

Ragousandirane Radjasandirane & Alexandre G. de Brevern

Université Paris Cité and Université de la Réunion and Université des Antilles, INSERM, BIGR, DSIMB Bioinformatics Team, F-75014 Paris, France

Résumé

La thrombocytémie essentielle (TE) est un cancer du sang. La TE se caractérise par une surproduction de plaquettes qui peut entraîner des thromboses. Cette surproduction de plaquettes se produit dans les mégacaryocytes par le biais d'une voie de signalisation qui pourrait impliquer les protéines JAK2, MPL ou la Calréticuline (CALR). CALR est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique (RE) et qui fixe le calcium. Chez 25-30% des patients atteints de TE, des mutations sont détectées sur l'exon 9 de CALR, ce qui permet aux variants de CALR (CALRm) de quitter le RE et de se fixer, sous forme dimérique, au récepteur MPL activant ainsi la surproduction des plaquettes et induisant la TE. Ces variants ont été initialement classés en trois types (type-I, type-II et autre). Par approches bioinformatiques, nous avons précédemment reclassé ces variants en cinq classes, de A à E; les classes A et B sont les plus fréquentes chez les patients atteints de TE. Dans cette étude, nous analysons les propriétés dynamiques de ces cinq classes en utilisant des modèles structuraux du domaine C de CALR à l'aide de simulations de dynamique moléculaire avec pour objectif de mettre en lumière la potentielle pathogénicité de chaque classe. Les résultats montrent que leurs dimères ne peuvent être stables que si un pont disulfure est formé, sinon les deux monomères se repoussent l'un l'autre du fait des charges électrostatiques. Les classes D et E ne peuvent pas être stables en tant que dimères en raison de l'absence de ponts disulfures. La classe E et CALRwt ont des propriétés dynamiques similaires. Ces résultats suggèrent que la liaison disulfure nouvellement formée dans les classes A, B et C doit être indispensable pour la pathogénicité de ces variants. Ils soulignent également que la classe E pourrait ne pas être directement liée à l'ET mais correspond à un polymorphisme humain.

CALRwt et les 5 classes de CALRm

➤ CALRwt

Absence de cystéines → Pas de possibilité de créer des ponts disulfures

Présence du motif KDEL → Retenu dans le RE

➤ Classe A (96 % type-I), B (64 % type-II), C (principalement type autre)

Séquences modifiées par une mutation **frameshift**

Présence de cystéines dans leurs séquences → Possibilité de se **dimériser via des ponts disulfures**

Perte du motif KDEL → Ne sont plus retenus dans le RE et peuvent potentiellement **se fixer à MPL**

➤ Classe D (4 % type-I, 8 % type-II, 5,6 % type autre)

Séquences modifiées par une mutation **frameshift**, les séquences sont beaucoup plus courtes

Absence de cystéines → Pas de possibilité de créer des ponts disulfures

Perte du motif KDEL → N'est plus retenu dans le RE et peut potentiellement **se fixer à MPL**

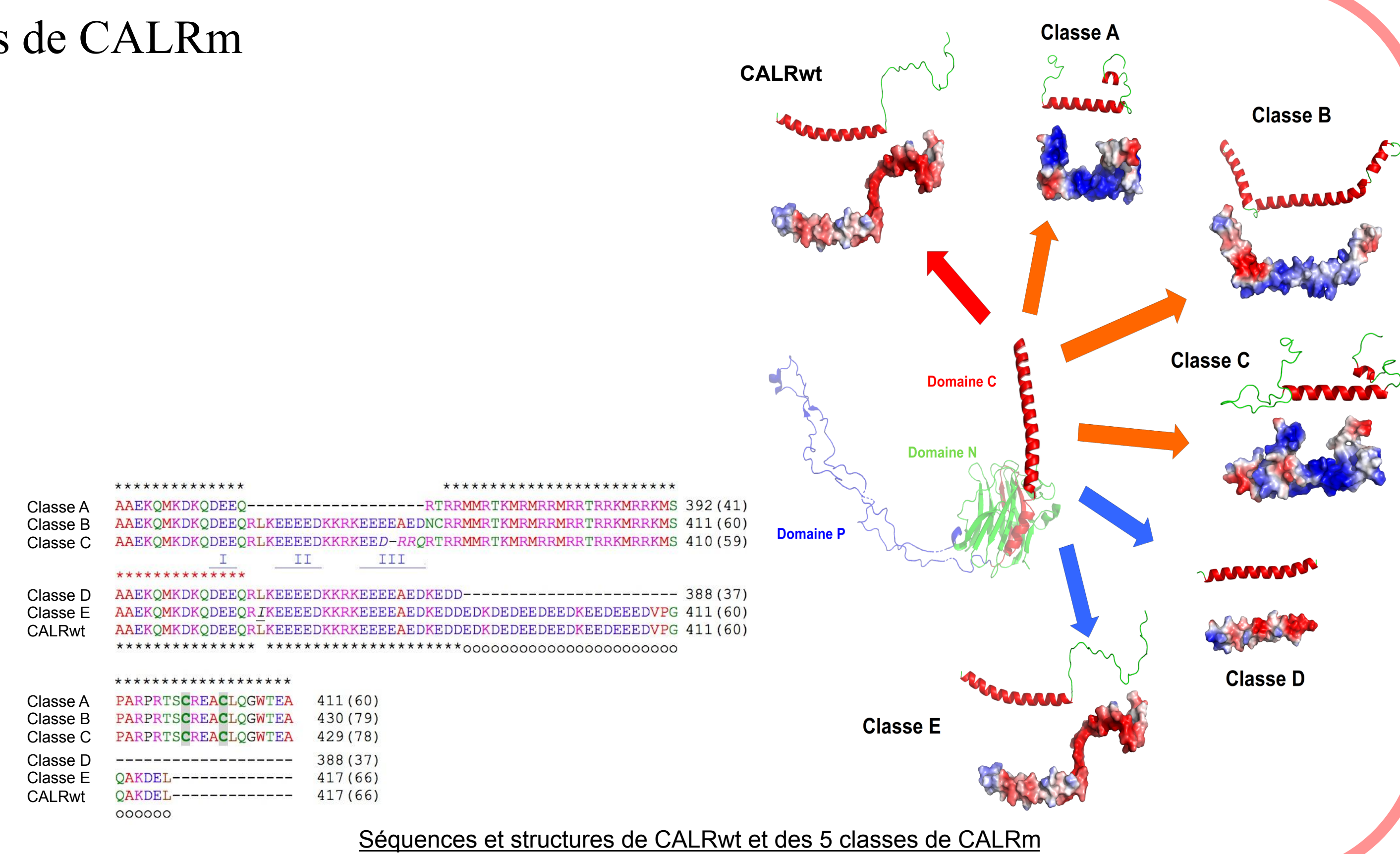
➤ Classe E (3,7 % type-II, 3,7 % type autre)

Correspond à CALRwt avec une **mutation ponctuelle**

Absence de cystéines → Pas de possibilité de créer des ponts disulfures

Présence du motif KDEL → Devrait être retenu comme CALRwt dans le RE

CALRwt et les 5 classes de CALRm

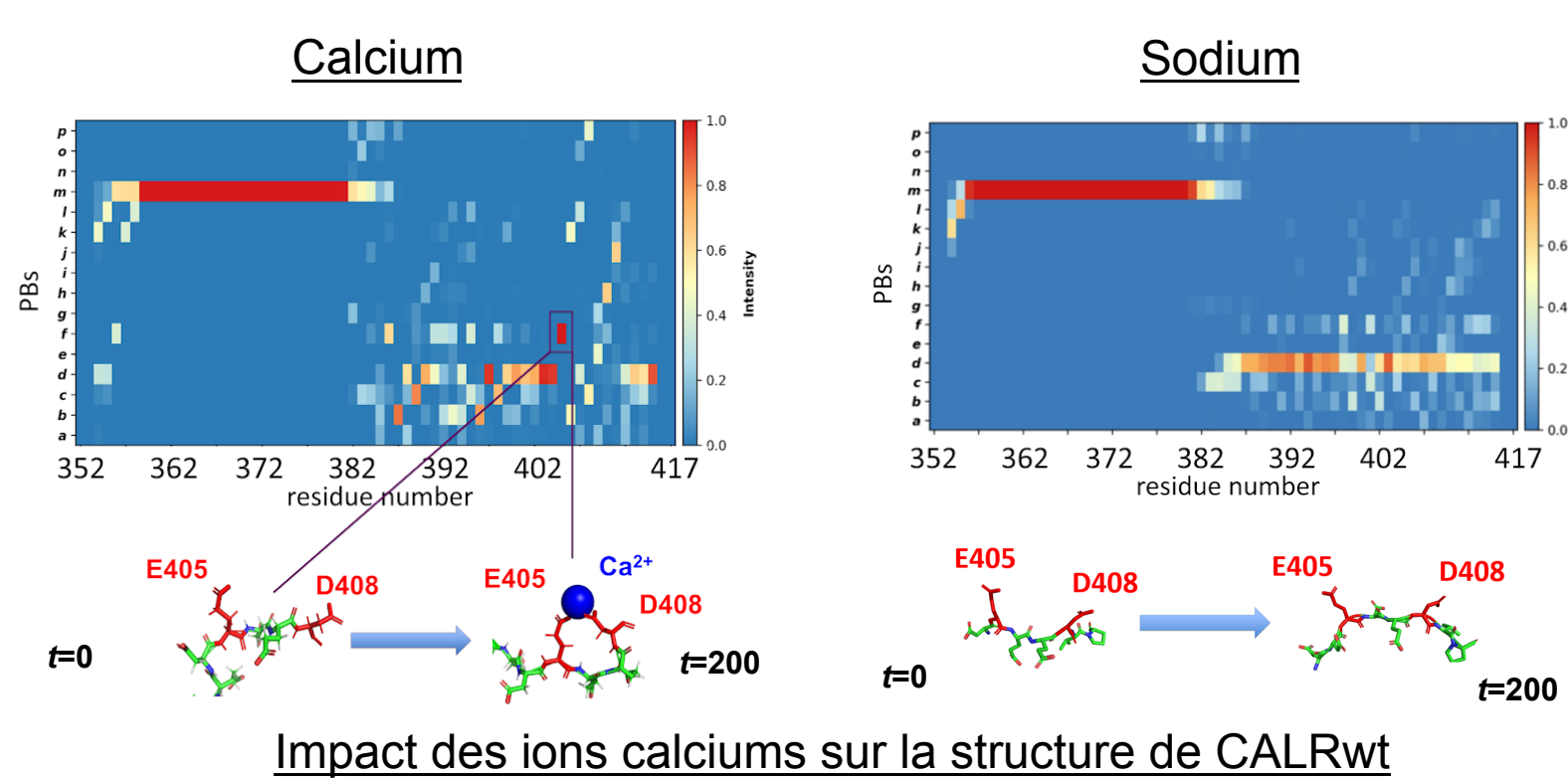


Séquences et structures de CALRwt et des 5 classes de CALRm

Dynamique des monomères CALRwt et CALRm classe E

➤ CALRwt fixe les calciums qui apportent des contraintes structurales locales (visibles à l'aide des Blocs Protéiques)

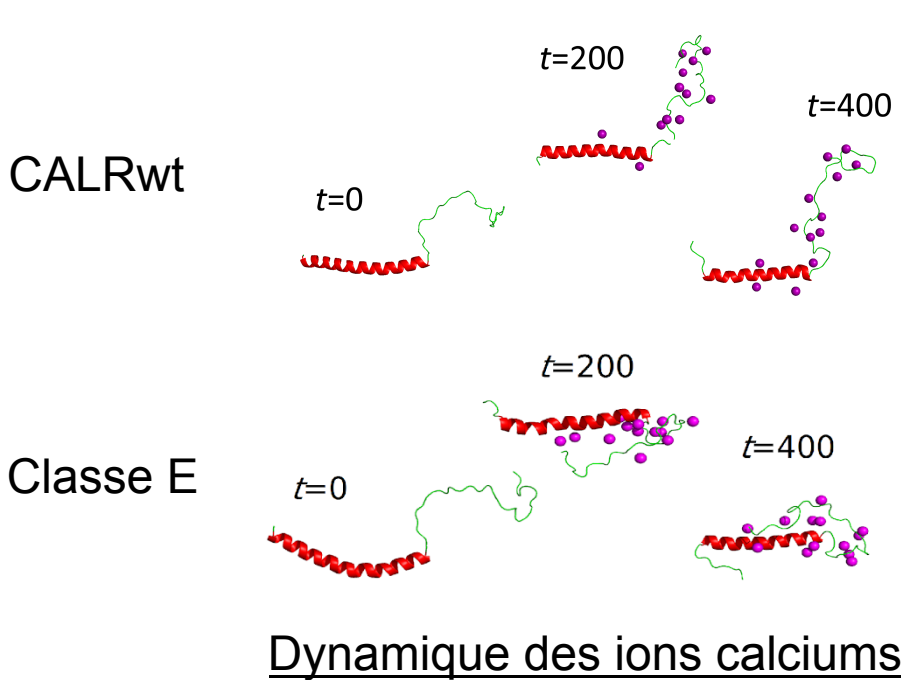
➤ Pas de fixation du sodium, comme attendu



Impact des ions calciums sur la structure de CALRwt

➤ CALRm classe E possède des sites de fixation au calcium similaires à ceux de CALRwt

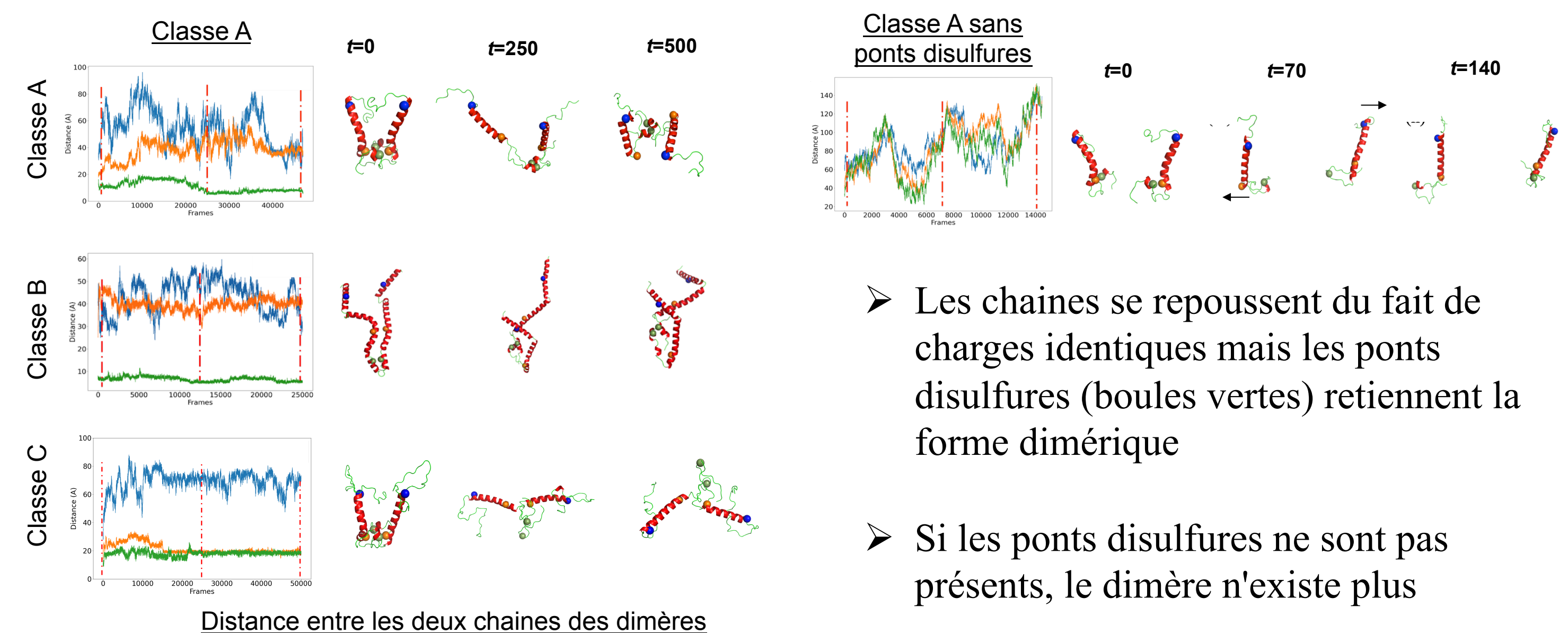
➤ Comportement dynamique similaire entre CALRwt et CALRm classe E



Dynamique des ions calciums

➔ **Protocole correct. CALRm classe E a une dynamique similaire à CALRwt.**

Dimérisation de CALRm classe A, B et C

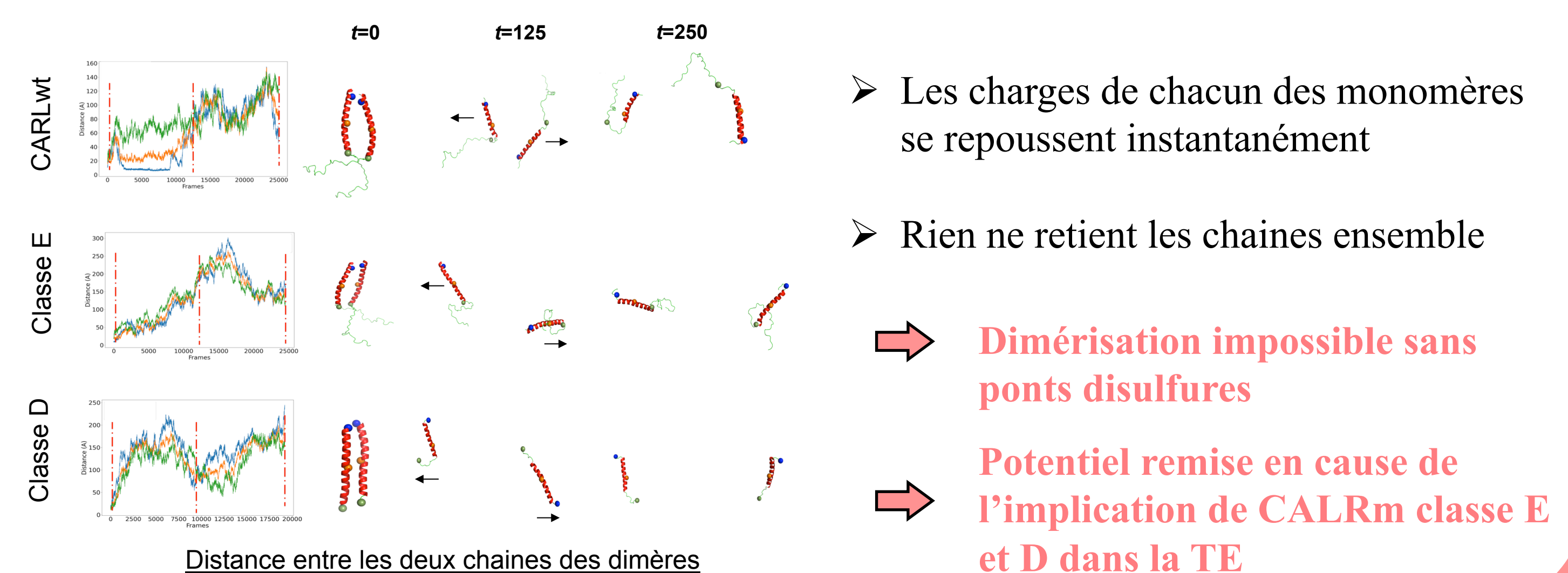


➤ Les chaînes se repoussent du fait de charges identiques mais les ponts disulfures (boules vertes) retiennent la forme dimérique

➤ Si les ponts disulfures ne sont pas présents, le dimère n'existe plus

➔ **Ponts disulfures indispensables pour la dimérisation des CALRm classe A, B et C**

Dimérisation de CALRwt, CALRm classe E et D



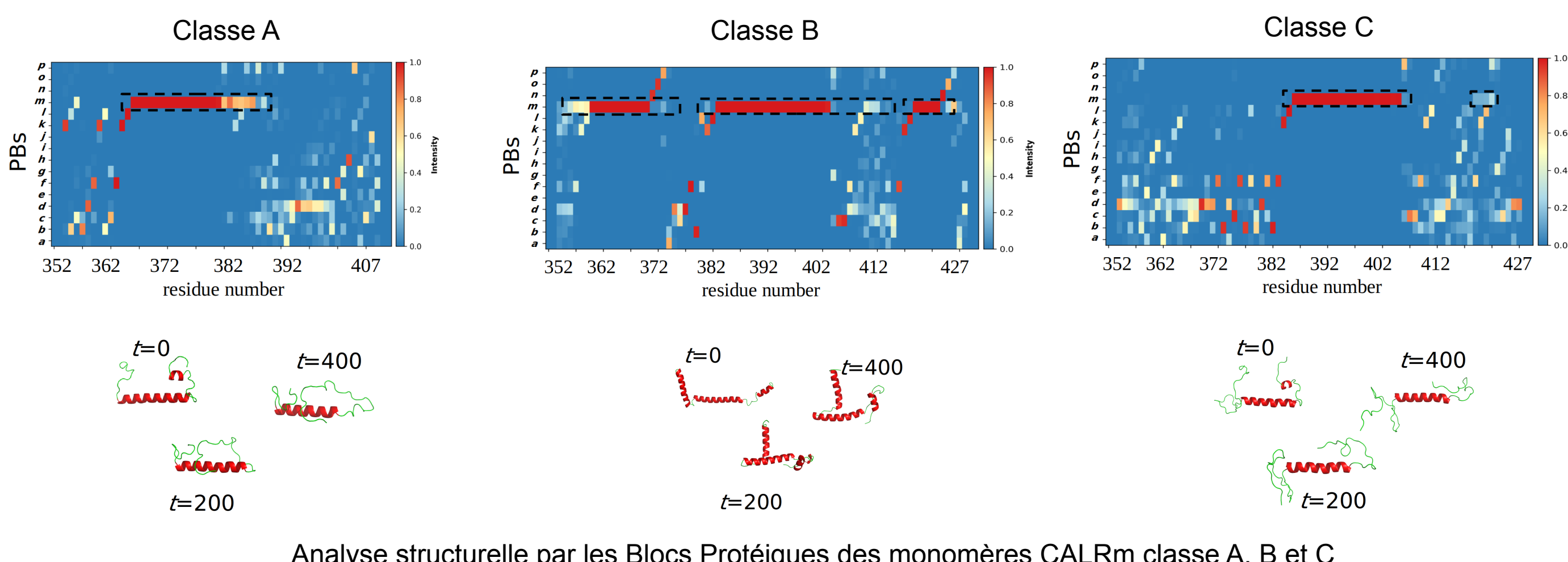
➤ Les charges de chacun des monomères se repoussent instantanément

➤ Rien ne retient les chaînes ensemble

➔ **Dimérisation impossible sans ponts disulfures**

➔ **Potentiel remise en cause de l'implication de CALRm classe E et D dans la TE**

Dynamique des monomères CALRm classe A, B et C



Analyse structurale par les Blocs Protéiques des monomères CALRm classe A, B et C

➤ Le type I classique a été utilisé comme prototype de la classe A, et celui du type II pour la classe B

➤ Déstructuration des extrémités des hélices qui sont très flexibles

➤ La classe B a 3 hélices et semble plus stable localement que les classes A et C (avec une région désordonnée entre la seconde et la troisième hélice)

➤ La classe C a une hélice assez stable avec des conformations locales particulières et de larges régions désordonnées

➔ **Dynamiques différentes entre les classes A, B et C**

Conclusion:

- La classification en 5 classes permet de mieux appréhender les variants de CALR
- Les classes A, B et C peuvent rester sous forme dimérique si leurs ponts disulfures sont présents (sinon, la forme dimérique est perdue)
- Les classes E et D ne sont pas stables sous forme dimériques et ne sont potentiellement pas impliquées dans la thrombocytémie essentielle

Remerciements

Ce travail a été financé par des subventions du Ministère de la Recherche (France), de l'Université Paris Cité (anciennement Université Paris Diderot, Sorbonne, Paris Cité, France et anciennement Université de Paris), de l'Université de la Réunion, de l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS, France), de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France), IdEx ANR-18-IDEX-0001, et du labex GR-Ex. Le labex GR-EX, référence ANR-11-LABX-0051, est financé par le programme "Investissements d'avenir" de l'Agence Nationale de la Recherche, référence ANR-11-IDEX-0005-02.

Références

- Chuzi, S.; Stein, B.L. Essential thrombocythemia: A review of the clinical features, diagnostic challenges, and treatment modalities in the era of molecular discovery. *Leuk. Lymphoma* 2017, 58, 2786-2798.
- Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M.J.; Le Beau, M.M.; Bloomfield, C.D.; Cazzola, M.; Vardiman, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016, 127, 2391-2405.
- Klampfl, T. et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 2013, 369, 2379-2390.
- Cabagnols, X.; Defour, J.-P.; Ugo, V.; Ianotto, J.C.; Mossuz, P.; Mondet, J.; Girodon, F.; Alexandre, J.H.; Mansier, O.; Viillard, J.F.; et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: Relevance for disease evolution. *Leukemia* 2015, 29, 249-252.
- El Jahrani, N.; Cretin, G.; de Brevern, A.G. CALR-ETdb, the database of calreticulin variants diversity in essential thrombocythemia. *Platelets* 2022, 33, 157-167.
- Venkatesan, A.; Geng, J.; Kandar, M.; Wijeyesakere, S.; Bhide, A.; Talpaz, M.; Pogosheva, I.; Raghavan, M. MPN-274: Mpl is Activated by Dimers of MPN-Linked Calreticulin Mutants Stabilized by Disulfide Bonds and Ionic Interactions. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2020, 20, S335.
- Radjasandirane, R.; de Brevern, A.G. Structural and Dynamic Differences between Calreticulin Mutants Associated with Essential Thrombocythemia. *Biomolecules* 2023, 13, 509.