-20115	-10078.9	42.8
G_{surf}	114.2	61.5	-8.8
H_{tot}	-12839.7	-6377.8	-84.1
-TS	-4794.3	-2424.6	54.9
G_{tot}	-17634	-8802.4	-29.2

Sans Ca^{2+}

	DN0	C0	0
H_{int}	8639.6	4307.5	24.6
H_{vdW}	-1506.2	-737.7	-30.8
G_{elec}	-17787.7	-8948.7	109.7
G_{surf}	123.5	63.4	-3.3
H_{tot}	-10530.8	-5315.6	100.4
-TS	-4783.2	-2415.7	48.2
G_{tot}	-15314	-7731.3	148.6

Déformations intra-monomériques

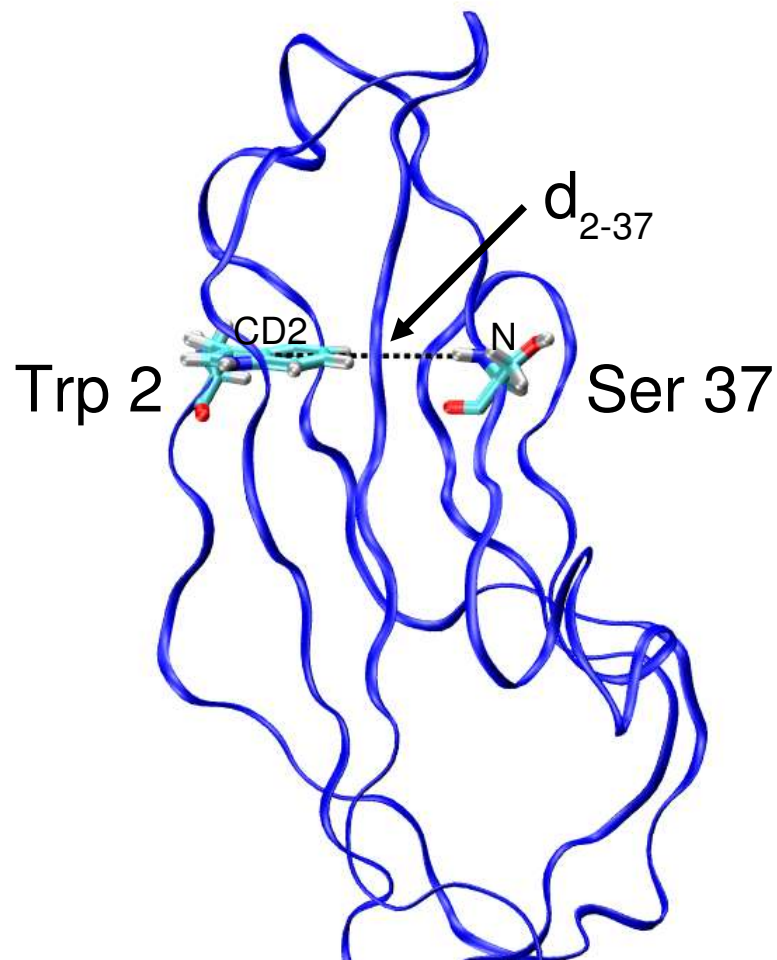
Simulation	Pliure (°)	Torsion (°)
monomère	137 ± 6 (154)	-18 ± 9 (-16)
dimère <i>BN</i>	138 ± 7 (154) 147 ± 5 (154)	-16 ± 6 (-16) -15 ± 7 (-16)
dimère <i>BE</i>	141 ± 7 (148) 134 ± 9 (148)	-18 ± 8 (-21) -19 ± 8 (-21)
dimère <i>décalé</i>	138 ± 8 (154) 152 ± 9 (154)	-29 ± 9 (-16) -17 ± 9 (-16)

Dimères : Spécificité des interactions

Dimères : Spécificité des interactions

- ▶ Interface *BE* peu spécifique (identique pour E- et C-cadhérines)
- ▶ Interfaces *BN* et *décalée* plus spécifiques

Mécanisme d'échange de brins

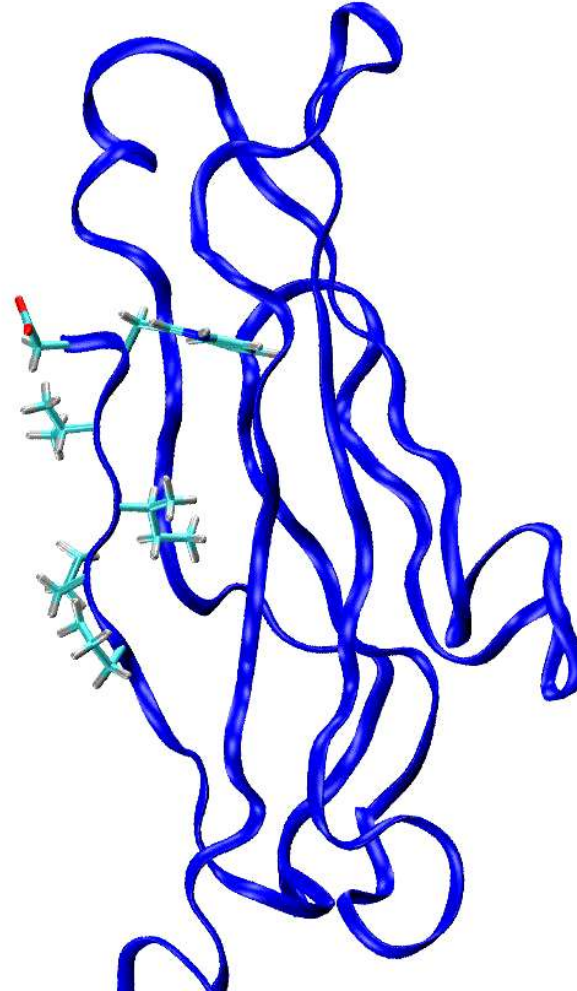


- ▶ Augmentation de d_{2-37} en dynamique moléculaire par pas successifs

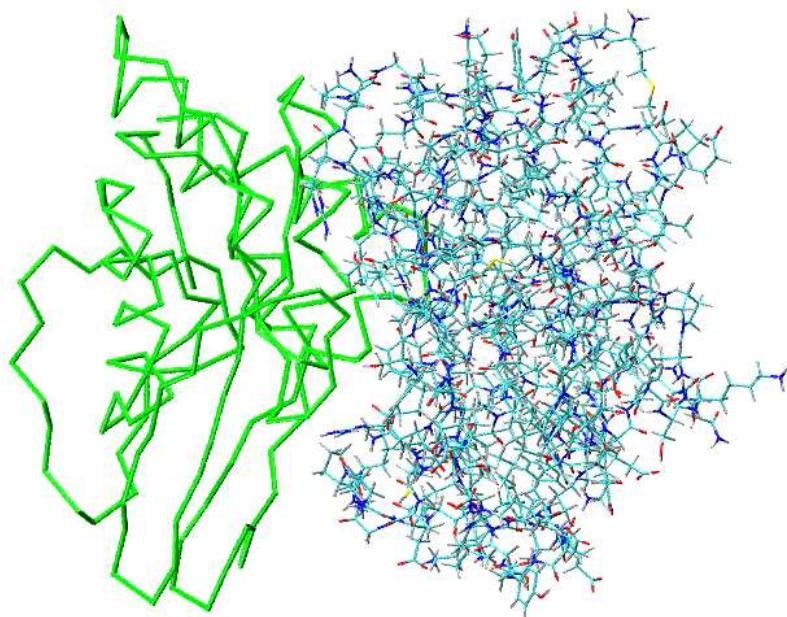
- ▶ Contrainte harmonique de distance :

$$E_p = k (d_{2-37} - d_0)^2$$

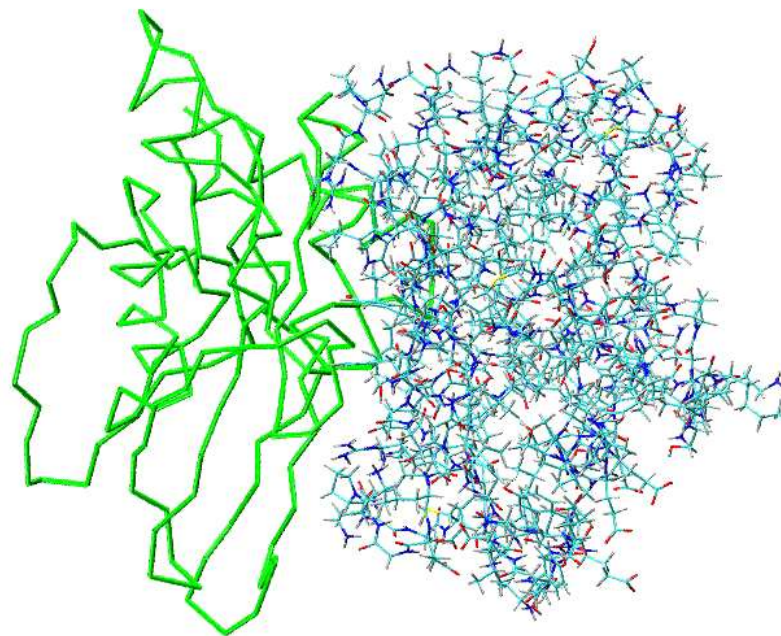
Retrait du Trp 2 de la poche hydrophobe



Dynamique MM/CG

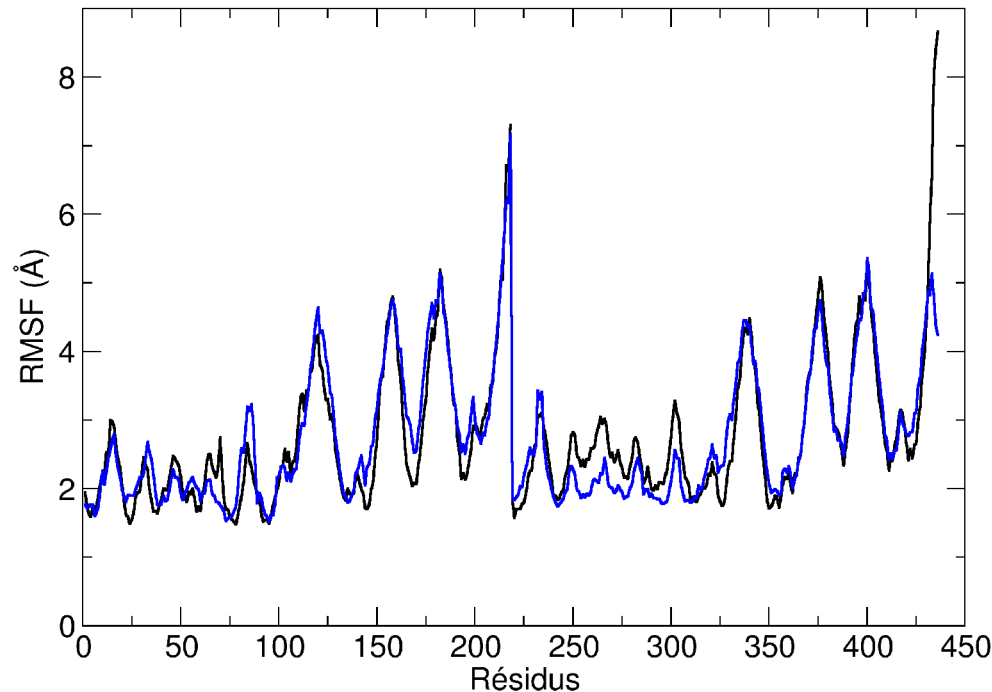


Simulation "tout atome"



Simulation MM/CG

Premiers résultats sur les cadhérines



"Tout-atome"

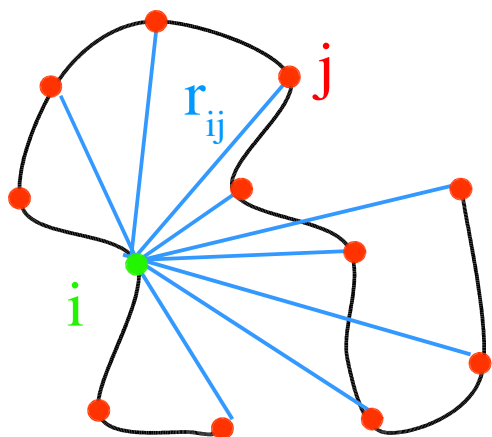
MM / CG

Fluctuations globalement bien reproduites
avec le modèle MM/CG ($r=0,90$)

Pourquoi et comment ?

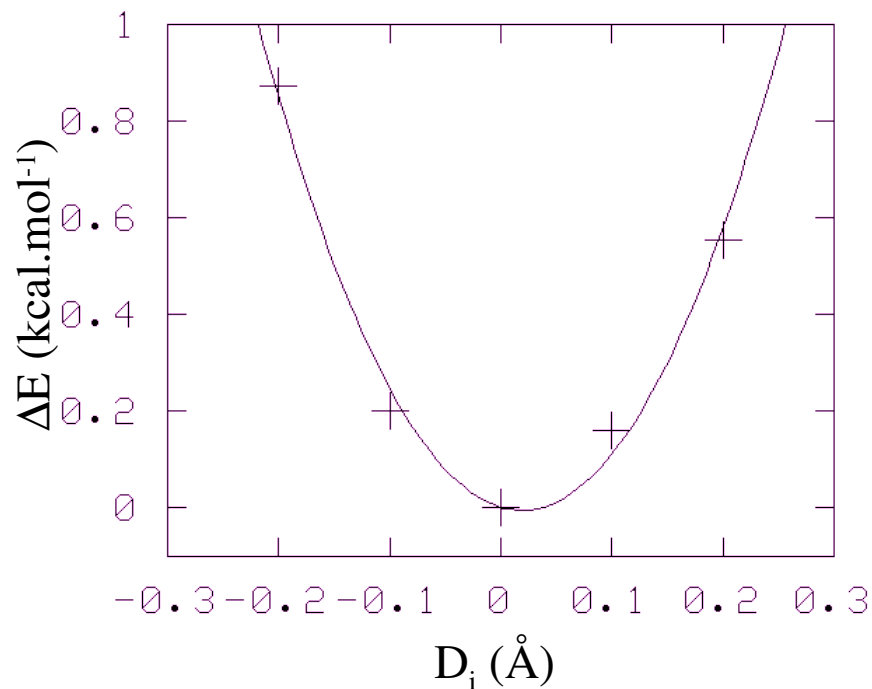
- ▶ Limitation des facteurs de Debye-Waller :
 - Mouvements de faible amplitude
 - Dominés par l'empaquetage
- ▶ Difficulté de mesurer la rigidité à l'échelle du résidu
- ▶ Principe : Déformer la protéine pour tester sa résistance

Minimisation d'énergie sous contrainte



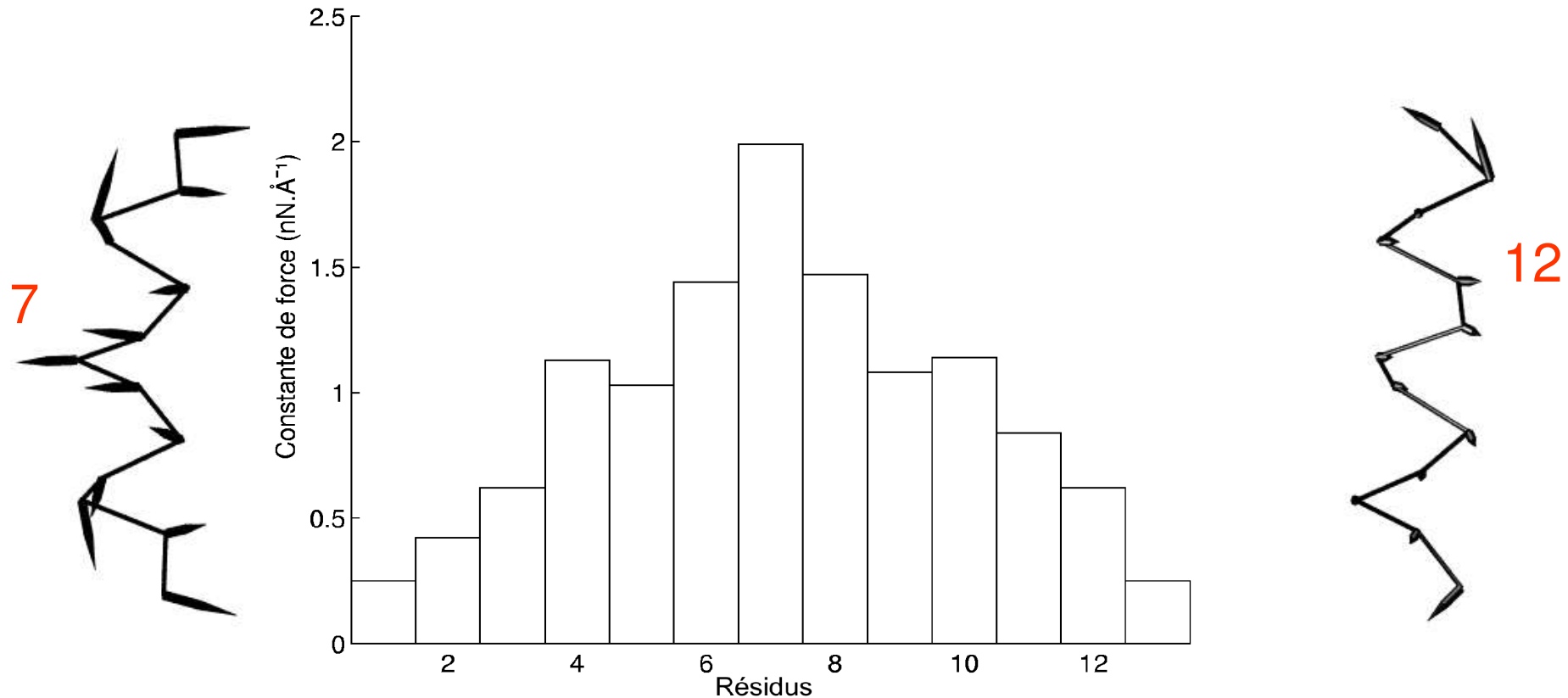
$$D_i = \sum_{j \neq i-1, i, i+1} \frac{r_{ij}}{N-3}$$

$$E_{pen} = k \times (D_i - (D_i^0 + \Delta D))^2$$



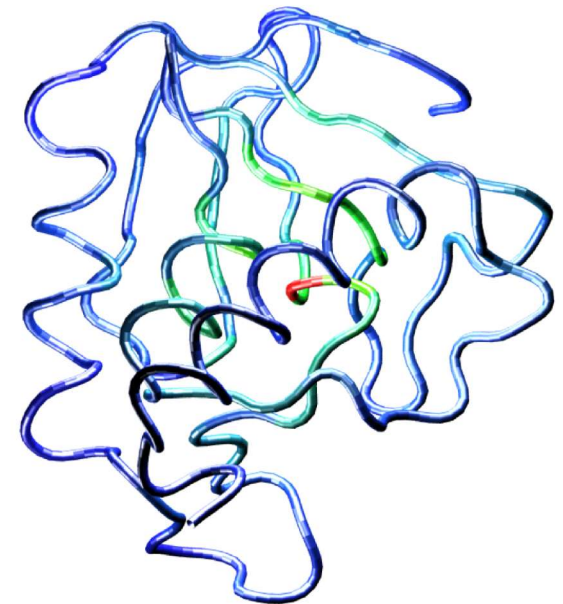
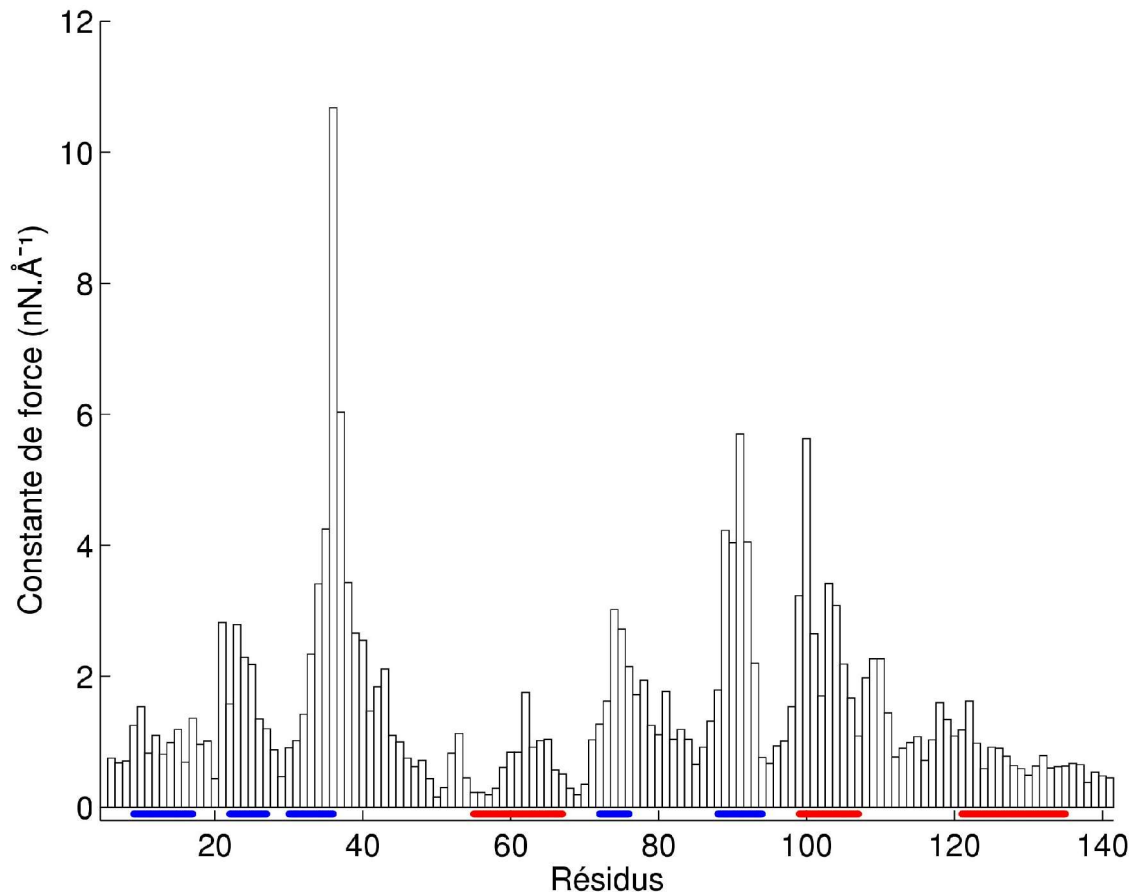
$$E = k_i D_i^2 + a_1 D_i + a_0$$

Flexibilité d'une hélice α



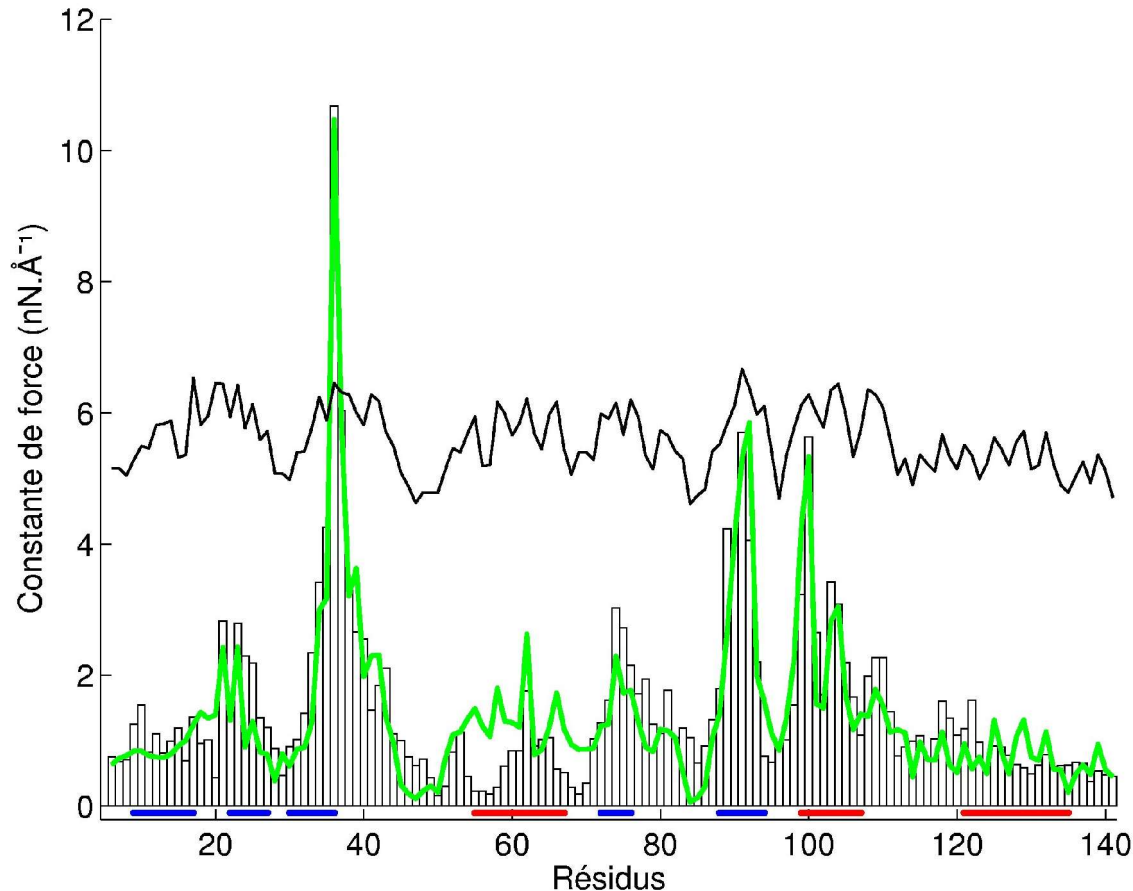
- ▶ Rigidité supérieure au centre de l'hélice
- ▶ Déformation dépendante du point d'application de la contrainte

Étude de la nucléase de staphylocoque



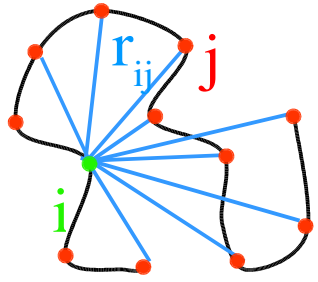
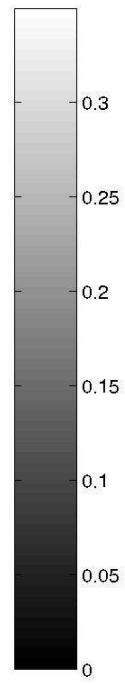
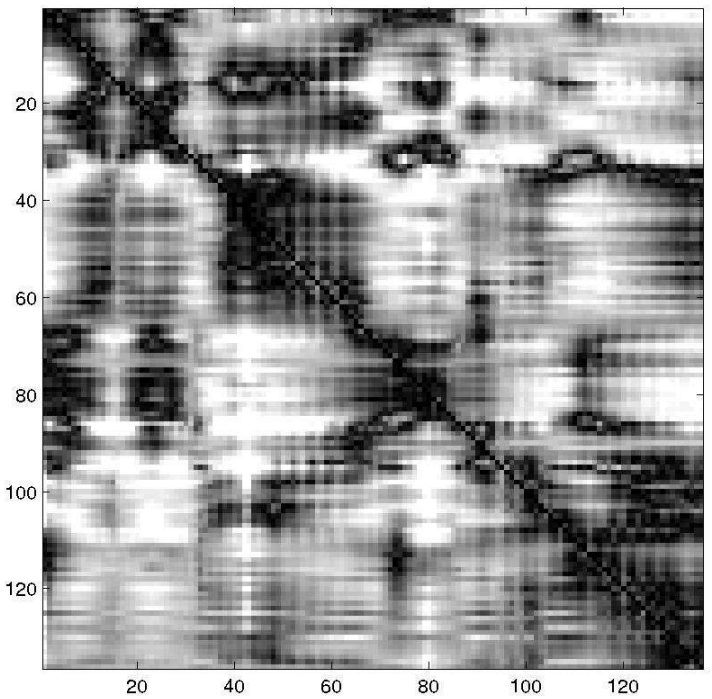
- ▶ Zones rigides situées au cœur de la protéine
- ▶ Pas de corrélation claire avec les structures secondaires

Nucléase de staphylocoque (SNase)

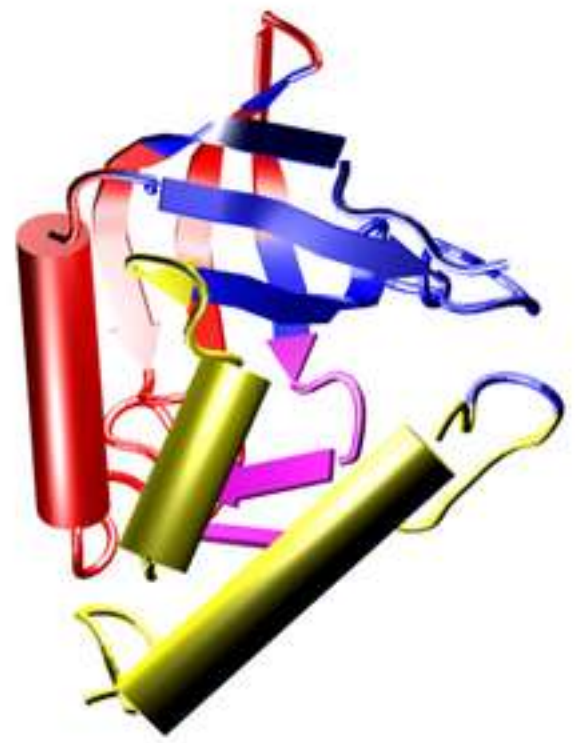


- ▶ Profil des constantes de force bien reproduit avec un modèle élastique
- ▶ Meilleur contraste qu'avec les facteurs de Debye-Waller

Domaines mécaniques



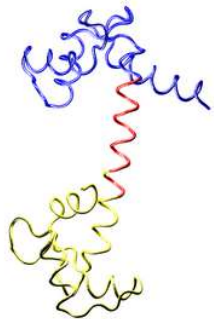
Matrice $|\Delta r_{ij}|$



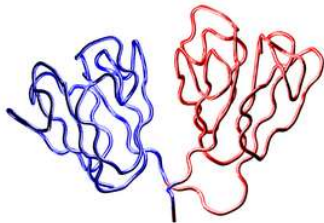
Domaines mécaniques de SNase

Domaines mécaniques

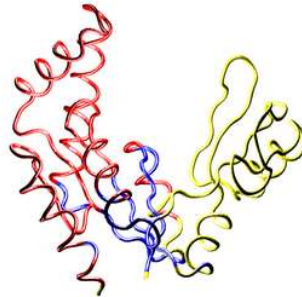
calmoduline
(144 résidus)



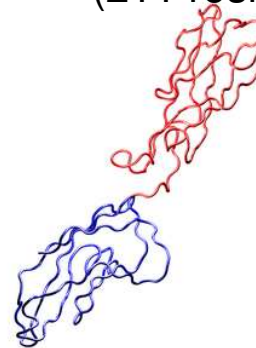
γ B-crystalline
(174 résidus)



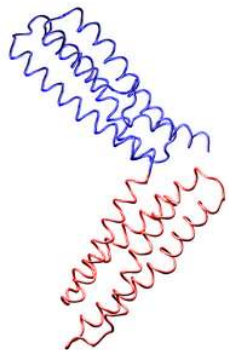
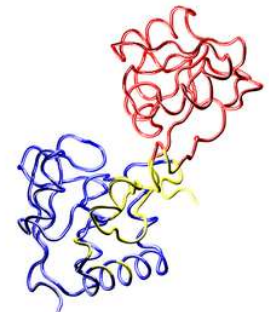
guanylate kinase
(186 résidus)



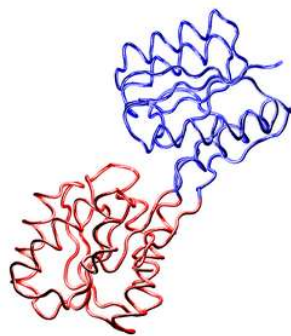
E-cadhérine (M)
(211 résidus)



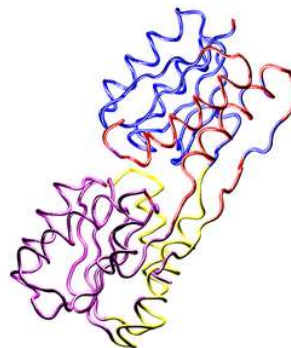
LAO
(238 résidus)



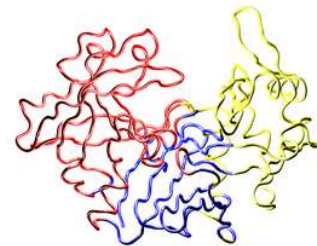
α -caténine
(255 résidus)



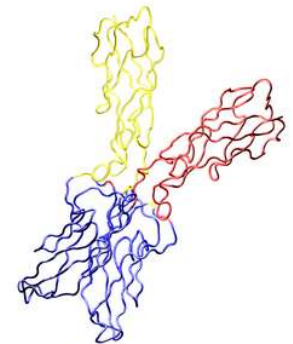
DRBP (o)
(271 résidus)



DRBP (f)
(271 résidus)



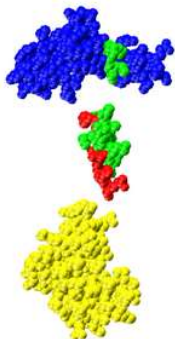
pepsine
(326 résidus)



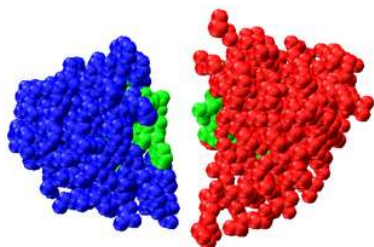
E-cadhérine (BN)
(422 résidus)

Position des résidus rigides

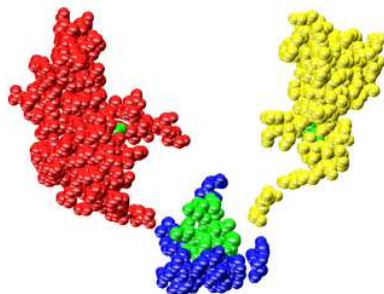
calmoduline
(144 résidus)



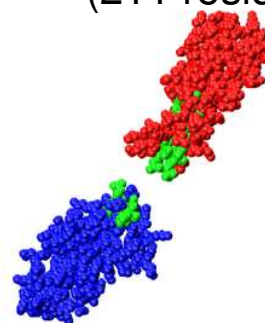
γ B-crystalline
(174 résidus)



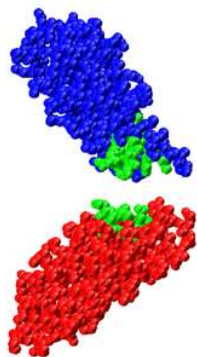
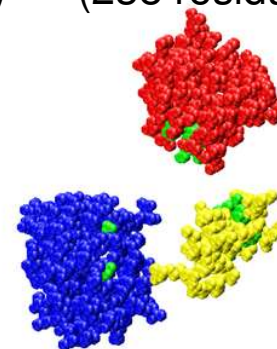
guanylate kinase
(186 résidus)



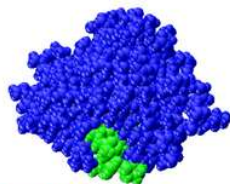
E-cadhérine (M)
(211 résidus)



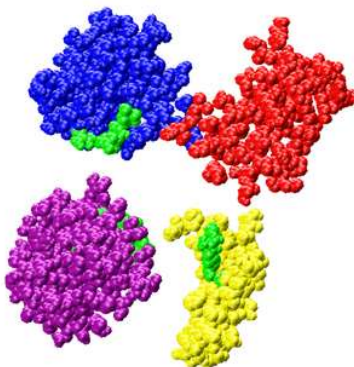
LAO
(238 résidus)



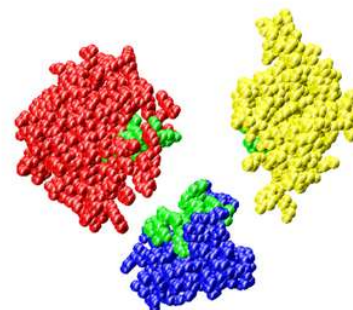
α -caténine
(255 résidus)



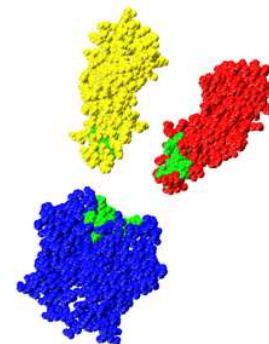
DRBP (o)
(271 résidus)



DRBP (f)
(271 résidus)



pepsine
(326 résidus)



E-cadhérine (BN)
(422 résidus)

Résidus rigides situés à l'interface entre les domaines

Conclusions

- ▶ Mesure de la flexibilité des protéines à l'échelle du résidu
- ▶ Définition de domaines mécaniques
- ▶ Positionnement des résidus rigides à l'interface entre les domaines
- ▶ Représentation tout-atome / simplifiée