

Abréviations

3HB	« <i>Three Helix Bundle</i> » ou triple faisceau d'hélices
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
CaM	Calmoduline
CBD	« <i>Cargo Binding Domain</i> » ou domaine de liaison aux cargos
DT	« <i>Distal Tail</i> » ou queue distale
DLS	« <i>Dynamic light Scattering</i> » ou diffusion dynamique de la lumière
ELC	« <i>Essential Light Chain</i> » ou chaîne légère essentielle
F-actine	Actine filamenteuse
FL	« <i>Full length</i> » ou protéine entière
kDa	kiloDalton
LI	« <i>Large Insert</i> » ou grand insert
MALS	« <i>Multiangle Light Scattering</i> » ou diffusion de la lumière à plusieurs angles
MD	« <i>Motor Domain</i> » ou domaine moteur de myosine
MM	Masse moléculaire
MST	« <i>Microscale Thermophoresis</i> » ou Thermophorèse à micro-échelle
Pi	Phosphate inorganique
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PPS	État Pre-Powerstroke. Le « <i>powerstroke</i> » est le réarrangement structural de la myosine lorsqu'elle est liée à l'actine qui permet de relâcher les produits d'hydrolyse en rebasculant le bras de levier et en produisant de la force.
PR	État Post-rigueur
PTD	« <i>Proximal Tail Domain</i> » ou queue proximale
Rg	Rayon de giration
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAH	« <i>Single Alpha Helix</i> »
SAXS	« <i>Small-angle X-ray Scattering</i> » ou diffusion des rayons X aux petits angles
SEC	« <i>Size-exclusion chromatography</i> » ou Chromatographie d'exclusion stérique. Peut être couplée au MALS (SEC-MALS) et au SAXS (SEC-SAXS).
SI	« <i>Small Insert</i> » ou petit insert
Ub	Ubiquitine (di-Ub : di-ubiquitine)
WT	« <i>Wild type</i> » ou sauvage

Sommaire

Table des figures	8
Table des tableaux	10

CHAPITRE 1 : Contrôle de l'activité de la myosine VI par ses partenaires cellulaires..... **11**

1.I Introduction	11
1.I.1 Les moteurs cytosquelettiques	11
1.I.2 Les myosines	13
1.I.3 La myosine VI	17
1.I.3.1 - Caractéristiques et structure de la myosine VI.....	17
1.I.3.1.1 - La tête de la myosine VI.....	18
1.I.3.1.2 - Le bras de levier.....	19
1.I.3.1.3 - La queue de la myosine VI	20
1.I.3.2 - Propriétés mécaniques et enzymatiques de la myosine VI	23
1.I.3.3 - Fonctions de la myosine VI.....	24
1.I.3.3.1 - Les partenaires de la myosine VI	26
1.I.3.3.1.1 - Partenaires RRL.....	27
1.I.3.3.1.2 - Partenaires WWY.....	30
1.I.3.3.1.3 - Ubiquitine.....	31
1.I.3.3.2 - La myosine VI et le cancer	33
1.I.3.4 - Régulation de l'activité de la myosine VI	35
1.I.3.4.1 - La dimérisation de la myosine VI.....	36
1.I.4 Objectifs	41
1.II Résultats et discussion	42
1.II.1 Identification et production de construits contenant le CBD de la myosine VI	43
1.II.1.1 - Généralités sur le CBD de la myosine VI	43
1.II.1.2 - Caractérisation biophysique des principaux construits contenant la queue de la myosine VI	44
1.II.1.2.1 - CBD-fin.....	44
1.II.1.2.2 - DT-fin.....	48
1.II.1.2.3 - SAH-fin	48
1.II.1.2.4 - 3HB-fin.....	49
1.II.2 Activation de la myosine VI	50
1.II.2.1 - Caractérisation de la forme inactive.....	50
1.II.2.2 - Analyse des interactions entre la tête et la queue de la myosine VI.....	53
1.II.2.2.1 - Le CBD ^C interagit avec la tête de la myosine VI	53
1.II.2.2.2 - La boucle β A- β B, principale responsable de l'interaction.....	56
1.II.2.2.3 - Des interactions supplémentaires entre le CBD ^N et la région IQ.....	56
1.II.2.3 - Cristallographie	57
1.II.2.4 - Microscopie	58
1.II.2.5 - Conclusion.....	58
1.II.3 Caractérisation de l'interaction entre la myosine VI et ses partenaires cellulaires	62
1.II.3.1 - GIPC1.....	62

1.II.3.1.1 - Identification et caractérisation du domaine d'interaction avec la myosine VI.....	63
1.II.3.1.2 - Caractérisation de l'interaction entre la myosine VI et GIPC1	67
1.II.3.1.2.1 - Analyse par MST de l'interaction	67
1.II.3.1.2.2 - Caractérisation de la surface d'interaction	69
1.II.3.1.2.3 - Production et caractérisation du complexe myosine VI-GIPC1	72
1.II.3.1.2.4 - La liaison à GIPC1 permet la dimérisation de la myosine VI.....	75
1.II.3.2 - Autres partenaires.....	81
1.II.3.2.1 - NDP52	81
1.II.3.2.1.1 - Identification et caractérisation des fragments interagissant avec la myosine VI	82
1.II.3.2.1.2 - Production et caractérisation du complexe myosine VI-NDP52	84
1.II.3.2.2 - Optineurine	84
1.II.3.2.2.1 - Identification et caractérisation des fragments interagissant avec la myosine VI	85
1.II.3.2.3 - TOM1	87
1.II.3.2.3.1 - Production et caractérisation des chimères myosine VI-TOM1	87
1.II.3.2.3.2 - Le CBD de la myosine VI interagit avec TOM1 et GIPC1	90
1.III - Conclusion.....	92
1.III.1 - La surprise à la fin	98
 CHAPITRE 2 : Les myosines MyTH4-FERM sont des moteurs polyvalents	
.....	103
2.I Introduction.....	103
2.I.1 Les myosines MyTH4-FERM	103
2.I.1.1 - Les myosines VII	105
2.II.1.1.1 - La myosine VIIa	106
2.II.1.1.2 - La myosine VIIb.....	107
2.II.1.1.3 - La myosine VII de Dictyostelium	107
 2.Projet a. Analyse de l'interaction entre les microtubules et les domaines MyTH4-FERM et sa conservation pendant l'évolution.....	108
2.IIa. Objectifs.....	108
2.IIIa. Résultats et discussion	108
 2.Projet b. Caractérisation des interactions entre la myosine VII et ses partenaires assurant la liaison entre les cadhérines et les filaments d'actine dans les microvillosités et les stéréocils	111
2.IIb. Objectifs	111
2.IIIb. Résultats et discussion	112
 CHAPITRE 3 : Modulation de l'activité des myosines par de petites molécules allostériques	
.....	114
3.I Introduction.....	114
3.I.1 Les myosines conventionnelles	114
3.I.1.1 - Le cycle de production de la force	115
3.I.2 La modulation de l'activité des myosines	117

3.I.2.1 - Blebbistatine.....	118
3.I.2.2 - Pentachloropseudilin et pentabromopseudilin	119
3.I.2.3 - Omecamtiv mecarbil	119
3.I.2.4 - 2,4,6-triiodophénol	120
3.Projet a. Inhibition de la myosine II de muscle lisse par CK-571.....	121
3.IIa. Objectifs.....	121
3.IIIa. Résultats et discussion	121
3.Projet b. Activation de la myosine cardiaque par Omecamtiv mecarbil.....	124
3.IIb. Objectifs	124
3.IIIb. Résultats et discussion	124
3.IV Discussion et Perspectives.....	126
Matériel et méthodes	128
1. Clonage, expression et purification des protéines.....	128
2. Cristallisation des protéines et résolution de la structure	129
3. MST.....	129
4. Analyse par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	130
5. Analyse par diffusion de la lumière à plusieurs angles (MALS).....	131
Références	132
Résumé	153
Annexes	154

Table des figures

Figure 1	Schéma simplifié représentant les moteurs cytosquelettiques et le transport de vésicules dans la cellule	12
Figure 2	Arbre phylogénétique des domaines moteurs des myosines	13
Figure 3	Organisation simplifiée d'une myosine	15
Figure 4	Cycle moteur d'une myosine	16
Figure 5	Mouvement de la myosine V sur un filament d'actine	16
Figure 6	Schéma représentant l'organisation de la myosine VI	17
Figure 7	Comparaison des structures du domaine moteur de la myosine VI (droite) et de la myosine V (gauche)	19
Figure 8	Bras de levier de la myosine VI	20
Figure 9	Schéma représentant les modifications et interactions au sein du CBD de la myosine VI	22
Figure 10	Structure RMN de la queue distale	22
Figure 11	Fonctions de la myosine VI	25
Figure 12	Effet des mutations sur le motif RRL pour l'interaction avec l'optineurine, GIPC1, NDP52 et T6BP	29
Figure 13	Le grand insert (LI) dans le CBD de la myosine VI cache le motif RRL	29
Figure 14	Dimérisation par Dab2	30
Figure 15	Différents types d'ubiquitination	32
Figure 16	2,4,6-triiodophénol (TIP), inhibiteur de l'activité ATPase de la myosine VI	34
Figure 17	Modèle de la myosine VI auto-inhibée	35
Figure 18	Deux modèles de dimérisation de la myosine VI	37
Figure 19	Modèle d'une myosine VI dimérique	38
Figure 20	Représentation schématique de la région proximale de la queue de la myosine VI	39
Figure 21	Fragments utilisés pour l'étude de la myosine VI	43
Figure 22	Le motif WWY est exposé	45
Figure 23	Le CBD de la myosine VI est monomérique	47
Figure 24	La queue de la myosine VI est monomérique	50
Figure 25	Modèle de la myosine VI auto-inhibée	52
Figure 26	Le CBD^c interagit avec la tête de la myosine VI	54
Figure 27	Auto-inhibition dans la famille des myosines non-conventionnelles	59
Figure 28	Conservation dans la famille GIPC	63
Figure 29	Le domaine C-terminale de GIPC1 adopte une structure avec quatre hélices compactes	65
Figure 30	Courbes MST représentatives pour la caractérisation de l'interaction entre GIPC et le CBD de la myosine VI	68
Figure 31	GIPC1 C-ter et Nab2 N-ter ont des structures très similaires	70
Figure 32	Analyse des surfaces du fragment GIPC1_{Ct}	71

Figure 33	Les différents membres de la famille GIPC sont recrutés dans différents endroits de la cellule	72
Figure 34	Cristaux obtenus avec le complexe GIPC1 _{Ct-ΔN} et CBD ^N co-purifiés chez <i>E. coli</i>	74
Figure 35	Modèle SAXS du complexe PTD ^C -fin + GIPC1 _{Ct-ΔN}	76
Figure 36	La queue proximale de la myosine VI	77
Figure 37	Modèle proposé pour la dimérisation via le SAH	78
Figure 38	Modèles d'un réseau myosine VI-GIPC1	79
Figure 39	Schéma représentant l'organisation de NDP52	81
Figure 40	NDP52 interagit avec le CBD de la myosine VI	83
Figure 41	NDP52 est dimérique en solution	83
Figure 42	Schéma représentant l'organisation d'optineurine	85
Figure 43	Schéma représentant l'organisation de TOM1	87
Figure 44	TOM1 _{Long} dimérise le CBD de la myosine VI en solution	89
Figure 45	Structure du complexe di-Ub K63 avec la partie N-ter du CBD ^N de la myosine VI	95
Figure 46	La di-ubiquitine K63 interagit avec la queue de la myosine VI	95
Figure 47	Optineurine dimérise la myosine VI FL	96
Figure 48	Structure du dimère GIPC1 52-fin	99
Figure 49	Structure du complexe myosine VI-GIPC1 _{Ct}	100
Figure 50	Organisation simplifiée des myosines MyTH4-FERM humaines	103
Figure 51	Protrusions cellulaires associées aux myosines MyTH4-FERM	104
Figure 52	Composants des microvillosités et des stéréocils	106
Figure 53	Filaments formés par la myosine II	114
Figure 54	Fragments utilisés pour l'étude des myosines II	115
Figure 55	Structure cristallographique du domaine moteur et du cou d'une myosine II	116
Figure 56	Cycle de production de force d'une myosine	117

Table des tableaux

Tableau 1	Caractérisation par MALS des fragments du CBD de la myosine VI	47
Tableau 2	Caractérisation par SAXS des fragments contenant le CBD de la myosine VI	47
Tableau 3	La myosine VI adopte une forme compacte en présence de $MgADP.VO_4$	52
Tableau 4	La tête de la myosine VI interagit avec le CBD	55
Tableau 5	Caractérisation par MALS des fragments GIPC	64
Tableau 6	Caractérisation par SAXS des fragments GIPC	64
Tableau 7	GIPC1 _{ct} interagit avec le CBD ^N	67
Tableau 8	Caractérisation de la surface de GIPC1 participant à l'interaction avec le CBD de la myosine VI	70
Tableau 9	La myosine VI interagit avec GIPC2 et GIPC3	72
Tableau 10	Caractérisation par MALS des complexes myosine VI-GIPC1	74
Tableau 11	Caractérisation par MALS des complexes plus longs entre la myosine VI et GIPC1	75
Tableau 12	Caractérisation par SAXS des complexes plus longs entre la myosine VI et GIPC1	75
Tableau 13	Caractérisation de la région de dimérisation de la myosine VI par SEC-MALS	77
Tableau 14	GIPC1 active l'activité ATPase de la myosine VI en présence d'actine	80
Tableau 15	L'interaction de GIPC1 avec la myosine VI est en compétition avec les interactions intramoléculaires qui stabilisent l'état auto-inhibé de la myosine VI	80
Tableau 16	Caractérisation de l'interaction entre NDP52 et la myosine VI	82
Tableau 17	Caractérisation de l'interaction entre optineurine et la myosine VI	85
Tableau 18	Caractérisation de l'interaction entre TOM1 et la myosine VI	88
Tableau 19	Caractérisation par SAXS des complexes avec TOM1	89
Tableau 20	Caractérisation de l'interaction entre TOM1, GIPC1 et la myosine VI	90

CHAPITRE 1 : Contrôle de l'activité de la myosine VI par ses partenaires cellulaires

1.1 Introduction

1.1.1 Les moteurs cytosquelettiques

Dans toutes les cellules ont lieu des processus impliquant une motilité intracellulaire, par exemple dans le déplacement des vésicules et des organites, la mise en place des compartiments membranaires et la cytokinèse. La force mécanique nécessaire pour réaliser ces fonctions peut être générée de diverses façons. Une des plus importantes correspond aux moteurs cytosquelettiques capables d'assurer de nombreuses fonctions de motilité. Ces moteurs moléculaires se déplacent le long du cytosquelette en transformant l'énergie chimique obtenue par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique, grâce à des changements conformationnels.

Trois types de moteurs cytosquelettiques ont été décrits jusqu'à présent : les kinésines et les dynéines, qui se déplacent le long des microtubules ; et les myosines, qui s'associent aux microfilaments d'actine (F-actine) (Akhmanova and Hammer III, 2010). Selon un modèle simple du trafic intracellulaire, les microtubules, longs ($>25\ \mu\text{m}$) et organisés radialement dans la cellule (**figure 1**), permettent le trafic rapide à longue distance entre la périphérie et le noyau. Du fait de leur taille ($<1\ \mu\text{m}$) et leur disposition en réseau, les microfilaments d'actine assurent le trafic local, plus lent, entre les microtubules et les divers compartiments de la cellule, notamment la membrane plasmique (Langford, 1995). Les microtubules et les microfilaments d'actine sont des structures polarisées : elles possèdent une extrémité positive (à croissance rapide) et une négative (à croissance lente). Cette polarisation définit le sens du mouvement des moteurs moléculaires, car la plupart des kinésines et des myosines se déplacent vers le pôle positif, alors que toutes les dynéines étudiées se dirigent vers le pôle négatif (Langford, 1995). La collaboration entre ces deux systèmes permet le transport de vésicules et d'autres cargos à un endroit précis et à un moment donné (Gross et al., 2002; Tabb et al., 1998).

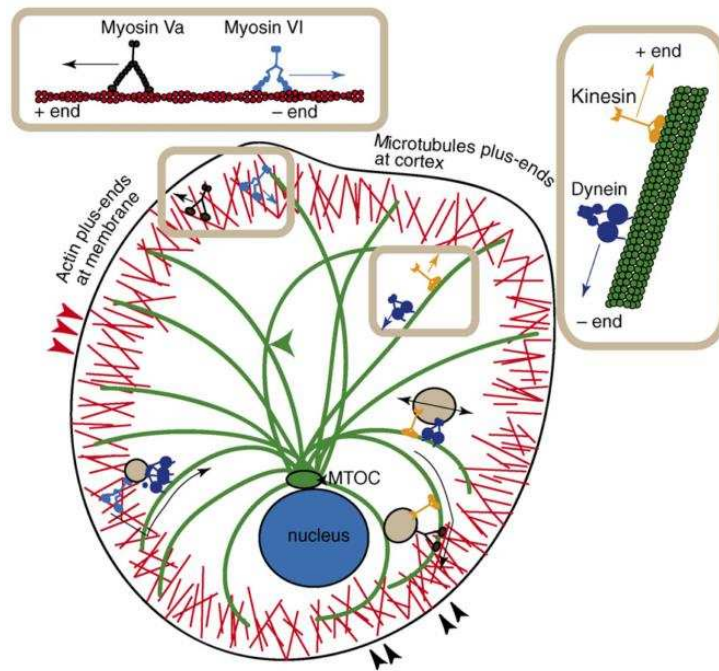


Figure 1 - Schéma simplifié représentant les moteurs cytosquelettiques et le transport de vésicules dans la cellule (Ross et al., 2008).

Différents types de moteurs cytosquelettiques transportent des vésicules (gris) et autres cargos dans la cellule. Les kinésines (orange) et les dynéines (bleu foncé) se déplacent vers l'extrémité positive et négative des microtubules, respectivement. Les myosines se déplacent le long des filaments d'actine (rouge), présents en particulier dans le cortex cellulaire. La myosine Va (marron) se déplace vers l'extrémité positive du filament. La myosine VI (bleu) se dirige vers le bout négatif. Les deux types de filaments sont en contact dans le cortex cellulaire (flèches noires), ce qui permet la collaboration entre les deux systèmes.

Tandis que la diffusion thermique est suffisante pour le transport de petites molécules comme l'ATP ou l'acetyl-CoA, certaines structures ont besoin d'un transport actif à l'intérieur des cellules. Dans ce sens, les moteurs cytosquelettiques coopèrent au sein des cellules pour établir et maintenir l'organisation des cellules eucaryotes en assurant la localisation spécifique de protéines, de vésicules ou d'organites dans le cytoplasme, l'adressage de macromolécules vers les membranes (plasmique ou internes), la formation de vésicules, l'exocytose et l'endocytose... Ils ont également un rôle clé dans la division et la migration cellulaires (Akhmanova and Hammer III, 2010; Geisbrecht and Montell, 2002; Ross et al., 2008; Woolner and Bement, 2009; Yoshida et al., 2004).

1.1.2 Les myosines

Les myosines constituent une superfamille de moteurs moléculaires dépendants de l'actine (**figure 2**) qui comprend jusqu'à ce jour 45 classes différentes (Odriontz and Kollmar, 2007; Pasha et al., 2016). La plupart des classes de myosines sont ubiquitaires parmi les Eucaryotes: ainsi les myosines de classes I et II ont été retrouvées dans tous les types étudiés, des organismes unicellulaires aux plus complexes. Elles participent à la division et à la polarisation cellulaire. D'autres gènes de myosines plus spécifiques sont responsables de la contraction musculaire, de la transduction de signaux ou bien encore du transport spécifique de biomolécules, de vésicules et d'organites (Hartman et al., 2011).

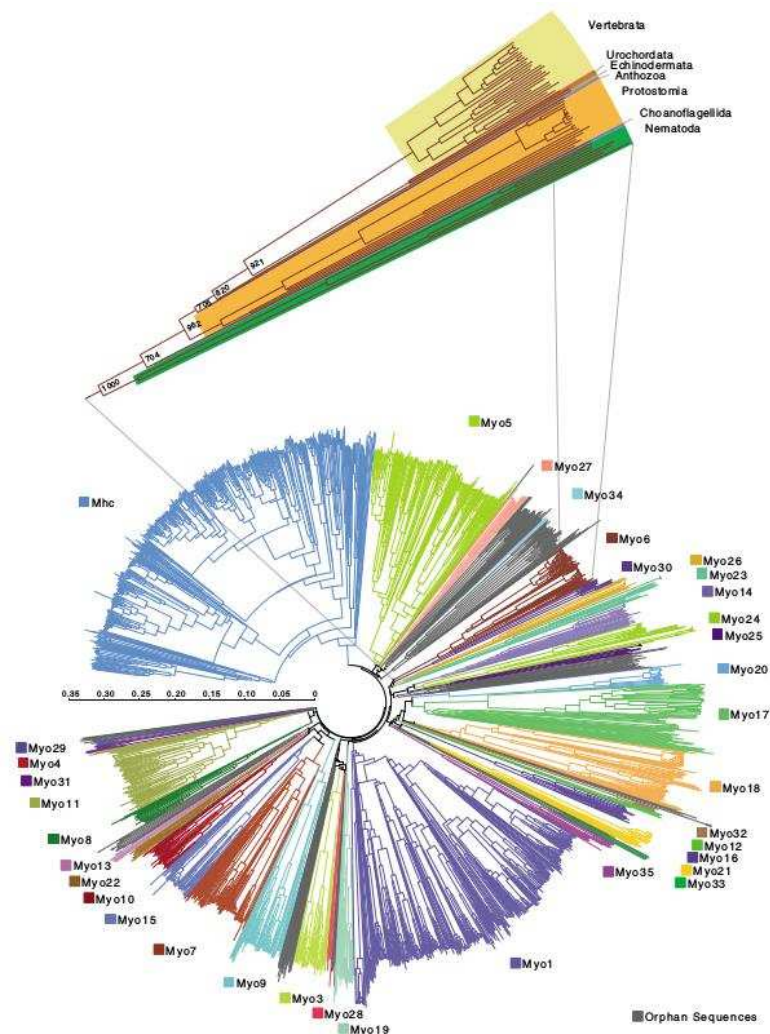


Figure 2 - Arbre phylogénétique des domaines moteurs des myosines (Odriontz and Kollmar, 2007)

L'arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences de 1984 domaines moteurs différents de myosine.

Les myosines sont classées en « conventionnelles » et « non conventionnelles ». Les conventionnelles correspondent aux myosines de classe II, et sont les premières à avoir été caractérisées (Sellers, 2000). Elles forment des filaments qui peuvent glisser le long des microfilaments d'actine en produisant ainsi une contraction. Elles sont entre autres impliquées dans la contraction musculaire et la cytokinèse (Spudich, 2001). Les autres classes de myosines, appelées « non conventionnelles » ne forment pas des filaments, et agissent en tant que molécules isolées. Elles constituent des classes de myosines diverses, responsables de nombreuses fonctions dans la superfamille. C'est le cas des myosines V et VI, qui sont des moteurs processifs, c'est-à-dire capables d'effectuer plusieurs pas le long de filaments d'actine en transportant des cargos (Woolner and Bement, 2009).

Les myosines sont constituées d'une longue chaîne polypeptidique nommée « chaîne lourde ». Elles possèdent trois domaines structuraux successifs (**figure 3**) :

1. **Le domaine moteur**, d'environ 80kDa est responsable de l'hydrolyse du MgATP. Il comporte également le site d'interaction avec l'actine, mais son affinité pour le filament dépend de l'état structural/biochimique du moteur, selon le nucléotide présent dans le site actif.
2. **Le cou**, ou bras de levier ou encore domaine régulateur : il comporte les sites de fixation des chaînes légères qui appartiennent à la famille de la calmoduline. Selon la classe de myosine, un nombre variable de chaînes légères sont fixées sur la chaîne lourde. Les chaînes légères se lient à une séquence consensus $[(I,L,V)QxxxRGxxx(R,K)]$ nommée « motif IQ ». Ce domaine permet l'amplification des changements conformationnels du domaine moteur et joue un rôle important dans la régulation du moteur (Houdusse et al., 1996).
3. **La queue**, correspondant à la partie C-terminale des myosines, est très variable selon la classe étudiée. Elle est souvent capable d'induire la dimérisation de la protéine, et joue un rôle majeur dans la régulation de son activité ainsi que dans son recrutement. La divergence structurale de la queue permet la reconnaissance de cargos cellulaires spécifiques par ces diverses myosines.

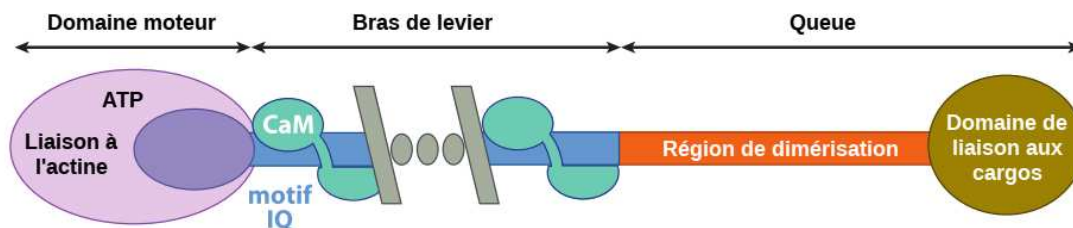


Figure 3 – Organisation simplifiée d'une myosine (adapté de Sweeney and Houdusse, 2010a).

Les myosines disposent de trois domaines : le domaine moteur (N-terminal), très conservé, est responsable de la liaison à l'actine et de l'hydrolyse de l'ATP ; le bras de levier, avec un nombre variable de motifs IQ reconnus par la calmoduline (CaM) ou des protéines similaires à la CaM, est impliqué dans l'amplification des changements conformationnels produits par le domaine moteur ; et la queue, formée pour certaines myosines d'une région de dimérisation (souvent de type *coiled-coil*), et d'un domaine globulaire de reconnaissance des cargos, très variable selon la myosine étudiée.

Bien que les différentes classes de myosines aient des rôles très distincts, le domaine moteur et son mécanisme d'action sont très conservés (Sellers, 2000; Sweeney and Houdusse, 2010a). Le cycle catalytique du domaine moteur comprend plusieurs états fonctionnels successifs et plusieurs états structuraux ont été déterminés à haute résolution (**figure 4**), les mieux caractérisés étant l'état « rigueur » (la myosine est dépourvue de nucléotide et est fortement associée à la F-actine), l'état « post-rigueur » (avec une molécule de MgATP dans le site actif) et le « *pre-powerstroke* » (avec MgATP ou ses produits d'hydrolyse, MgADP et Pi, dans le site actif) (Houdusse and Sweeney, 2016). Les changements conformationnels associés à l'hydrolyse du MgATP et au relâchement successif des produits de cette hydrolyse sont utilisés par les myosines afin de générer une force, transformant ainsi l'énergie chimique de l'ATP en énergie mécanique.

Pour transporter des cargos en tant que moteur unique, ces protéines doivent être processives, c'est-à-dire, capables d'effectuer plusieurs pas sur les filaments d'actine avant de s'en détacher. Cette caractéristique s'applique en général aux myosines dimériques, car la dimérisation permet l'association et la coordination de deux domaines moteurs pour « marcher » le long des microfilaments avec au moins une tête toujours associée à l'actine (**figure 5**) (Houdusse and Sweeney, 2016; Sweeney and Houdusse, 2010b; Woolner and Bement, 2009).

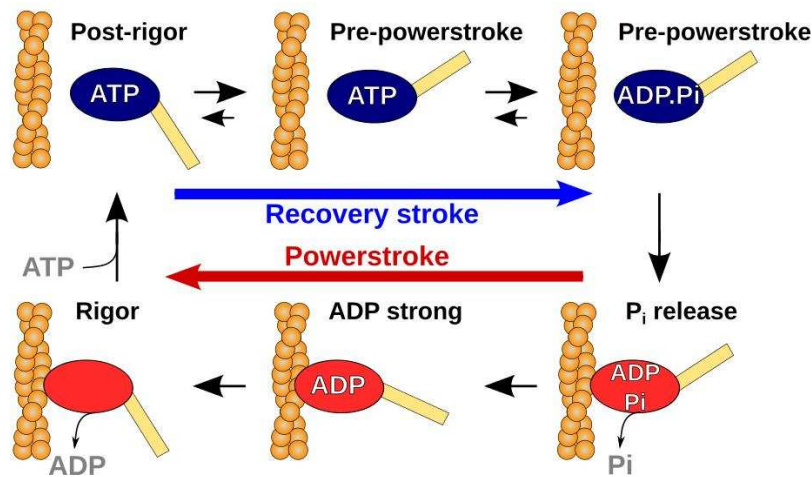


Figure 4 – Cycle moteur d’une myosine (Planelles-Herrero et al., 2017).

Dans l’état rigueur (*rigor*) la myosine VI est fortement attachée à l’actine (orange). L’entrée de l’ATP dans le site actif entraîne un changement conformationnel vers l’état post-rigueur (*post-rigor*), permettant le détachement de l’actine. Un deuxième changement conformationnel vers la conformation *pre-powerstroke* se produit pour que l’hydrolyse du nucléotide puisse avoir lieu (*recovery stroke*). Le ré-attachement de la myosine à l’actine accélère le relargage des produits de l’hydrolyse (P_i d’abord, puis ADP) et implique des changements conformationnels du moteur sur l’actine, générant un mouvement ou la production de force (*powerstroke*).

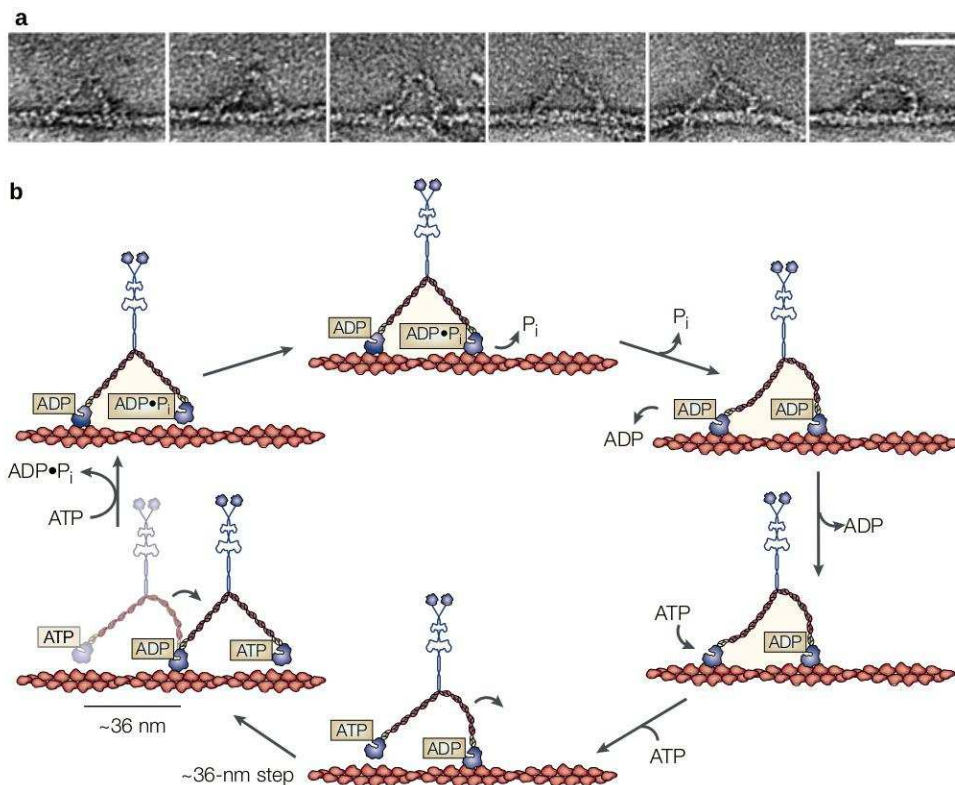


Figure 5 – Mouvement de la myosine V sur un filament d’actine (Spudich, 2001)

(a) Différents états de la myosine V observés par microscopie électronique (Walker et al., 2000).

(b) En utilisant les changements conformationnels décrits dans la **figure 4**, la myosine V est capable de marcher sur les filaments d’actine de façon processive.

1.1.3 La myosine VI

La myosine VI fut découverte en 1992 dans les cellules de *Drosophila melanogaster* (Kellerman and Miller, 1992). Ultérieurement, il a été démontré que cette myosine (initialement nommée 95F MHC) était étroitement associée à des particules se déplaçant le long des filaments d'actine (Bohrmann, 1997; Mermall et al., 1994) et qu'elle se localisait dans des régions de la cellule riches en actine (Biemesderfer et al., 2002). Lors de sa découverte, elle fut impliquée dans la migration des cellules du follicule et la maturation des disques imaginaux chez la *Drosophila* (Deng et al., 1999). Depuis, elle a été trouvée dans tous les métazoaires, du nématode *Caenorhabditis elegans* à l'humain. Elle est aussi exprimée chez les choanoflagellés, les filastériens et les *apusozoa*, mais elle est absente chez les champignons et les amibes (Sebé-Pedrós et al., 2014).

La principale particularité de la myosine VI est qu'elle possède une directionnalité de mouvement en sens opposé de toutes les autres myosines, c'est-à-dire, elle se dirige vers l'extrémité négative des filaments d'actine (Wells et al., 1999). Elle est la seule myosine décrite jusqu'à présent avec cette caractéristique, ce qui lui permet d'effectuer des fonctions différentes de celles des autres myosines.

1.1.3.1 - Caractéristiques et structure de la myosine VI

La myosine VI suit l'organisation typique des autres myosines (**figure 6**), avec un domaine moteur N-terminal très conservé, un bras de levier court possédant un seul motif IQ reconnu par la calmoduline, et une queue C-terminale.

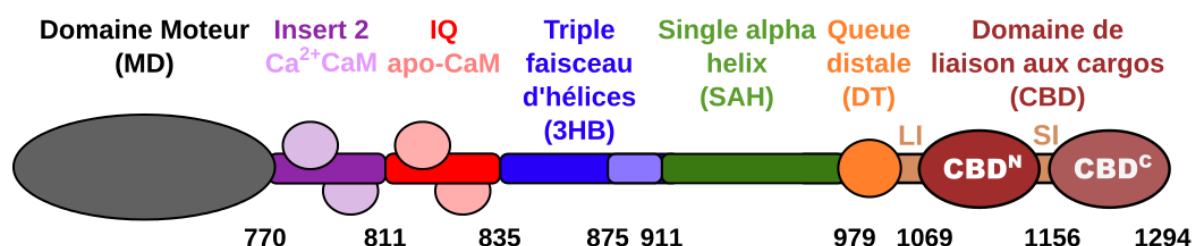


Figure 6 – Schéma représentant l'organisation de la myosine VI

La molécule de myosine VI dispose d'un domaine moteur N-terminal) suivi d'un bras de levier court composé d'un insert unique (insert 2) et un motif IQ (IQ motif) reconnu par la calmoduline. La queue comporte différents sous-domaines : la queue proximale formée par un faisceau de trois hélices (3HB), une hélice α stable (SAH) très rigide, la queue distale (DT) et le domaine de recrutement de partenaires/cargos (CBD). Le CBD peut comporter deux inserts alternatifs: LI (grand insert, entre la DT et le CBD) et SI (petit insert, entre les deux sous-domaines du CBD).

1.1.3.1.1 - La tête de la myosine VI

La tête de la myosine VI possède deux inserts uniques dans la superfamille des myosines :

L'insert 1, près du site de liaison du nucléotide (MgATP, MgADP.Pi ou MgADP) du domaine moteur, est responsable de propriétés cinétiques spécifiques de la myosine VI. L'insert 1 ralentit la vitesse de fixation de l'ATP dans le site actif, paramètre important pour la coordination mécanique (« *gating* ») entre les deux têtes du dimère de myosine VI. Cette coordination est essentielle pour un mouvement processif (Ménétreay et al., 2005; Pylypenko et al., 2011).

L'insert 2 (figure 6), quant à lui, fait partie du convertisseur de la tête de la myosine et possède un site de fixation à la calmoduline (Bahloul et al., 2004; Ménétreay et al., 2005). Le rôle du convertisseur est d'amplifier et de transmettre les changements conformationnels du domaine moteur vers le reste de la myosine. Le complexe formé par l'insert et la molécule de calmoduline interagit étroitement avec le convertisseur et le contourne, imposant ainsi une orientation du bras de levier modifiée de 120° par rapport aux autres myosines (**figure 7**). La calmoduline recrutée par l'insert 2 interagit également avec le convertisseur et contribue au maintien de cette nouvelle direction. Ceci explique le changement de directionnalité de la myosine VI (Ménétreay et al., 2005). Des expériences avec des mutants et des chimères ont révélé que l'insert 2 est en fait le seul déterminant de la directionnalité inverse, et que sans cet insert la myosine VI se dirige vers l'extrémité positive des microfilaments d'actine (Park et al., 2007).

Il a été important d'établir que les changements conformationnels et le mécanisme de production de force de la myosine VI est similaire à ce qui avait été décrit pour les autres myosines, malgré la directionnalité contraire. L'obtention des structures de la myosine VI à haute résolution par le laboratoire « Motilité Structurale » a été déterminante pour le démontrer (Ménétreay et al., 2005, 2007, 2012). Ces structures ont indiqué cependant que, contrairement aux autres moteurs, un changement conformationnel du convertisseur est essentiel durant le cycle pour qu'elle puisse effectuer des pas sur le filament d'actine d'une amplitude suffisante (Sweeney and Houdusse, 2010a).

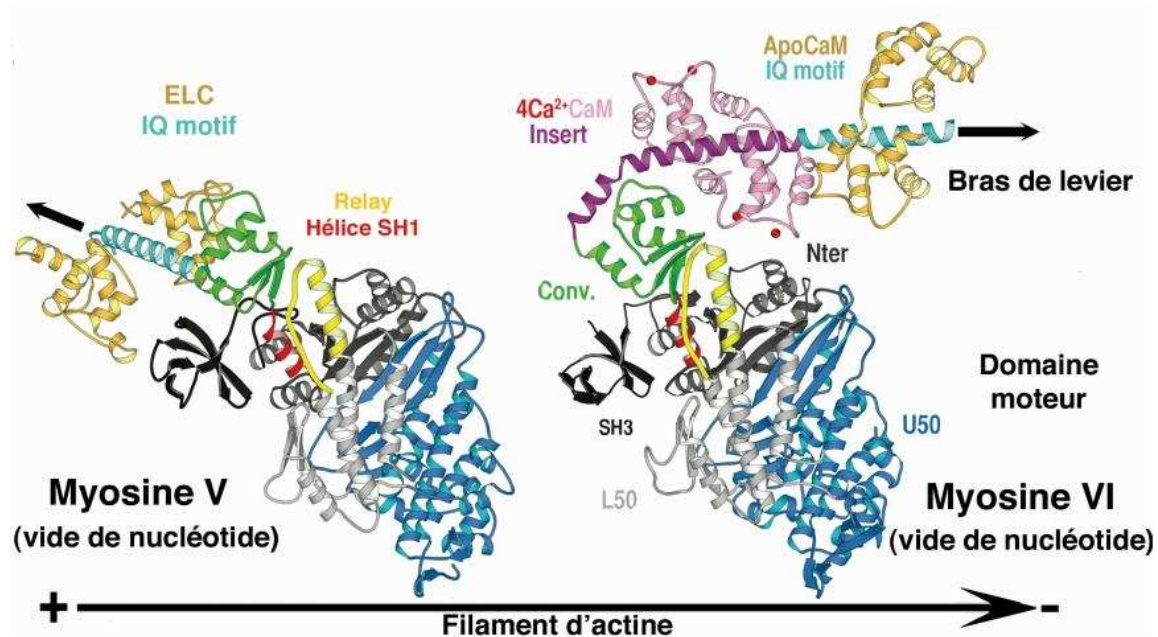


Figure 7 – Comparaison des structures du domaine moteur de la myosine VI (droite) et de la myosine V (gauche) (adapté de Ménétrey et al., 2005).

Les domaines moteurs (en bleu, gris et noir) sont très similaires dans les deux cas. Dans la myosine VI, la présence de l'insert 2 (violet) suivant le convertisseur produit une réorientation du bras de levier (en vert, violet/rose et bleu clair/doré) de 120° par rapport à la myosine V (gauche) et aux autres myosines. Cette réorganisation dirige le bras de levier vers l'extrémité négative du filament d'actine (flèche noire).

L'insert 2 étant le seul déterminant de la directionnalité inversée de la myosine VI, la question se pose de savoir s'il est présent sur d'autres membres de la superfamille. La recherche d'autres myosines ayant un insert entre le convertisseur et le premier motif IQ permettant le repositionnement du bras de levier montre qu'il y a au moins un candidat qui pourrait aussi présenter une directionnalité contraire, la myosine XXX (Odronitz and Kollmar, 2007; Sweeney and Houdusse, 2010a). Or, cette prédiction n'a jamais été évaluée de façon expérimentale.

1.1.3.1.2 - Le bras de levier

Le bras de levier de la myosine VI comporte un seul motif IQ (**figure 6**). La structure du bras de levier isolé (code PDB 3GN4, Mukherjea et al., 2009, **figure 8**) montre l'insert-2 et le motif IQ en complexe avec des calmodulines (CaM). Il est important de remarquer que la première CaM est capable de lier quatre ions de calcium (Ca^{2+} -CaM), tandis que la deuxième est dépourvue de calcium (apo-CaM). La liaison de ces deux CaMs stabilise et rigidifie le bras de levier. Elles sont suivies d'un domaine formé par trois hélices (« *triple helix bundle* » ou 3HB).

Selon la théorie du bras de levier rotatif, la longueur des pas et la force engendrées par une myosine sont proportionnels à la longueur de son bras de levier (Holmes and Geeves, 2000). La myosine VI, possédant un bras de levier six fois plus court que la myosine V (1 et 6 motifs IQ, respectivement) devrait théoriquement effectuer un pas six fois plus court que celui de la myosine V. Toutefois, des expériences sur molécules uniques montrent que la myosine VI effectue un pas bien plus long que celui qui lui a été prédit, et comparable à celui de la myosine V (Nishikawa et al., 2002; Rock et al., 2001). Ceci est discuté en détail dans la section 1.1.3.4.1 – « La dimérisation de la myosine VI » (page 36)

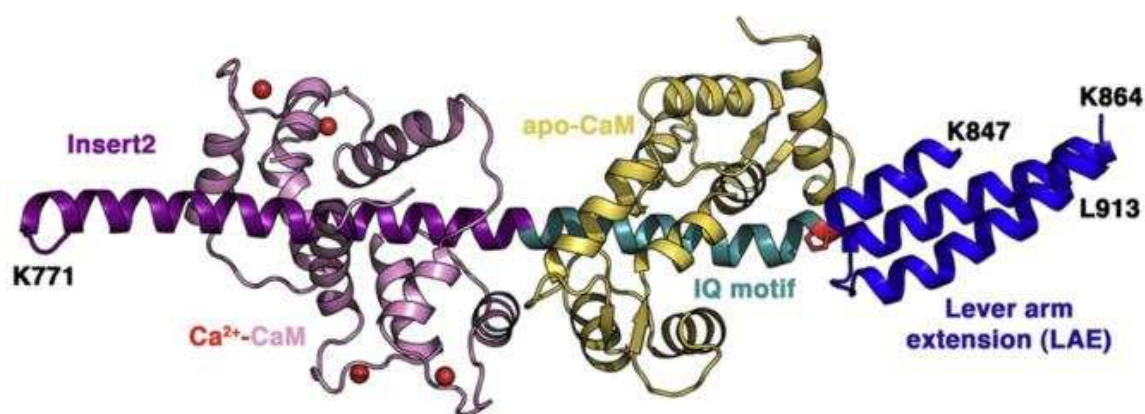


Figure 8 – Bras de levier de la myosine VI (Mukherjea et al., 2009).

Structure du bras de levier de la myosine VI avec le convertisseur (non représenté), l'insert 2 (violet, Ca²⁺-CaM rose) et le motif IQ (cyan, apo-CaM jaune) suivi du triple faisceau d'hélices ou 3HB (*lever arm extension*).

1.1.3.1.3 - La queue de la myosine VI

La queue médiale (ou SAH) se trouve à la suite du domaine 3HB. Le SAH (« *Single Alpha Helix* », **figure 6**) comporte principalement des résidus chargés et répétés (environ quatre résidus chargés négativement (notamment Glu) suivis de quatre résidus chargés positivement (Arg et Lys)) capables d'adopter une structure en hélice α stable en solution (Sivaramakrishnan et al., 2008; Spink et al., 2008; Wolny et al., 2017).

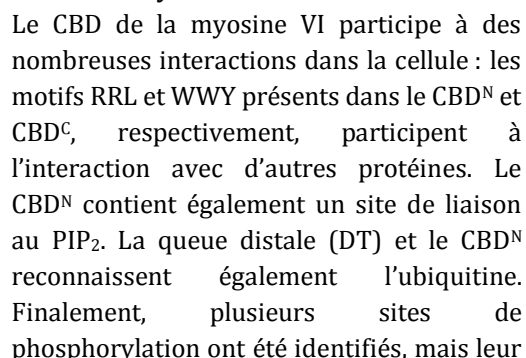
L'extrémité C-terminale de la myosine VI correspond au domaine de liaison aux cargos (« *Cargo Binding Domain* » ou CBD, **figure 6**). L'analyse de sa séquence montre que le CBD de la myosine VI est très conservé dans l'évolution, mais il ne présente aucune homologie avec d'autres domaines connus (Yu et al., 2009). Dès sa découverte, les premières expériences réalisées avec la myosine VI de *Drosophila* ont confirmé la présence de plusieurs isoformes de la myosine VI (Kellerman and Miller, 1992). En effet, le CBD peut

contenir deux inserts dérivés d'un épissage alternatif : un grand insert de 32 ou 23 résidus présent avant le CBD (nommé LI), et un petit insert de 9 résidus à l'intérieur du CBD (SI, **figure 6**). La combinaison de l'absence ou de la présence de ces inserts donne lieu à différentes isoformes: isoforme NI (sans inserts), isoforme SI (avec le petit insert), isoforme LI (avec le grand insert) et isoforme LI+SI (avec les deux inserts). La présence du petit insert dans le CBD permet de séparer ce domaine en deux sous-domaines (**figure 6**): le CBD^N (résidus 1069-1146) et le CBD^C (rés. 1166-fin). La structure du CBD^C est connue (Yu et al., 2009). Plusieurs structures RMN de fragments du CBD^N sont également connues (He et al., 2016; Wollscheid et al., 2016). Cependant, l'utilisation de petits fragments isolés ne permet pas d'avoir une vue d'ensemble de la structure globale du CBD entier.

Plusieurs sites ou séquences d'interaction ont été identifiés sur le CBD (**figure 9**) :

1. Deux séquences d'interaction avec d'autres protéines (Spudich et al., 2007) : motif « RRL » (dans le CBD^N) et motif « WWY » (dans le CBD^C).
2. Deux séquences de phosphorylation (dans le CBD^N) :
 - Les thréonines 1097 et 1100 (séquence TINT) sont phosphorylés *in vivo*, mais le rôle de cette modification n'est pas connu. La phosphorylation pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'interaction entre le CBD et certaines protéines, telles que l'optineurine (Sahlender et al., 2005).
 - La tyrosine 1146 (Tomatis et al., 2013). Notez que la régulation par la phosphorylation sur cette Tyr ne peut être observée que pour les isoformes qui possèdent le petit insert, SI.
3. Une séquence d'interaction (¹¹²⁴WKS¹¹³¹KNKKR) avec le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdInst(4,5)P₂ ou PIP₂), est présent sur le CBD^N (Spudich et al., 2007).
4. Un site d'interaction avec l'ubiquitine, MyUb, est présent sur le CBD^N, très proche du motif « RRL » (He et al., 2016).

Finalement, il est important de remarquer qu'en N-ter du grand insert se trouve la queue distale de la myosine VI (**figure 6, 9**), contenant un motif MIU de faible affinité pour l'ubiquitine (résidus 998-1031, (He et al., 2016; Penengo et al., 2006). La structure de la partie C-terminale de cette région est également connue (**figure 10**). Mais ici encore, l'étude d'un si petit fragment par RMN ne permet pas d'établir avec précision la structure de cette région dans le contexte de la queue entière de la myosine VI.



(Droite) Représentation des 20 structures calculées pour ce fragment, avec la même orientation qu'à gauche et superposées en utilisant la première hélice de la queue comme référence.

1.I.3.2 - Propriétés mécaniques et enzymatiques de la myosine VI

Des études cinétiques et de motilité *in vitro* réalisées avec la myosine VI montrent qu'elle est capable d'effectuer plusieurs pas sur les filaments d'actine avant de s'en détacher (Nishikawa et al., 2002; Rock et al., 2001). Cette caractéristique est critique pour les moteurs transportant des cargos, comme la myosine V (Mehta et al., 1999). Or, la myosine VI semble effectuer uniquement 5 ou 6 pas (environ 240 nm) avant de se détacher de l'actine (Nishikawa et al., 2002; Rock et al., 2001). Cette distance semble trop petite pour permettre à la myosine VI de transporter des cargos de façon efficace (la myosine V, le principal moteur transporteur dans le cortex cellulaire, est capable d'effectuer au moins 40 pas ($> 1.4 \mu\text{m}$), avant de se détacher de l'actine (Frank et al., 2004)). De plus, il n'y a pas de démonstration directe du rôle de transporteur pour la myosine VI *in vivo*. Il est possible cependant que le cargo transporté en stabilisant la dimérisation de la myosine VI puisse augmenter la distance parcourue. Le rôle de la dimérisation dans la processivité et le transport effectué par la myosine VI est analysé avec plus de détail dans la section 1.I.3.4.1 de ce même chapitre, page 36.

Des études plus approfondies ont montré que le relâchement de l'ADP est l'étape limitante dans le cycle ATPase de cette myosine, ce qui lui permet de peupler principalement les états fortement attachés à l'actine dans des conditions physiologiques (De La Cruz et al., 2001). Cette caractéristique suggère que la myosine VI peut être capable de créer une tension, ou des liaisons fortes avec l'actine. L'utilisation de pinces optiques a permis de montrer que la myosine VI peut faire des pas sur des filaments d'actine malgré l'existence d'une force appliquée en direction contraire à son mouvement (Altman et al., 2004). Or, elle ne peut plus avancer au-delà d'une charge supérieure à 2 pN, suggérant la présence d'un mécanisme de régulation du rôle du moteur comme transporteur ou ancre en fonction de la charge appliquée sur la myosine VI. Cette caractéristique permettrait à un cargo de rester lié aux filaments d'actine par l'intermédiaire de la myosine VI, et ceci en résistant à une force opposée. Il est important de remarquer que pour pouvoir ancrer, il est plus probable que la myosine VI doive être sous forme dimérique (Sweeney and Houdusse, 2010a) car la coordination entre les deux têtes optimise sa résistance à une force opposée.

La myosine peut également avoir un rôle de régulateur de la dynamique des filaments d'actine, ou d'organisateur du réseau d'actine autour d'elle. En absence de myosine VI, certains régulateurs de la dynamique des filaments d'actine, comme le complexe Arp2/3, ne sont pas recrutés dans les fronts de migration, et la quantité d'actine

présente à cet endroit est plus faible (Rogat and Miller, 2002). Dans les spermatozoïdes de *Drosophila*, les mutants dépourvus de myosine VI montrent une désorganisation de la structure de l'actine, ainsi qu'un défaut dans l'emplacement de certaines structures membranaires (Hicks et al., 1999). Finalement, la myosine VI participerait également à la réorganisation du réseau d'actine autour de vésicules ou organites spécialisés, tels que les mélanosomes (Loubery et al., 2012). La surexpression de la forme mutée phosphomimétique T406E (résidu situé sur une boucle exposée de la myosine VI à l'interface avec l'actine) produit une réorganisation du réseau d'actine autour des vésicules ayant recruté ce mutant (Naccache and Hasson, 2006).

1.1.3.3 - Fonctions de la myosine VI

Du fait de la directionnalité de son mouvement, contraire aux autres myosines, la myosine VI assure des fonctions spécifiques dans de nombreux processus cellulaires (**figure 11**). Comme décrit précédemment, elle est capable non seulement de transporter des cargos, mais aussi d'effectuer une fonction d'ancrage. Ces deux caractéristiques lui permettent d'avoir des rôles uniques. Or, il est intéressant de remarquer que la déplétion de la myosine VI n'est pas létale. En effet, des souris dans lesquels la myosine VI n'est pas exprimée (souris *Snell's waltzer* ou *sv*) sont viables, mais sourdes (Avraham et al., 1995), indiquant un rôle important pour la myosine VI dans les cellules sensorielles de l'oreille interne. Les stéréocils des souris *sv/sv* sont défectueux, suggérant que la myosine VI joue un rôle essentiel dans la maintenance et la formation de l'architecture des stéréocils. Les souris *sv/sv* sont atteintes également d'une cardiomyopathie hypertrophique (Hegan et al., 2015).

L'endocytose (l'internalisation de vésicules ou de particules vers l'intérieur de la cellule) est une fonction essentielle et nécessaire pour la prise de nutriments, le recyclage de récepteurs et la transmission synaptique, entre autres. Le cortex cellulaire est un réseau de microfilaments d'actine situé sous la membrane plasmique, où l'endocytose a lieu. Dans les cellules polarisées, la myosine VI (isoforme avec le LI dans le CBD) est impliquée dans trois étapes différentes de ce processus : l'accumulation des complexes ligand-récepteur dans les puits recouverts de clathrine, la formation des vésicules à clathrine et leur transport jusqu'aux endosomes précoces (Hasson, 2003). L'inhibition de la myosine VI produit une diminution de la formation de ces vésicules et son accumulation dans le cortex cellulaire. Le recrutement de la myosine VI dans le cortex cellulaire et la membrane plasmique est dépendant de certaines protéines, comme Dab2, et du PIP₂ (Puri, 2009), interagissant avec le CBD^C et le CBD^N, respectivement.

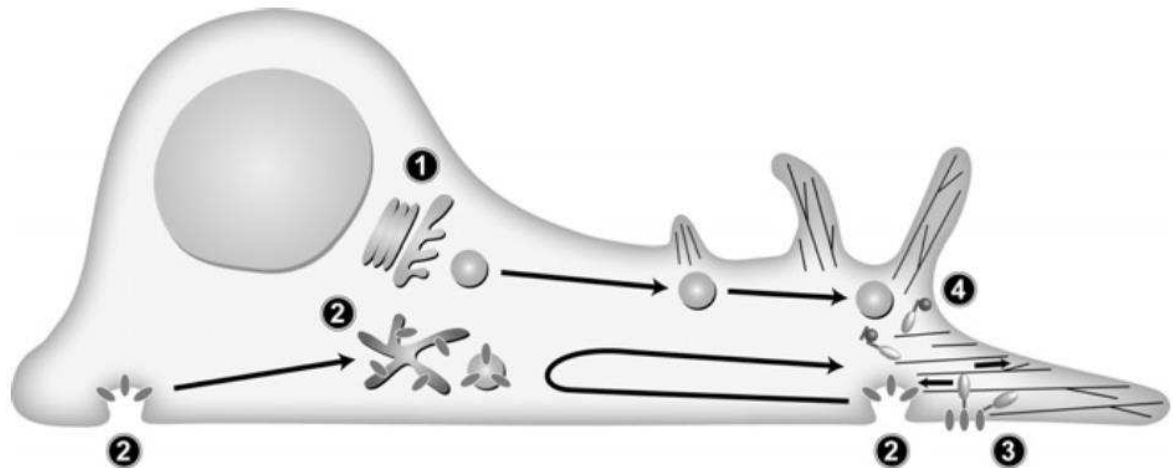


Figure 11 – Fonctions de la myosine VI (Chibalina et al., 2009)

- ① La myosine VI est localisée dans la région périnucléaire, autour de l'appareil de Golgi. Elle participe à la régulation de la distribution des nouveaux récepteurs synthétisés.
- ② Dans les endosomes, la myosine VI participe au recyclage des récepteurs provenant de la membrane plasmatique.
- ③ Au niveau du lamellipode, la myosine VI produirait une force protrusive en se déplaçant vers l'extrémité négative des filaments d'actine.
- ④ Dans le front de migration, la myosine VI pourrait recruter des molécules de signalisation nécessaires pour la migration cellulaire.

La myosine VI est également localisée au niveau de l'appareil de Golgi, où elle est nécessaire pour le transport de vésicules de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane basolatérale des cellules polarisées (Chibalina et al., 2008, 2009). Dans ces cellules, la myosine VI est également présente dans les endosomes de recyclage, des structures impliquées dans le tri des cargos se dirigeant vers le domaine basolatéral des cellules (Bond et al., 2011). Cette fonction est nécessaire, également, pour l'adressage des récepteurs des facteurs de croissance épidermique (EGFR), ainsi que d'autres protéines impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire, à la membrane plasmatique. En contrôlant l'adressage de ces protéines vers le front de migration, la myosine VI joue un rôle clé dans la migration dirigée des cellules (Chibalina et al., 2010). La myosine VI est également essentielle pour l'exocytose des vésicules synaptiques dans les cellules ciliées internes (Roux et al., 2009). De plus, la myosine VI n'est pas uniquement présente au sein du cytoplasme et du cortex cellulaire. Elle est présente dans le noyau cellulaire (Fili et al., 2017; Vreugde et al., 2006; Zorca et al., 2015) et semble avoir un rôle de régulateur de la transcription de certains promoteurs impliqués dans le cancer.

Récemment, la myosine VI a également été impliquée dans l'autophagie. En effet, elle participerait au transport de cargos permettant la croissance du phagophore et sa fusion avec les lysosomes pour former les autolysosomes (Kast and Dominguez, 2017). Plusieurs partenaires de la myosine VI sont en effet des récepteurs de l'autophagie, tels que NDP52 ou TOM1. Le rôle de ces partenaires est discuté plus en détail dans la section suivante, dédiée aux partenaires.

Finalement, la myosine VI est indispensable pour le développement et la maintenance de certaines structures très organisées, comme les stéréocils (Frank et al., 2004; Hertzano et al., 2008). Elle est nécessaire pour la maturation des cellules internes ciliées (Roux et al., 2009). À l'aide de la vinculine, la myosine VI joue également un rôle clé dans la maturation des jonctions étanches dépendantes de la cadhérine. En effet, la myosine VI est indispensable pour ancrer au cytosquelette les molécules participant à l'interaction intercellulaire (Breshears and Titus, 2007). Il a été également proposé qu'elle puisse générer une force protrusive qui déplacerait les filaments d'actine vers l'extérieur, participant à la formation de protrusions membranaires (Geisbrecht and Montell, 2002).

Le rôle exact de la myosine VI dans toutes les fonctions évoquées ci-dessus n'est pas connu. En effet, dans tous les cas, le rôle de la myosine VI est inféré suite à l'analyse du phénotype produit dans la cellule ou dans l'organisme en son absence. Or, il n'y a pas encore de démonstration directe de l'action concrète que la myosine VI effectue dans chacun de ces processus, et le fonctionnement en tant que transporteur, organisateur d'actine ou ancre est seulement inféré à partir de la fonction étudiée.

1.1.3.3.1 - Les partenaires de la myosine VI

Comme décrit précédemment, le CBD de la myosine VI comporte plusieurs sites ou séquences d'interaction avec d'autres protéines (**figure 9**), aussi appelés partenaires. Ces partenaires, présents à des endroits précis de la cellule, recruteraient la myosine VI, permettant ainsi le contrôle de son activité. La myosine VI est capable d'effectuer différentes actions de motilité. Dans la cellule, les partenaires auxquels la myosine VI s'associe après activation lui permettent d'exécuter la fonction adéquate et requise à cet endroit précis et au moment opportun. Les partenaires pourraient donc ainsi définir l'action que le moteur doit effectuer une fois qu'il est activé.

1.1.3.3.1.1 - Partenaires RRL

Le premier motif d'interaction présent dans le CBD est le motif « RRL » (¹¹¹⁶RRL¹¹¹⁸), présent dans la première moitié du domaine (CBD^N, **figure 9**). Ce motif participe à l'interaction avec différents types de protéines :

Protéines contenant des domaines en doigt de zinc : comme l'optineurine (Sahlender et al., 2005), NDP52 (aussi nommé CALCOCO2, Morriswood et al., 2007) et T6BP (TAX1BP1 ou CALCOCO3, Morriswood et al., 2007). Les trois protéines sont des récepteurs de l'autophagie contenant un ou deux domaines en doigt de zinc dans leur extrémité C-terminale. Grâce à leur interaction avec des protéines clés pour l'autophagie comme LC3 et l'ubiquitine, ces protéines participent à l'immunité innée et à la signalisation cellulaire (Kast and Dominguez, 2017; Kruppa et al., 2016; von Muhlinen et al., 2012; Tumbarello et al., 2013). Avec la myosine VI, l'optineurine a un rôle clé dans la maintenance de la structure de l'appareil de Golgi, l'exocytose et la migration cellulaire (Bond et al., 2011; Chibalina et al., 2010; Sahlender et al., 2005). De plus, NDP52 et la myosine VI interagissent également dans le noyau cellulaire (Fili et al., 2017; Zorca et al., 2015) et ont un rôle clé dans la régulation de l'activité de l'ARN polymérase II (Fili et al., 2017).

Facteurs d'échange de GDP/GTP (« *Guanine nucleotide exchange factors* », GEFs) : comme DOCK7 (Sobczak et al., 2016) et ARHGEF12 (Wollscheid et al., 2016). Le rôle de ces interactions n'a encore été que très peu étudié. Avec DOCK7, la myosine VI semble avoir un rôle dans la croissance et la maintenance des protrusions cellulaires riches en actine stimulées par le NGF (Sobczak et al., 2016).

Autres protéines : comme GIPC1 (« *GAIIP Interacting Protein C-Terminus* », Reed et al., 2005), aussi appelé synectin, TIP2, NIP, GLUT1CBP, SEMCAP1 ou encore IIP1). GIPC1 est un des partenaires le plus étudiés de la myosine VI. Ensemble, les deux protéines ont des rôles clés dans l'endocytose, le recyclage de récepteurs membranaires, la signalisation, l'angiogénèse et la cytokinèse (Katoh, 2013; Masters et al., 2017). Les membres de la famille GIPC (GIPC1, GIPC2 et GIPC3) sont des protéines très conservées dans l'évolution. Elles contiennent un domaine GH1 en N-terminal (« *GIPC Homology 1* ») participant à l'oligomérisation de la protéine (Kedlaya et al., 2006; Reed et al., 2005), un domaine PDZ et un domaine GH2 en C-terminal (« *GIPC Homology 2* »), responsable de l'interaction avec la myosine VI (Naccache et al., 2006). Avec son domaine PDZ, GIPC1 interagit avec des récepteurs tyrosine kinase (comme NTRK1), des récepteurs couplés à des protéines G

(comme ADRB1), des protéines transmembranaires (CD93, endoglin, intégrines $\alpha 5$ et $\alpha 6$), des protéines cytosoliques (APPL1) et virales (Katoh, 2013). GIPC1 représente une nouvelle cible pour la lutte contre le cancer. En effet, dans le contexte des cellules tumorales, GIPC1 est très fortement exprimé dans le cancer du sein, de la prostate et de l'ovaire, et il a été impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire (Choi et al., 2010; Kirikoshi and Katoh, 2002; Muders et al., 2006, 2009; Wang et al., 2010; Yavelsky et al., 2008). De récentes études ont décrit le potentiel de GIPC1 comme biomarqueur pour le développement et le traitement des métastases osseuses (Westbrook et al., 2016). De plus, la diminution de son expression réduit la viabilité des cellules tumorales, ainsi que la migration et la division cellulaires (Chittenden et al., 2010).

Afin d'étudier l'interaction entre la myosine VI et les différentes protéines partenaires utilisant le « motif RRL », historiquement la triple mutation RRL>AAA a été utilisée. Or, des expériences récentes de RMN et de dichroïsme circulaire ont montré que cette mutation détruit le repliement du sous-domaine CBD^N (Wollscheid et al., 2016). En effet, l'arginine présente au milieu du motif (RRL, Arg1117) est nécessaire pour maintenir l'intégralité structurale, tandis que l'Arg1116 et la Leu1118 peuvent être mutés sans affecter le repliement du domaine. Les auteurs ont ainsi confirmé par des expériences de *pull-down* que GIPC1, NDP52, Optineurine et T6BP utilisent le motif « RRL » pour interagir avec le CBD de la myosine VI, mais l'effet des mutations n'est pas le même dans tous les cas (**figure 12**). En effet, la mutation RRL>ARL entraîne une perte de l'interaction entre la myosine VI et GIPC1 et une diminution de l'affinité pour optineurine, tandis que l'interaction avec NDP52 et T6BP reste inchangée. Le mutant RRL>RRA, quant à lui, interagit plus faiblement avec GIPC1 et optineurine.

Finalement, l'interaction de tous les partenaires « RRL » est régulée par la présence du grand insert (LI) : l'interaction entre l'isoforme LI de la myosine VI et ces partenaires est très faible ou nulle (Wollscheid et al., 2016). En effet, la structure RMN d'une partie du CBD^N avec le LI montre que cet insert adopte une structure en hélice α qui masque le site « RRL » (**figure 13**). La présence du grand insert permet au contraire l'apparition d'une nouvelle surface participant à l'interaction avec la clathrine (Wollscheid et al., 2016). Le grand insert permet donc de modifier la spécificité du réseau de protéines reconnues par le CBD.

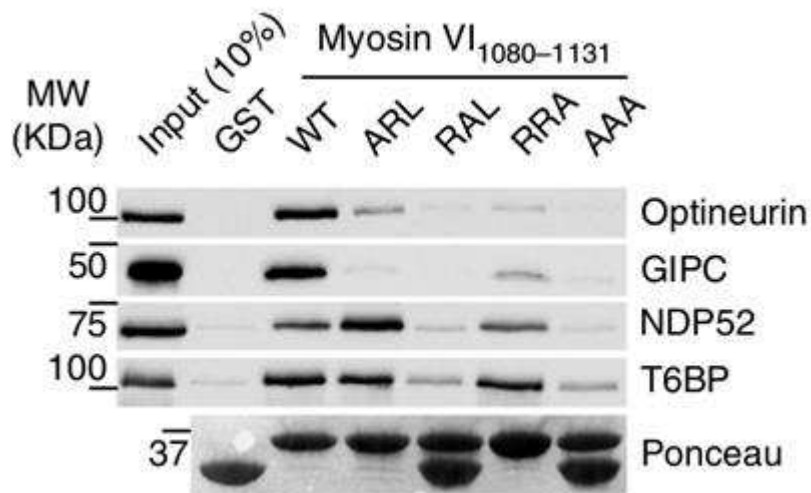


Figure 12 – Effet des mutations sur le motif RRL pour l'interaction avec l'optineurine, GIPC1, NDP52 et T6BP

Expériences de GST-pull-down à partir de cellules HEK2937T avec un construit GST-CBD^N. La mutation RRL>ARL abolit l'interaction avec GIPC1 et affaiblit l'interaction avec l'optineurine, sans changer celle de NDP52 ou T6BP. Les mutants RRL>RAL et RRL>AAA détruisent le repliement du domaine, affectant la liaison de tous les partenaires étudiés.

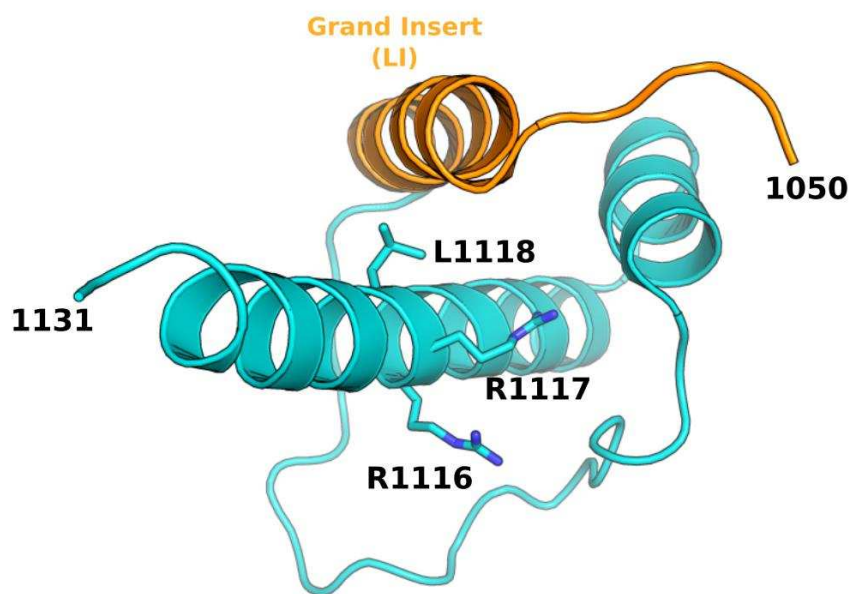


Figure 13 – Le grand insert (LI) dans le CBD de la myosine VI cache le motif RRL

Structure RMN (PDB 2N12, Wollscheid et al., 2016) d'une partie du CBD^N avec le grand insert (LI). Dans cette structure, le grand insert interagit avec le reste de la molécule, rendant inaccessible le motif RRL d'interaction avec certains partenaires.

1.1.3.3.1.2 - Partenaires WWY

Le deuxième motif d'interaction dans le CBD est le motif « WWY » (¹²⁰¹WWY¹²⁰³), présent dans la deuxième moitié du domaine (CBD^C, **figure 9**). Le mutant ponctuel WWY>WLY est suffisant pour abolir l'interaction avec les partenaires utilisant ce motif. Les partenaires les mieux caractérisés utilisant ce motif sont les suivants :

Disabled-2 (Dab2) est une protéine clé dans l'endocytose médié par la clathrine. Dab2 agit comme une protéine adaptatrice qui sélectionne et relie les récepteurs membranaires à la machinerie endocytique de la membrane plasmique. La myosine VI co-localise avec Dab2 dans les puits et vésicules à clathrine dans le domaine apical des cellules polarisées, suggérant une coopération dans leur rôle dans l'endocytose (Aschenbrenner et al., 2003; Buss et al., 2001; Morris et al., 2002; Spudich et al., 2007). La structure du complexe formé par le CBD^C et Dab2 est connue (Yu et al., 2009, **figure 14**). Dans cette structure, Dab2 est capable de dimériser, indirectement, le CBD de la myosine VI grâce à l'utilisation de deux sites de liaison présents sur les deux faces du CBD^C.

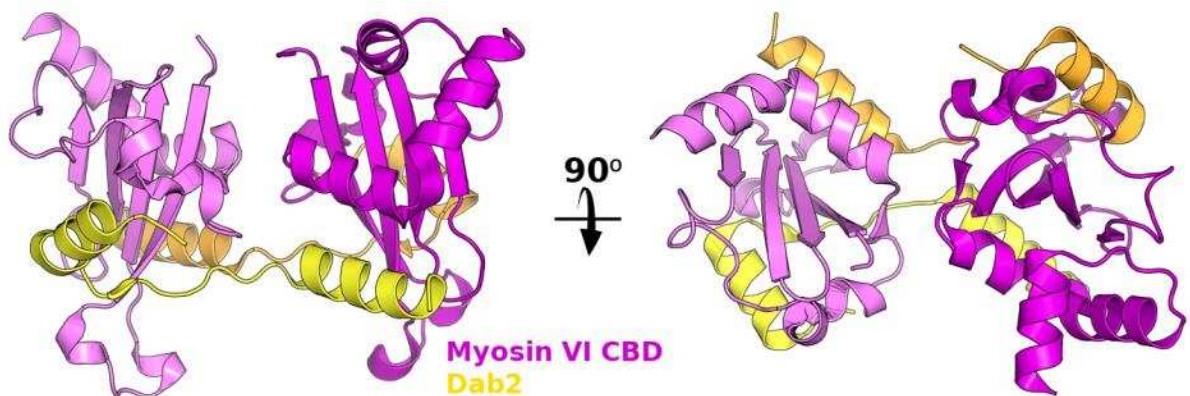


Figure 14– Dimérisation par Dab2

Modèle de dimérisation du CBD de la myosine VI (violet) par Dab2 (jaune), PDB 3H8D. Le CBD forme un dimère symétrique grâce à l'interaction avec deux molécules de Dab2. La conformation du CBD est similaire de celle adoptée par le monomère en solution (PDB 2KIA, r.m.s.d. = 1.15 pour 101 C α). Il est intéressant de remarquer qu'il n'y a pas de contacts directs entre les deux CBDs, et que la dimérisation se fait uniquement à travers Dab2.

TOM1 est une protéine cytosolique présente dans les endosomes (Seet et al., 2004). GIPC, TOM1 et la myosine VI sont tous les trois présents sur des vésicules à la périphérie de la cellule (Tumbarello et al., 2012). TOM1 est également capable d'interagir avec l'ubiquitine, et recrute la myosine VI pour participer à l'autophagie et à la maturation des autophagosomes (Tumbarello et al., 2012). De plus, TOM1 est un composant du complexe ESCRT-0, impliqué dans la genèse de vésicules intra-luminales et la reconnaissance de

cargos ubiquitylés (Wollert and Hurley, 2010). TOM1 interagit également avec la clathrine, et grâce à l'interaction avec Tollip, TOM1 représenterait un lien potentiel entre les protéines poly-ubiquitylés et la clathrine (Yamakami et al., 2003).

LMTK2 est une kinase de sérines et thréonines transmembranaire et participe, avec la myosine VI, dans les premières étapes de l'endocytose (Chibalina et al., 2007; Inoue et al., 2008; Wang, 2002). LMTK2 régule le trafic des endosomes précoces vers les endosomes de recyclage (Chibalina et al., 2007). Cependant, le rôle précis de cette interaction n'est pas connu, et il reste à étudier si la myosine VI participe à l'adressage de LMTK2, ou si l'activité de la myosine VI est régulée par une phosphorylation médiée par LMTK2.

1.1.3.1.3 - Ubiquitine

L'ubiquitine est un partenaire de la myosine VI qui gagne de plus en plus en importance. En effet, comme décrit précédemment, beaucoup de partenaires de la myosine VI interagissent avec l'ubiquitine, comme NDP52, optineurine, T6BP et TOM1. De plus, la myosine VI contient deux sites d'interaction avec l'ubiquitine dans sa queue (**figure 98**):

- Sur la queue distale, la myosine VI contient un motif MIU capable d'interagir avec l'ubiquitine (He et al., 2016; Penengo et al., 2006).
- Le CBD^N est également capable d'interagir avec des molécules de di-ubiquitine (He et al., 2016).

L'ubiquitine est une protéine très conservée de 8.6 kDa, essentielle et ubiquitaire. Dans sa fonction principale, l'ubiquitine marque des protéines en vue de leur dégradation dans le protéasome. Pour ce faire, plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées de façon covalente à la protéine cible (polyubiquitination). De plus, l'activité de certaines protéines, ainsi que leur localisation, sont régulées par son ubiquitination (Akutsu et al., 2016).

Les différentes chaînes latérales de lysine présentes sur la surface du monomère d'ubiquitine peuvent être modifiées afin de former des chaînes de polyubiquitine (**figure 15**). Selon la lysine utilisée, différents types de chaînes sont donc assemblés : K6, K11, K27, K29, K33, K48 ou encore K63 (Akutsu et al., 2016). Des chaînes linéaires (M1) peuvent également être synthétisées. Dans la cellule, chaque type de chaîne de polyubiquitine a une fonction précise et différente. Ainsi, les chaînes poly K27 sont impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN et dans la réponse immunitaire innée (Akutsu et al., 2016). Les chaînes poly K11 et K48 ont un rôle clé dans la dégradation *via* le protéasome (Komander

and Rape, 2012). Finalement, les chaînes K63, en plus de participer à la dégradation, régulent la fonction de certaines protéines. En effet, elles peuvent interagir de façon non-covalente et avoir un rôle d'intermédiaire des interactions entre deux protéines (Erpapazoglou et al., 2014; Komander and Rape, 2012). Cette interaction non-covalente est également importante pour la régulation de l'activité de certaines protéines (Erpapazoglou et al., 2014; Wright et al., 2016). De plus, des chaînes hétéro-typiques contenant plusieurs types de liaisons, peuvent être assemblées dans la cellule (Akutsu et al., 2016, **figure 15d**)

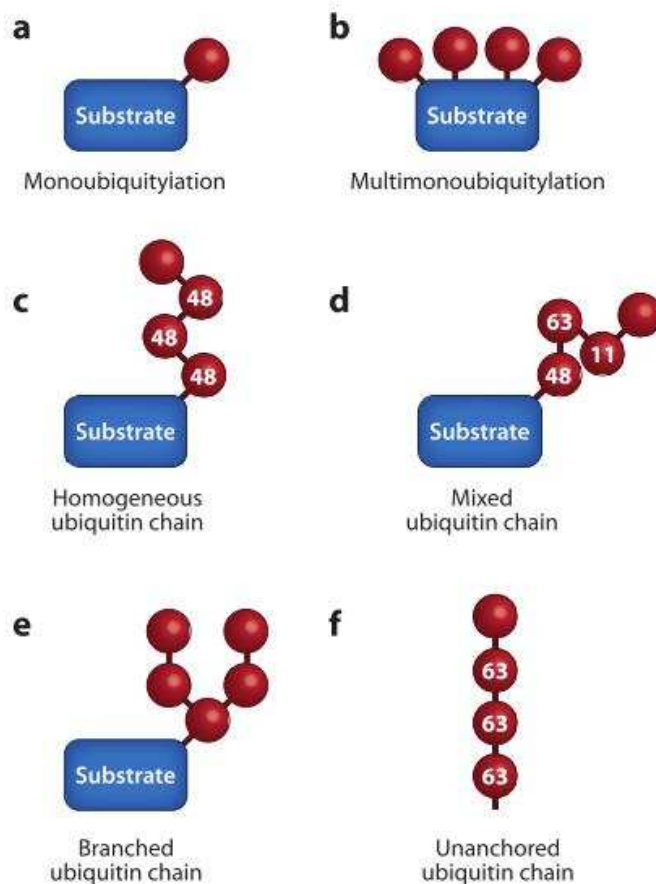


Figure 15 - Différents types d'ubiquitination (Komander and Rape, 2012)

(a) Une seule mono-ubiquitine. **(b)** Plusieurs mono-ubiquitines sur un même substrat. **(c)** Une chaîne linéaire d'ubiquitine avec un seul ou **(d)** plusieurs types de liaison entre les ubiquitines. **(e)** Une chaîne branchée. **(f)** Une chaîne non attachée de façon covalente à un substrat.

La queue de la myosine VI interagit avec la poly-ubiquitine K63 et, plus faiblement, avec des chaînes K11 et K48 (He et al., 2016). La présence du grand insert (LI) réduit l'interaction avec les différentes chaînes de poly-ubiquitine (K63, K11 et K48). La structure de la di-ubiquitine K63 avec la région N-terminale du CBD^N a été récemment résolue par RMN (He et al., 2016). Elle montre que la myosine VI utilise la région « RRL » pour interagir avec la di-ubiquitine. Le MIU, sur la queue distale de la myosine VI, interagit plus faiblement avec la di-ubiquitine K11, mais le rôle de cette interaction reste à étudier.

Plusieurs partenaires « RRL » de la myosine VI interagissent avec l'ubiquitine, comme NDP52, optineurine et T6BP. La question se pose donc de savoir si l'ubiquitine est nécessaire pour l'interaction, ou s'il y a compétition entre les partenaires et l'ubiquitine. Par exemple, l'optineurine interagit plus faiblement avec la myosine VI si cette dernière contient un mutant dans sa séquence abolissant l'interaction avec l'ubiquitine (He et al., 2016). Il reste cependant à étudier si ce résidu participe à l'interaction directe avec l'optineurine.

En plus d'interagir avec l'ubiquitine, optineurine, NDP52 et T6BP contiennent une région d'interaction avec LC3, une petite protéine similaire à l'ubiquitine. LC3 est un marqueur de l'autophagie et participe à la biogénèse des autophagosomes (Coutts and La Thangue, 2016). La myosine VI est recrutée sur des autophagosomes LC3-positifs (Tumbarello et al., 2012). Dans ce contexte, NDP52, optineurine et T6BP jouent un rôle central comme adaptateurs de l'autophagie, faisant le lien entre LC3, l'ubiquitine et la myosine VI. Ce réseau aux interactions multiples permet aux différents complexes formés de participer à l'élimination d'agrégats de protéines et de bactéries pathogènes dans la cellule, marqués avec l'ubiquitine, par autophagie.

1.1.3.3.2 - La myosine VI et le cancer

Comme décrit précédemment, la myosine VI, ensemble avec ses multiples partenaires, participe à des fonctions vitales pour les cellules cancéreuses, comme le recyclage de récepteurs membranaires, la migration cellulaire, la signalisation et l'autophagie. La myosine VI est surexprimée dans les glioblastomes, ainsi que dans les cancers de prostate et ovariens (Dunn et al., 2006; Knudsen, 2006; Yoshida et al., 2004). De plus, son expression est régulée par p53 (Jung et al., 2006) et varie selon le stade de la tumeur. La suppression de la myosine VI dans les cellules cancéreuses diminue la migration cellulaire *in vitro* (Dunn et al., 2006).

La perte totale de l'expression de la myosine VI n'est pas létale chez l'organisme adulte (Avraham et al., 1995; Morrison and Miller, 2008). En conséquence, des stratégies visant l'inhibition de l'activité de la myosine VI pourraient efficacement lutter contre la prolifération et la migration tumorale sans engendrer d'effets secondaires trop importants. Un premier inhibiteur de la myosine VI fut découvert en 2012 (Heissler et al., 2012), le 2,4,6-triiodophénol (**figure 16**). Cependant, son mode d'action précis n'est pas connu. De plus, il pourrait avoir des effets « *off-target* » puisqu'il s'agit d'une très petite molécule et

potentiellement non sélective. Le laboratoire « Motilité Structurale » travaille avec une entreprise pharmaceutique américaine, Cytokinetics Ltd., afin de développer et de caractériser des inhibiteurs de la myosine VI plus puissants et sélectifs.

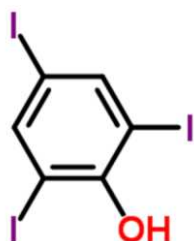


Figure 16 - 2,4,6-triiodophénol (TIP), inhibiteur de l'activité ATPase de la myosine VI

Plusieurs partenaires de la myosine VI sont également impliqués dans le cancer. GIPC1 est un des partenaires les plus étudiés pour son rôle dans le cancer (Chittenden et al., 2010; Singer et al., 2012; Westbrook et al., 2016; Zhang et al., 2016). GIPC1 est surexprimé dans le cancer du sein, de la prostate et de l'ovaire. GIPC1 interagit et stabilise le récepteur de l'IGF1 (IGF1R, Katoh, 2013). L'IGF1R et ses ligands favorisent la prolifération et la survie cellulaire et sont impliqués dans de nombreux types de cancer, car ils ont un rôle clé dans le contrôle de la croissance cellulaire (Favoni and Cupis, 2000). Récemment, de nouvelles stratégies anti-tumorales visent à utiliser des peptides ciblant le domaine PDZ de GIPC1. L'utilisation de ces peptides empêche l'interaction entre le domaine PDZ et ses cibles, majoritairement des récepteurs membranaires. Les résultats montrent que ces peptides inhibent la prolifération des cellules cancéreuses, induisent l'apoptose et sensibilisent les cellules de cancer de pancréas envers des agents thérapeutiques classiques comme la gemcitabine (Pal et al., 2014; Patra et al., 2012).

L'autophagie représente également un nouveau lien avec le cancer. Elle joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie, l'adaptation et la survie des cellules soumises à des conditions de stress (White, 2015). Les cellules cancéreuses ont plus de recours à l'autophagie que les cellules normales suite à l'augmentation de leur métabolisme et aux déficiences propres au microenvironnement tumoral (par exemple, l'autophagie est accrue dans les régions hypoxiques des tissus cancéreux, où elle est essentielle pour la survie des cellules). Les partenaires de myosine VI qui sont des adaptateurs clés de l'autophagie, tels que NDP52 et optineurine, sont également impliqués dans le développement tumoral (Fili et al., 2017; Liu et al., 2014; Meena et al., 2016; Morriswood et al., 2007; Slowicka et al., 2016).

1.1.3.4 - Régulation de l'activité de la myosine VI

La majorité des filaments d'actine dans le cortex cellulaire sont orientés avec l'extrémité négative dirigée vers l'intérieur de la cellule (Begg et al., 1978). La myosine VI se déplaçant vers l'extrémité négative des filaments d'actine, un mécanisme de régulation est donc nécessaire afin que la myosine VI puisse atteindre la périphérie cellulaire et diffuser à travers le réseau dense d'actine du cortex cellulaire. Ceci implique l'existence d'un état inhibé, incapable d'interagir avec l'actine tant qu'un mécanisme spécifique d'activation n'ait lieu (Sweeney and Houdusse, 2007). Une forme inhibée a d'ailleurs été décrite pour plusieurs membres de la superfamille des myosines, comme la myosine II (Alamo et al., 2016; Wendt et al., 2001; Woodhead et al., 2005), la myosine V (Li et al., 2008, 2005; Liu et al., 2006), la myosine VIIa (Sakai et al., 2015; Umeki et al., 2009; Yang et al., 2009) et la myosine X (Umeki et al., 2011).

La myosine VI purifiée se présente sous forme monomérique et compacte (Lister et al., 2004). Dans cet état, le CBD semble interagir avec la tête de la myosine pour former un monomère compact et inactif (Spink et al., 2008, **figure 17**). Cette forme plus compacte serait plus adaptée pour la diffusion dans le cortex cellulaire. Or, les mécanismes régulant l'adoption de cette forme auto-inhibée, ainsi que les signaux permettant son activation, n'ont pas été décrits en détail et sont controversés. Dans le même sens, l'effet des partenaires sur l'état auto-inhibé n'a été que très peu étudié. Par exemple, il n'est pas connu si la myosine VI doit d'abord s'ouvrir avant de pouvoir interagir avec ses partenaires, ou si les partenaires peuvent directement ouvrir et activer la myosine VI. Des partenaires pourraient être nécessaires pour la stabilisation du monomère inactif. C'est le cas de la myosine II cardiaque, qui nécessite la présence de la *Myosin Binding Protein-C* (MyBP-C) pour adopter un état auto-inhibé et inactif (Mcnamara et al., 2017).

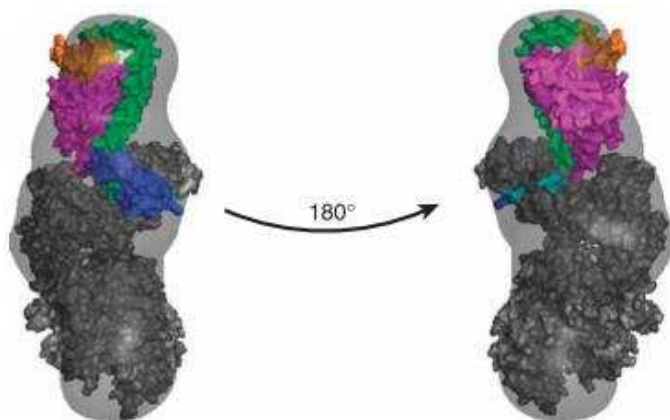


Figure 17 – Modèle de la myosine VI auto-inhibée (Spink et al., 2008)

Récemment, des interactions entre la queue de la myosine VI et la région « cou » (contenant les sites d'interaction avec les CaMs) ont été décrites (Batters et al., 2016). Dans cette étude, les auteurs caractérisent l'interaction entre le CBD et un fragment contenant le domaine moteur, l'insert2, l'IQ et le 3HB (MD^{ins2/IQ/3HB}, résidus 1-913, **figure 6**). Des expériences de *pull-down* ont permis de caractériser de façon plus précise les régions participant à l'interaction. En effet, en absence de calcium, le CBD^N interagit avec la région IQ-apoCaM, mais aucune interaction n'est détectée en présence de calcium. Des expériences de microscopie (coloration négative) ont été interprétées comme permettant de visualiser de légers changements conformationnels dans la région cou selon la concentration en calcium. Avec ces données en main, les auteurs proposent un modèle dans lequel la myosine VI serait auto-inhibée grâce à des interactions entre la région cou et la queue. La présence de calcium permettrait l'ouverture du monomère, et donc l'activation de la myosine VI.

Ces résultats sont cependant controversés. En effet, d'autres études ont montré que des fragments de la myosine VI contenant le domaine moteur et la région cou (1-813, **figure 6**) interagissent avec le CBD (Fili et al., 2017). Or, le fragment 1-813 ne contient pas la région IQ/apo-CaM, indiquant que d'autres interactions ont lieu en plus de celle observée entre le CBD^N et la région IQ/apo-CaM. De plus, les auteurs décrivent que le calcium n'aurait pas d'effet sur ces interactions. Un modèle décrivant les interactions intra-moléculaires permettant l'adoption de l'état auto-inhibée pour la myosine VI est donc nécessaire afin de comprendre comment son activité est régulée dans la cellule.

1.1.3.4.1 - La dimérisation de la myosine VI

La dimérisation proximale de la myosine VI est encore très controversée. Il a été proposé que la myosine VI adopte une forme dimérique pour la plupart de ses fonctions dans la cellule (Sweeney and Houdusse, 2010a). En tant que transporteur, la coordination entre les deux têtes est nécessaire pour optimiser la processivité du moteur. En effet, dans une myosine VI dimérique, l'association et la coordination des deux têtes permet de « marcher » le long du filament d'actine avec au moins une tête toujours associée à l'actine. Des études ont montré que l'association de plusieurs monomères sur une même vésicule permettrait aussi son transport (Sivaramakrishnan and Spudich, 2009). Dans ce cas, la présence de plusieurs monomères garantit également qu'au moins une myosine VI reste toujours attachée à l'actine. D'un autre côté, la coordination entre les deux têtes d'une myosine VI dimérique semble critique pour son rôle d'ancrage (Sweeney and Houdusse, 2010a) ; ceci n'a cependant pas été étudié par des expériences *in vitro*.

D'autre part, nous n'avons que très peu de données empiriques sur les signaux permettant la dimérisation de la myosine VI dans la cellule. De plus, la région (ou régions) exacte participant à la dimérisation n'a pas été décrite. Un premier modèle a proposé que la dimérisation ait lieu uniquement au niveau du CBD (Spink et al., 2008, **figure 18a**). Dans ce modèle, le SAH est assez rigide pour permettre l'extension du bras de levier, permettant à la myosine VI d'effectuer des pas d'environ 30 nm (**figure 18a**). Dans ce modèle le 3HB formerait un faisceau compact, comme il a été observé dans la structure cristallographique (**figure 8**), et la dimérisation aurait lieu uniquement à travers de la partie C-terminale. Cette dimérisation serait favorisée par la liaison aux partenaires, comme Dab2 (**figure 14**). Ce modèle semble en accord avec les mesures en molécule unique montrant que la substitution du domaine C-ter de la myosine VI (résidus 992-fin) par un domaine de dimérisation (une glissière à leucines, GCN4) permet à la myosine VI d'effectuer des pas identiques à ceux mesurés par la myosine VI sauvage entière (Park et al., 2006).

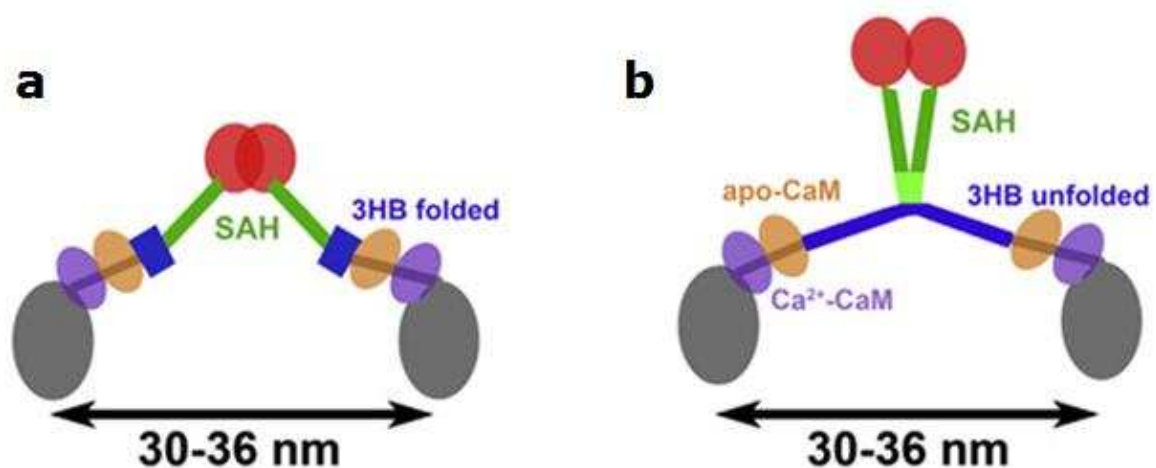


Figure 18 – Deux modèles de dimérisation de la myosine VI (Mukherjea et al., 2014)

(a) Une dimérisation médiée uniquement par le partenaire interagissant avec le CBD (rouge, (Spink et al., 2008)). **(b)** Une dimérisation interne dans la région proximale est proposée impliquant le dépliement du 3HB. Les deux modèles sont compatibles avec la longueur des pas observés pour la myosine VI *in vitro*, 30-36 nm.

Or, une myosine VI tronquée au résidu 940 est également capable de dimériser et d'effectuer des pas de ~30 nm (Park et al., 2006), indiquant que dans la myosine VI sauvage la dimérisation se produit avant le résidu 940. Un domaine de dimérisation interne doit donc se trouver entre les résidus 834 (fin du motif IQ) et 940 (**figure 6**). La queue proximale de la myosine VI est formée par un triple faisceau d'hélices (3HB, **figure 8**). Les trois hélices interagissent étroitement grâce aux résidus hydrophobes présents dans cette

région, formant un faisceau très compacte. Or, il a été proposé que, dans le contexte d'une myosine VI entière et dimérique, le 3HB n'est pas stable et se déplie lorsque la myosine VI dimérise (Rock et al., 2005), formant alors trois hélices α séparées, connectées par des articulations (**figure 19**). Des expériences de FRET confirment cette hypothèse (Mukherjea et al., 2009). Afin de rigidifier et de stabiliser ces hélices, une troisième CaM est recrutée sur cette région (Mukherjea et al., 2014) après la dimérisation. Une fois ouvert, des résidus hydrophobes du 3HB seraient exposés et participeraient à la dimérisation de la myosine VI (Mukherjea et al., 2009, 2014).

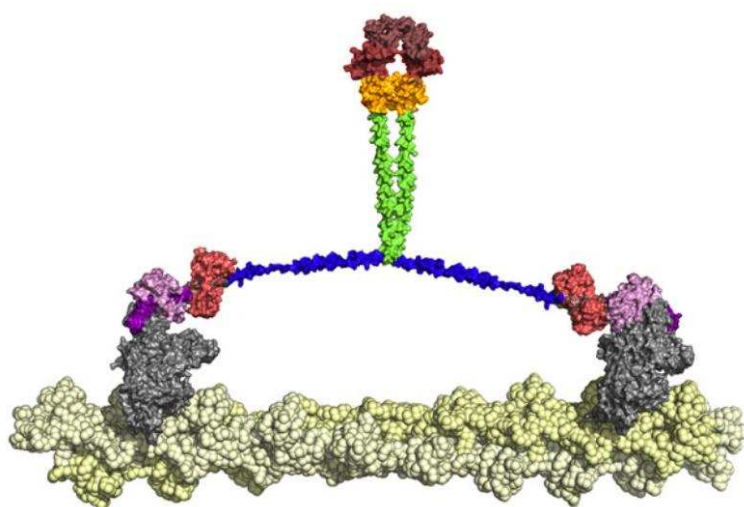


Figure 19 – Modèle d'une myosine VI dimérique (Mukherjea et al., 2009)

Dans ce modèle, le 3HB est déplié et participe à l'extension du bras de levier.

Afin de vérifier ce modèle, deux types d'expériences ont été mises en place (Mukherjea et al., 2014) :

Dans un premier cas (**figure 18a**) le début du SAH (résidus 922-935, **figure 20**) est remplacé par un « SAH parfait ». En effet, le début de la séquence du SAH présente plusieurs résidus hydrophobes (**figure 20**) et il a été proposé que la fin du 3HB et le début du SAH participent à la dimérisation de la myosine VI (Mukherjea et al., 2009; Sweeney and Houdusse, 2010a). Afin d'éliminer cette possibilité, le début du SAH est remplacé par un SAH canonique, éliminant ainsi les résidus hydrophobes présents dans cette région, rendant impossible la dimérisation proximale. Afin de forcer la dimérisation C-terminale, un domaine GCN4 est introduit après le résidu 991, remplaçant le CBD. Dans ce contexte, le 3HB est fermé et le SAH assure l'extension du bras de levier. Des mesures de motilité *in vitro* montrent que cette myosine VI est capable d'effectuer des pas d'environ 30-36 nm, comme la myosine VI sauvage (Mukherjea et al., 2014).

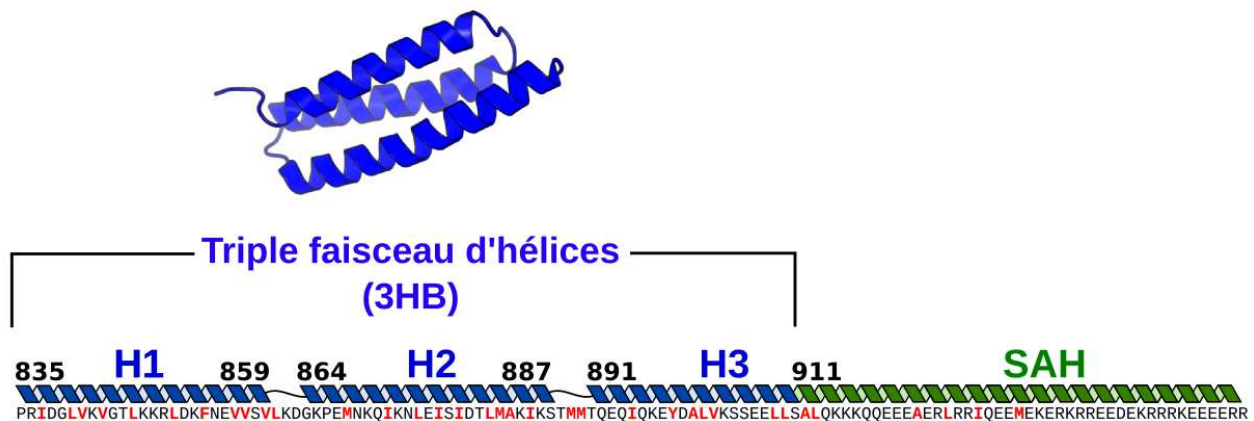


Figure 20 – Représentation schématique de la région proximale de la queue de la myosine VI

D'un autre côté, et afin de tester si le SAH fait partie du bras de levier (ce qui exclurait une dimérisation interne) (**figure 18b**), le SAH est raccourci en éliminant 37 résidus (947-978). Dans ce modèle, le SAH ne participe pas à l'élongation du bras levier, mais il aurait le rôle d'un espaceur entre les domaines de liaison à l'actine et les cargos reconnus par le CBD. Ainsi, un SAH raccourci ne devrait pas avoir d'impact majeur sur la motilité *in vitro* de la myosine VI. De plus, le 3HB doit être déplié afin de permettre cette longueur de pas. Des expériences *in vitro* ont montré que ce construit est en effet capable de dimériser et d'effectuer des pas processifs de 30-36 nm (Mukherjea et al., 2014). Dans cette expérience, la longueur du SAH n'a donc pas d'effet sur les pas effectués par la myosine VI. De plus, elle montre que le 3HB, une fois déplié et stabilisé par la CaM, est assez rigide pour permettre la coordination entre les deux têtes de la myosine VI.

Afin de tester si ces diverses myosines VI, mimant *in vitro* la motilité observée pour la myosine VI entière, sont également actives *in vivo*, des fibroblastes dérivés de la souris *Snell's waltzer* (sans myosine VI) ont été transfectés avec les deux types de formes mutantes de myosine VI. Très étonnamment, seules les cellules exprimant une myosine VI avec une dimérisation interne (**figure 18b**) ont des taux d'endocytose comparables à ceux obtenus avec une myosine VI sauvage. Dans le même sens, la morphologie de l'appareil de Golgi est à nouveau retrouvée (comme pour les fibroblastes comportant la myosine VI sauvage) uniquement dans les cellules avec une dimérisation proximale.

Ces expériences montrent pour la première fois que des moteurs fonctionnels *in vitro* peuvent ne pas être adaptés pour leur fonction *in vivo*. En effet, les deux fonctions choisies dans cette étude (endocytose et maintien de la morphologie de l'appareil de Golgi)

pourraient représenter les deux types de rôle que la myosine VI peut effectuer dans la cellule : transport et ancrage. La liaison à des partenaires capables de dimériser le CBD de la myosine VI, tels que l'optineurine (Phichith et al., 2009), augmenterait la concentration locale des monomères de myosine VI et favoriserait la dimérisation interne. Il faut noter que l'on ne peut pas exclure que des myosines VI dimérisant uniquement au niveau du CBD pourraient être plus adaptées pour d'autres fonctions non étudiées par les auteurs.

De plus, ces résultats montrent également que la morphologie de la myosine VI doit être adaptée à la fonction exacte effectuée dans la cellule. En effet, la myosine VI, et les myosines en général, sont des moteurs avec une régulation très fine de leur activité. La morphologie et la dimérisation jouent donc un rôle clé dans la régulation des fonctions que les moteurs peuvent effectuer dans la cellule. Les différents partenaires interagissant avec la myosine VI pourraient guider l'adoption de différentes morphologies. Ainsi, le recrutement de la myosine VI par ses partenaires cellulaires aurait une double fonction : ils dicteraient l'endroit de la cellule où l'activité du moteur est nécessaire, mais ils seraient aussi les responsables de la dimérisation d'une myosine VI adaptée pour la fonction qu'elle doit réaliser.

De plus, comme il a été décrit précédemment, la fonction exacte que la myosine VI effectue dans les nombreuses fonctions cellulaires où elle a été impliquée n'est pas connue. Dans certaines elle pourrait agir en tant que transporteur, tandis que d'autres nécessiteraient une myosine VI capable d'ancrer. Ainsi, une myosine VI processive pourrait avoir une morphologie différente à une myosine VI qui ancre. Cette régulation pourrait donc être accomplie également par des partenaires, façonnant la myosine VI selon la fonction qu'elle doit effectuer dans la cellule.

1.1.4 Objectifs

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse concernant la myosine VI et ses partenaires.

Un premier objectif pour ma thèse a été de mieux comprendre le mécanisme régulant et permettant l'adoption de l'état auto-inhibé, ainsi que l'activation du moteur. Des expériences de SAXS, de dispersion de la lumière, de microscopie, d'interaction et de mutagenèse ont permis de montrer que des interactions ont lieu entre la tête de la myosine VI et sa queue C-terminale. Cette interaction est dépendante du nucléotide présent dans la poche du moteur. De plus, des interactions supplémentaires, régulées par le calcium, ont lieu entre la région cou et le CBD de la myosine VI. Ainsi, en présence de calcium, la myosine VI s'ouvre et peut être recrutée par ses partenaires cellulaires.

Le deuxième objectif a été de caractériser l'interaction entre la myosine VI et ses partenaires cellulaires. Parmi les nombreux partenaires de la myosine VI, je me suis principalement intéressé à GIPC1, une protéine adaptatrice qui sert d'intermédiaire entre la myosine VI et de nombreux récepteurs membranaires. La structure RMN du domaine C-terminale de GIPC1, responsable de l'interaction avec la myosine VI, a permis de caractériser comment cette reconnaissance a lieu. De plus, l'interaction avec GIPC1 promeut, de façon indirecte, la dimérisation et l'activation de la myosine VI. La région exacte de dimérisation a également été définie. De plus, il a également été montré que le CBD de la myosine VI peut interagir en même temps avec plusieurs partenaires, comme GIPC1 et TOM1. La comparaison des résultats obtenus avec d'autres partenaires (NDP52 et optineurine) suggère que tous les partenaires de la myosine VI n'interagissent pas de la même façon, et que des mutants sélectifs pourraient être envisagés.

1.II Résultats et discussion

La myosine VI est une myosine très particulière car elle est la seule à se déplacer vers l'extrémité négative des filaments d'actine. Une fois produite, la myosine VI se présente sous forme monomérique (Lister et al., 2004; Phichith et al., 2009) et adopte une forme auto-inhibé grâce à des interactions entre la tête de la myosine et la queue (Batters et al., 2016; Fili et al., 2017; Spink et al., 2008). Dans la cellule, le recrutement et la régulation de son activité se fait notamment par son domaine C-terminal, le « *Cargo Binding Domain* » (domaine de liaison aux cargos, ou CBD) interagissant avec différentes protéines adaptatrices. Grâce à ces interactions, la myosine VI peut produire une force spécifique à des moments et à des localisations cellulaires très précises pour contrôler le transport de vésicules, la morphologie et la maturation d'organelles ou pour assurer l'ancrage de structures cellulaires.

Une première structure du CBD de la myosine VI en complexe avec un peptide de Dab2 a été publiée en 2009 (Yu et al., 2009). Cette structure montre que Dab2 est capable de dimériser, indirectement, le CBD de la myosine VI (**figure 14**) et donc de la rendre processive. Suite à l'apparition de cette structure, plusieurs modèles décrivant le dimère actif de la myosine VI ont été proposés (Sweeney and Houdusse, 2010a). Ces modèles montrent que plusieurs formes de dimérisation sont envisageables (**figure 18**). Ils soulignent également que les partenaires interagissant avec la myosine VI pourraient, en fait, dicter la formation de dimères actifs différents, qui pourraient ainsi être adaptés à réaliser une action particulière (transport/ancrage).

L'objectif du projet a été de caractériser la forme auto-inhibée (inactive) de la myosine VI, ainsi que les complexes formés par la myosine VI avec plusieurs de ses partenaires, notamment GIPC1, TOM1, NDP52 et Optineurine.

1.II.1 Identification et production de construits contenant le CBD de la myosine VI

1.II.1.1 - Généralités sur le CBD de la myosine VI

Historiquement la queue de la myosine VI a été divisée en différents sous-domaines (**figure 21**) : la queue proximale (*proximal tail* ou 3HB, résidus 835-911), la queue médiale ou SAH (*medial tail*, rés. 912-978), la queue distale (*distal tail*, rés. 979-1036) et le domaine de liaison aux cargos (*cargo binding domain* ou CBD, rés. 1069-1294 en utilisant l'isoforme humaine la plus longue comme référence) ; la séquence d'épissage alternatif LI (long insert) s'insère entre la queue distale et le CBD.

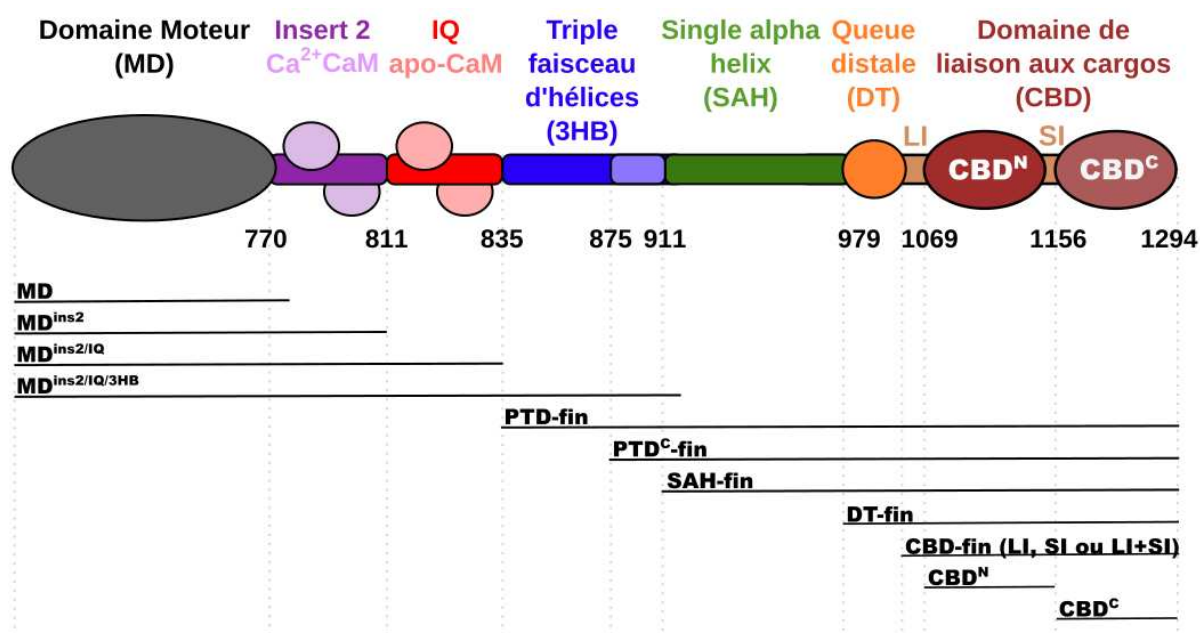


Figure 21 – Fragments utilisés pour l'étude de la myosine VI

Pendant les premières années de ma thèse j'ai essayé de trouver les construits adéquats pour l'étude structurale de la queue de la myosine VI, seule et en interaction avec ses partenaires (**figure 21**). Dans les sections à venir, un grand nombre de construits est donc utilisé pour des études biophysiques et d'interaction. Afin de faciliter la lecture des résultats, voici une liste des fragments les plus importants, parmi les plus de 70 construits essayés (ils sont ensuite caractérisés dans la section 1.II.1.2) :

- Construits 1069-fin (**CBD-fin**), contenant le CBD entier. Le CBD peut aussi être divisé en deux sous-domaines :
 - a. Construits 1069-1146 (**CBD^N**), comportant uniquement la première moitié du CBD ;
 - b. Construits 1166-1294 (**CBD^C**), comprenant la deuxième partie du CBD.
- Construits 979-fin (**DT-fin**), commençant à partir de la queue distale ;
- Construits 912-fin (**SAH-fin**), commençant à partir du SAH ;
- Construits 875-fin (**PTD^C-fin**), contenant la fin de la queue proximale, le SAH, la queue distale et tout le CBD ;
- Construit 834-fin (**3HB-fin**), contenant toute la queue de la myosine VI, en commençant par la séquence du 3HB.

Sauf précision contraire, tous les construits étudiés contiennent le petit insert (SI) présent entre les sous-domaines CBD^N et CBD^C (rés. 1147-1155, **figure 21**). Pour étudier son effet, certains construits sans cet insert (isoforme NI) ont été utilisés. De la même façon, pour étudier le rôle du grand insert (LI, rés. 1037-1068, **figure 21**), des construits comportant les deux inserts (SI et LI) ont été utilisés (isoforme LI+SI).

1.II.1.2 - Caractérisation biophysique des principaux construits contenant la queue de la myosine VI

1.II.1.2.1 - CBD-fin

Le fragment CBD (résidus 1069 jusqu'à la fin, 1069-1294) comprend la totalité du domaine de liaison aux cargos. Il contient les deux principaux motifs d'interaction avec les partenaires (Buss and Kendrick-Jones, 2011) : RRL et WWY. Il contient également les domaines de liaison au PIP₂ (Spudich et al., 2007) et à l'ubiquitine (He et al., 2016). Ainsi, ce fragment a été étudié seul, mais il a également été utilisé pour l'analyse de l'interaction entre le CBD de la myosine VI et plusieurs de ses partenaires (voir section 1.II.3 de ce chapitre : « Caractérisation de l'interaction entre la myosine VI et ses partenaires cellulaires »).

Le CBD isolé de la myosine VI a été décrit comme présentant des problèmes de solubilité et d'agrégation (Yu et al., 2009) malgré l'utilisation d'une relativement forte concentration de sel (300 mM NaCl) et de détergents. Il faut remarquer que la partie C-

terminale du CBD contient le motif de liaison « WWY », de caractère très hydrophobe. En effet, l'analyse de la structure de ce sous-domaine (**figure 22**) montre que ce motif est complètement exposé sur la surface et qu'il pourrait favoriser les interactions non-spécifiques entre les molécules. Ainsi, les premiers essais effectués avec le fragment CBD révèlent une protéine produite dans la fraction soluble chez *E. coli*. Cependant, après purification la protéine est très peu soluble et ne peut pas être concentrée au-delà de 0.5 mg/ml (~10 μ M).

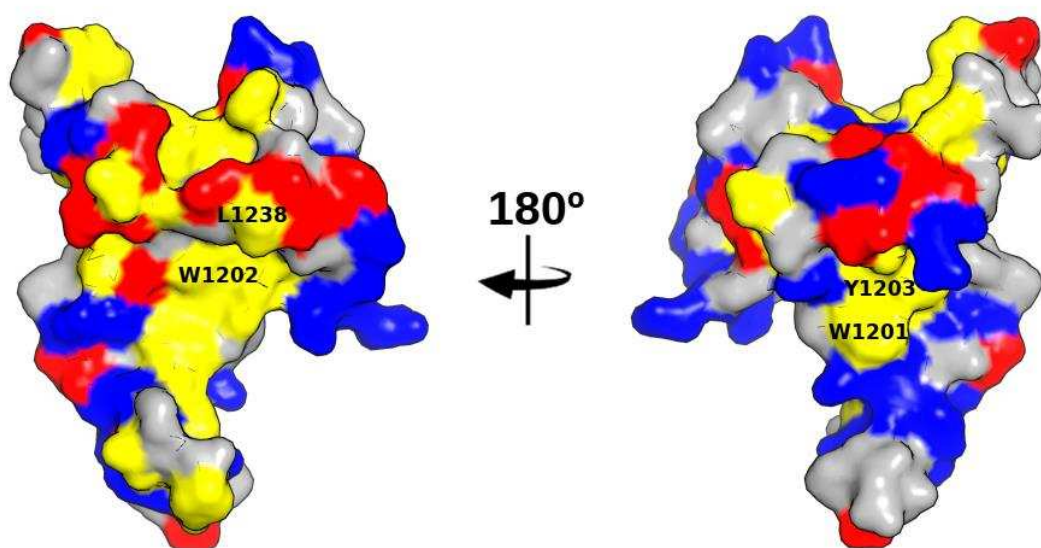


Figure 22 – Le motif WWY est exposé

Le motif ¹²⁰¹WWY¹²⁰³ présent sur le CBD^C de la myosine VI est exposé à la surface. Avec la leucine 1238, aussi présente à la surface, ces résidus forment une région au caractère très hydrophobe (jaune) sur la surface du CBD. Les résidus chargés sont représentés en rouge (Glu et Asp) et bleu (Lys et Arg).

Dans un premier temps, des mutations ponctuelles sur des résidus de surface ont été introduites afin d'améliorer la solubilité de ce fragment. La mutation L1238K a été décrite comme capable d'augmenter la solubilité du domaine (Yu et al., 2009). L'introduction de cette mutation avait permis d'ailleurs la résolution de la structure de la partie C-terminale du CBD, CBD^C (Yu et al., 2009, résidus 1174-fin). J'ai donc décidé d'introduire cette mutation sur le CBD entier. Cette mutation permet en effet d'augmenter légèrement la solubilité du fragment mais, comme le construit sauvage, il est perdu par agrégation avant d'atteindre une concentration adéquate pour les essais de cristallisation et d'interaction avec les partenaires.

J'ai également testé la double mutation du motif « WWY » en « KKY » (WW1201KK) afin de réduire la surface hydrophobe du domaine. L'utilisation du triple mutant L1238K+WW1201KK permet la purification du CBD entier isolé dans un tampon de moindre force ionique (100 mM NaCl/KCl). Dans ces conditions, la concentration maximale atteinte est de ~10 mg/ml (soit ~370 μ M). L'analyse par SEC-MALS révèle un pic correspondant à une espèce quasi homogène de 27 kDa avec une concentration de protéine dans le pic de 2.7 μ M (**figure 23, tableau 1**). La taille théorique du monomère étant de 26.8 kDa, ces résultats montrent que la protéine est monomérique en solution dans ces conditions. De plus, l'analyse par SAXS révèle que le Rg (le rayon de giration, défini comme la moyenne du carré des distances au centre de masse de la molécule et qui peut être utilisé pour estimer la taille globale de la molécule) est stable et n'augmente pas en fonction de la concentration de protéine (**tableau 2**), confirmant que l'état oligomérique de la protéine ne varie pas selon la concentration de protéine utilisée. Il est important de remarquer que la mutation L1238K empêche la liaison de Dab2, un partenaire utilisant le site WWY pour sa liaison sur le CBD de la myosine VI (Yu et al., 2009). Ceci est donc aussi le cas pour le triple mutant. En fait, le mutant WWY>WLY est suffisant pour abroger l'interaction avec des partenaires tels que LMTK2 (Chibalina et al., 2007) ou TOM1 (Tumbarello et al., 2012).

Afin de travailler avec un construit capable d'interagir avec la plupart de partenaires, d'autres stratégies ont été menées dans le but d'augmenter la solubilité de ce fragment. Après plusieurs approches, la fusion de la protéine jaune fluorescente (« *Yellow Fluorescent Protein* », ou YFP) en N-terminale, suivie d'un site de coupure spécifique à la protéase TEV (protéase du virus de la gravure du tabac), permet également d'augmenter la solubilité du construit de fusion. Comme pour le fragment CBD muté (**figure 23, tableau 1**), la protéine est monomérique et reste monodisperse. Suivant la même stratégie, trois isoformes différentes ont été produites (**figure 21**) afin de caractériser notamment son interaction avec les partenaires (voir section 1.II.3 de ce chapitre : « Caractérisation de l'interaction entre la myosine VI et ses partenaires cellulaires ») :

- **CBD Isoforme SI** : contenant le SI (petit insert) mais pas le LI (rés. 1037-1068) ;
- **CBD Isoforme NI** : ne contenant aucun insert ;
- **CBD Isoforme LI+SI** : contenant les deux inserts (rés. 1037-fin).

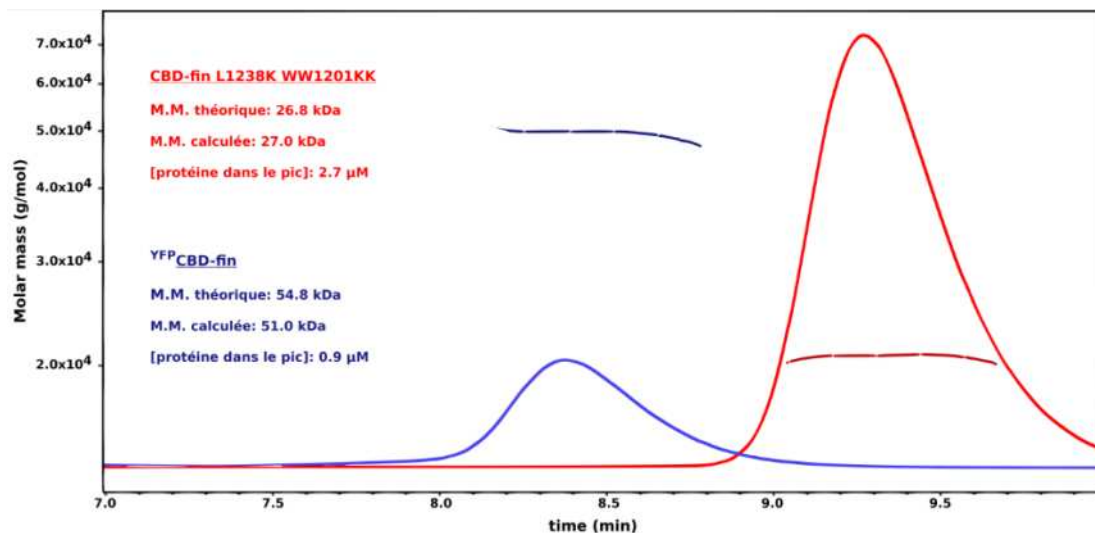


Figure 23 – Le CBD de la myosine VI est monomérique

Analyse par SEC-MALS des construits CBD-fin (L1238K + WW1201KK) et ^{YFP}CBD-fin montrant le signal du réfractomètre (bleu et rouge) et la masse moléculaire (M.M, lignes horizontales bleue et rouge) en fonction du temps d'élution (minutes). La concentration de protéine dans le pic est également indiquée. La colonne est équilibrée et éluée avec 20 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl et 1 mM TCEP.

Tableau 1 – Caractérisation par MALS des fragments du CBD de la myosine VI

Protéine	Résidus	Concentration de protéine (μ M)	MM mesurée (kDa)	MM théorique (kDa)	MM mes/théor [#]
CBD-fin _{L1238K-WW1201KK}	1069-fin	2.7	27.0	26.8	1.0
YFP-CBD-fin	1069-fin	0.9	51.0	54.8	0.9
SAH-fin	912-fin	1.0	45.3	43.1	1.1
		140.0 ⁽¹⁾	38.0	43.1	0.9
PTD^c-fin	875-fin	0.4	51.1	47.3	1.1
		18 ⁽¹⁾	45.6	47.3	1.0
3HB-fin	834-fin	3.8	51.2	51.8	1.0
		135.0 ⁽¹⁾	66.6	51.8	1.3

[#]Rapport entre les masses moléculaires mesurées et théoriques.

⁽¹⁾ Injection directe (voir méthodes, page 130)

Tableau 2 – Caractérisation par SAXS des fragments contenant le CBD de la myosine VI

Protéine	Résidus	Concentration	Rg (Å)	I ₍₀₎	MM calculé [#] (kDa)
CBD-fin _{L1238K-WW1201KK}	1069-fin	0.4 mg/ml (13 μ M)	26.2 $\pm$ 1.97	0.0057	24.6
		3.4 mg/ml (127 μ M)	24.5 $\pm$ 0.88	0.0650	28.7
PTD^c-fin	875-fin	1.0 mg/ml (17 μ M)	48.2 $\pm$ 1.04	0.0333	50.6
		2.0 mg/ml (43 μ M)	46.3 $\pm$ 0.25	0.0725	53.5

[#]Pour plus de détails concernant le calcul de la masse moléculaire expérimentale, voir méthodes, page 131

Comme décrit précédemment, le domaine CBD contient deux motifs principaux de liaison aux partenaires : RRL et WWY. Dans le but d'étudier chaque sous-domaine séparément, des fragments du CBD ont aussi été produits :

- Construit 1069-1146 (**CBD^N**), comportant uniquement la première partie du CBD. Il contient le motif de liaison aux partenaires « RRL », ainsi que le site de liaison à PIP₂. Des structures RMN de différents petits fragments de ce sous-domaine ont été récemment résolues et caractérisées (Wollscheid et al., 2016).
- Construit 1166-1294 (**CBD^C**), comprenant la deuxième partie du CBD, dont le motif de liaison « WWY ». Ce fragment n'est soluble qu'avec la mutation L1238K (Yu et al., 2009, L1209K selon l'isoforme utilisée par les auteurs). Il est monomérique en solution et la structure RMN est disponible (PDB 2KIA, Yu et al., 2009).

1.II.1.2.2 - DT-fin

La structure d'une partie de la queue distale de la myosine VI isolée a été récemment résolue par RMN (He et al., 2016, PDB 2N11, rés. 998-1071). Le fragment est composé de trois hélices α connectées par des régions flexibles. Le fragment isolé ne montre aucune structure tertiaire (**figure 10**) mais il faut bien sûr retenir que ce pourrait être un artefact lié à l'étude d'un très petit fragment en dehors du reste de la structure. Afin d'étudier le rôle de la queue distale, des fragments contenant ce domaine en plus du CBD entier ont donc été produits.

Le fragment DT-fin présente les mêmes difficultés que le fragment CBD-fin pour sa purification. Une fusion YFP-TEV-DT-fin a été utilisée, permettant la purification d'une protéine stable et monomérique.

1.II.1.2.3 - SAH-fin

Le SAH (« *single alpha helix* ») correspond à une région de la myosine VI composée par une succession d'environ quatre résidus chargés négativement (notamment Glu) et quatre résidus chargés positivement (Arg et Lys) capable d'adopter une structure en hélice α stable en solution (Sivaramakrishnan et al., 2008; Spink et al., 2008; Wolny et al., 2017)

Contrairement aux fragments CBD-fin et DT-fin, le construit SAH-fin (contenant le SAH, la DT et le CBD) peut être produit chez *E. coli* et purifié très facilement de façon isolé à faible force ionique (50 mM NaCl). En effet, l'hélice SAH est très chargée lui permettant de

gagner en solubilité. Comme les fragments précédents, l'analyse par SEC-MALS montre que la protéine est monomérique en solution (**tableau 1**). De la même façon, l'analyse par DLS révèle un échantillon homogène et très peu polydisperse (11.7% de polydispersité).

Des résultats très similaires ont été obtenus en utilisant ce même fragment purifié à partir de cellules d'insecte *Sf9*, indiquant que la production dans des cellules eucaryotes n'entraîne pas de changements majeurs dans le comportement du fragment. Afin de confirmer ces résultats, des tests fonctionnels de liaison aux partenaires ont été effectués sur les deux protéines (voir section 1.II.3 de ce chapitre : « Caractérisation de l'interaction entre la myosine VI et ses partenaires cellulaires ») ainsi qu'une étude par SAXS.

1.II.1.2.4 - 3HB-fin

Finalement, ce construit a été conçu pour étudier la dimérisation interne de la myosine VI en plus de la liaison aux partenaires. Il contient la région C-terminale du « *three helix bundle* » présent dans la queue proximale. En effet, selon le modèle proposé (Mukherjea et al., 2014; Sweeney and Houdusse, 2010a), dans le contexte de la myosine VI entière le faisceau d'hélices s'ouvre, par exemple, suite à la présence de signaux cellulaires ou grâce à la liaison à un partenaire, pour participer à l'association avec une autre molécule de myosine VI, permettant ainsi sa dimérisation (Mukherjea et al., 2009). Deux fragments ont été caractérisés :

- **PTD^C-fin** : commençant à l'intérieur de la deuxième hélice du triple faisceau d'hélices (résidus 875-fin, **figure 21**). Le faisceau est donc artificiellement ouvert par troncation N-terminale.
- **3HB-fin** : contenant les résidus 834 jusqu'à la fin (834-fin). Il comprend donc la totalité du faisceau d'hélices, le SAH, la DT et le CBD.

Dans les deux cas, l'analyse par SEC-MALS révèle un pic correspondant à une espèce monomérique homogène (**tableau 1, figure 24**). À plus haute concentration, les fragments sont également monomériques (**tableau 1**). Le fragment PTD^C-fin a également été analysé par SAXS. Les résultats obtenus montrent que le R_g n'augmente pas en fonction de la concentration de protéine (**tableau 2**), confirmant que l'état oligomérique est stable et qu'il ne varie pas selon la concentration de protéine utilisée. La dimérisation de ces fragments dans le contexte de l'interaction avec les partenaires a été étudié en détail dans la section 1.II.3.1.2.4, page 75.

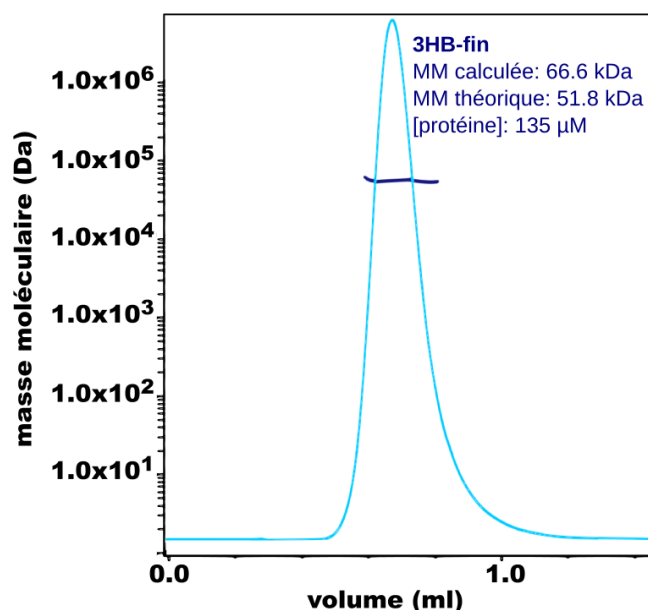


Figure 24 – La queue de la myosine VI est monomérique

Analyse par MALS (injection directe) du fragment 3HB-fin montrant le signal sortant du réfractomètre (bleu clair) et la masse moléculaire (M.M, bleu foncé). La concentration de protéine dans le pic est également indiquée.

1.II.2 Activation de la myosine VI

La principale forme de régulation de l'activité de la myosine VI implique le repliement sur elle-même pour adopter un état auto-inhibé (Batters et al., 2016; Fili et al., 2017; Lister et al., 2004; Masters et al., 2016; Spink et al., 2008), prévenant l'activité du domaine moteur. L'adoption de cette conformation permet une meilleure diffusion dans la cellule et à travers le réseau d'actine corticale pour atteindre sa localisation définitive.

L'état auto-inhibé de la myosine VI implique des interactions entre la tête de la myosine et la queue (Spink et al., 2008), et plusieurs modèles ont été proposés (Batters et al., 2016; Fili et al., 2017; Spink et al., 2008; Spudich et al., 2007). En plus, l'effet des signaux tels que le calcium est controversé et des résultats en apparence contradictoires ont été récemment publiés (Batters et al., 2016; Fili et al., 2017).

L'objectif de cette partie du projet a été de caractériser les régions exactes participant à l'interaction, l'état devant être adopté par le domaine moteur pour permettre ces interactions ainsi que l'effet du calcium pour l'activation de la myosine VI.

1.II.2.1 - Caractérisation de la forme inactive

La myosine VI entière (M6-FL) se produit et se purifie correctement à partir de cellules d'insecte *Sf9* avec le système de baculovirus. Une fois purifiée, le premier objectif a été de caractériser la M6-FL afin de savoir si elle est repliée sur elle-même et adopte une forme compacte.

Pour répondre à cette question j'ai opté pour l'utilisation du SAXS. En effet, les courbes de diffusion obtenues par SAXS sont très informatives de la taille de la particule étudiée et permettent de calculer son R_g et son D_{max} . La comparaison de ces deux paramètres permet donc d'obtenir des informations clés sur les changements conformationnels qui ont lieu en solution dans différentes conditions. La caractérisation de la forme inactive de la myosine VI est très adaptée à ce type d'analyses, puisque la différence en taille entre la forme auto-inhibée et la forme ouverte devrait être très importante.

Comme pour la myosine V (Li et al., 2008, 2005; Liu et al., 2006), le domaine moteur de la myosine VI participe très probablement aux interactions intramoléculaires requises pour stabiliser la forme auto-inhibée. Il est important de remarquer que la conformation adoptée par le domaine moteur et le cou de la myosine VI est drastiquement différente dans les différentes étapes du cycle ATPase (Ménétreay et al., 2005, 2007, 2012). Dans un premier temps, la dépendance de la conformation de M6FL vis-à-vis du nucléotide présent dans la poche du domaine moteur a donc été étudiée. Les expériences SAXS (**tableau 3**) montrent que la M6-FL adopte une conformation moins compacte quand elle se retrouve sans nucléotide. En présence de $MgADP.VO_4$ (un analogue du $MgATP$ hydrolysé, $MgADP+P_i$, Goodno, 1979; Houdusse et al., 2000; Smith and Rayment, 1996) la myosine est stabilisée. La M6-FL adopte donc différentes conformations en solution selon le nucléotide présent dans le domaine moteur. La courbe SAXS de l'échantillon avec $MgADP.VO_4$ a également été utilisée pour calculer une enveloppe 3D de la forme plus compacte (**figure 25a**) permettant le placement des domaines déjà cristallisés de la myosine VI (résidus 1-913). Ce modèle suggère que les régions non connues de la myosine VI (le SAH, DT et une grande partie du CBD) reviendraient en arrière pour interagir avec le domaine moteur et le début du bras de levier (voir aussi section 1.II.2.2). Afin de vérifier que la myosine VI est en effet repliée sur elle-même en présence de $MgADP.VO_4$, des grilles de microscopie ont été préparées par coloration négative. En effet, la plupart des particules observées adoptent une conformation très compacte, compatible avec les paramètres mesurés par SAXS (**figure 25b**).

Tableau 3 – La myosine VI adopte une forme compacte en présence de MgADP.VO₄

Condition	Rg (Å) [#]
Sans nucléotide	63 ± 0.2
MgADP.VO ₄	48 ± 0.3
Sans nucléotide +3 mM CaCl ₂	64 ± 0.5
MgADP.VO ₄ +3 mM CaCl ₂	63 ± 1.1

[#]Rg calculé avec l'approximation de Guinier

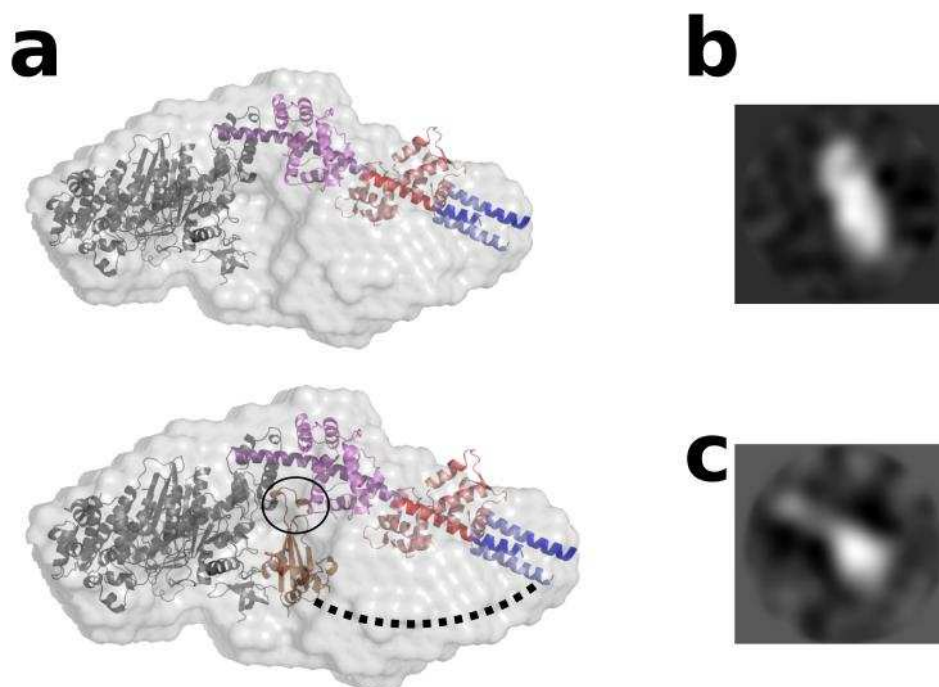


Figure 25 – Modèle de la myosine VI auto-inhibée

(a) Représentation de l'enveloppe SAXS (gris clair) *ab initio* obtenue avec le programme DAMMIF (Franke and Svergun, 2009) (valeurs obtenues $\chi^2 = 0.697$, Dmax du construit de 185 Å). 20 modèles sont alignés et moyennés pour calculer le modèle le plus probable avec DAMAVER (Volkov and Svergun, 2003). Les structures connues de la myosine VI ont été introduites manuellement dans l'enveloppe (PDB 4ANJ contenant le domaine moteur en noir et l'insert2/CaM en violet dans l'état PPS; PDB 3GN4, avec l'insert2/CaM en violet, l'IQ/apo-CaM en rouge, et le 3HB en bleu). Le modèle complet a été construit en utilisant la région insert2/CaM comme référence présent dans les deux structures. En bas, l'espace vide suggère que le reste de la molécule (ligne pointillée, plus le CBD^c en marron) reviendrait proche du domaine moteur pour interagir avec lui. Des contacts intra-moléculaires entre la queue et le bras de levier sont aussi probablement établis. La boucle β A- β B dans le CBD^c (voir aussi **figure 26**) est indiquée avec un cercle noir.

(b, c) Moyennes représentatives des particules observées par coloration négative en microscopie électronique avec (b) MgADP.VO₄ et (c) sans nucléotide. Dans la condition avec MgADP.VO₄ la particule mesure ~19 nm, ce qui est compatible avec la distance Dmax mesurée par SAXS. Les moyennes ont été générées et classifiées avec le logiciel RELION (Scheres, 2012), avec 100 particules environ dans chaque cas.

Récemment, des études ont montré que la présence de calcium (Ca^{2+}) a un effet sur le repliement de la M6-FL (Batters et al., 2016) : l'addition de calcium produirait un changement conformationnel permettant l'activation de la myosine VI. Afin de vérifier cette hypothèse, les mêmes expériences de SAXS ont été reproduites en présence de 3 mM CaCl_2 . En effet, l'introduction de calcium dans le tampon entraîne une augmentation de la taille calculée de la particule, et ce même en présence de MgADP.VO_4 (**tableau 3**). Il est important de noter qu'avec $\text{MgADP.VO}_4 + \text{CaCl}_2$, les paramètres calculés sont très similaires à ceux obtenus sans nucléotide, suggérant que ces dimensions sont caractéristiques de la molécule ouverte. Ce changement est également observé par microscopie électronique (**figure 25c**). Le Ca^{2+} permet donc de libérer l'état auto-inhibé, ouvrant la myosine VI.

1.II.2.2 - Analyse des interactions entre la tête et la queue de la myosine VI

1.II.2.2.1 - Le CBD^C interagit avec la tête de la myosine VI

Les expériences SAXS (section 1.II.2) ont permis de montrer que la myosine VI entière (M6-FL) adopte différentes conformations en solution, révélant l'adoption d'une forme compacte, potentiellement auto-inhibée. L'enveloppe SAXS suggère que le repliement se produit après le 3HB et que le CBD interagirait avec le domaine moteur (**figure 25a**).

Afin de valider ce modèle, l'étape suivante a donc été de déterminer les domaines participant à cette interaction tête-queue entre le domaine moteur de la myosine VI et le CBD. Pour ce faire, l'interaction entre le fragment 1-917 (contenant le domaine moteur, l'insert 2, l'IQ et le 3HB, $\text{MD}^{\text{ins2/IQ/3HB}}$, **figure 21**) et différents fragments de la queue de la myosine VI (SAH-fin, DT-fin et CBD^C) a été mesurée par MST (Thermophorèse à micro-échelle, ou « *Microscale Thermophoresis* »). En fait, tous les fragments de la queue essayés interagissent avec le fragment $\text{MD}^{\text{ins2/IQ/3HB}}$ (pré-incubé avec MgADP.VO_4) avec une affinité apparente similaire, $\sim 0.4 \mu\text{M}$ (**figure 26, tableau 4**), suggérant que la partie C-terminale du CBD, le CBD^C , est le principal acteur dans l'interaction. En plus, la même affinité est observée quand l'isoforme LI est utilisée, indiquant que les deux isoformes (LI+SI ou SI) sont potentiellement capables d'adopter une forme auto-inhibée.

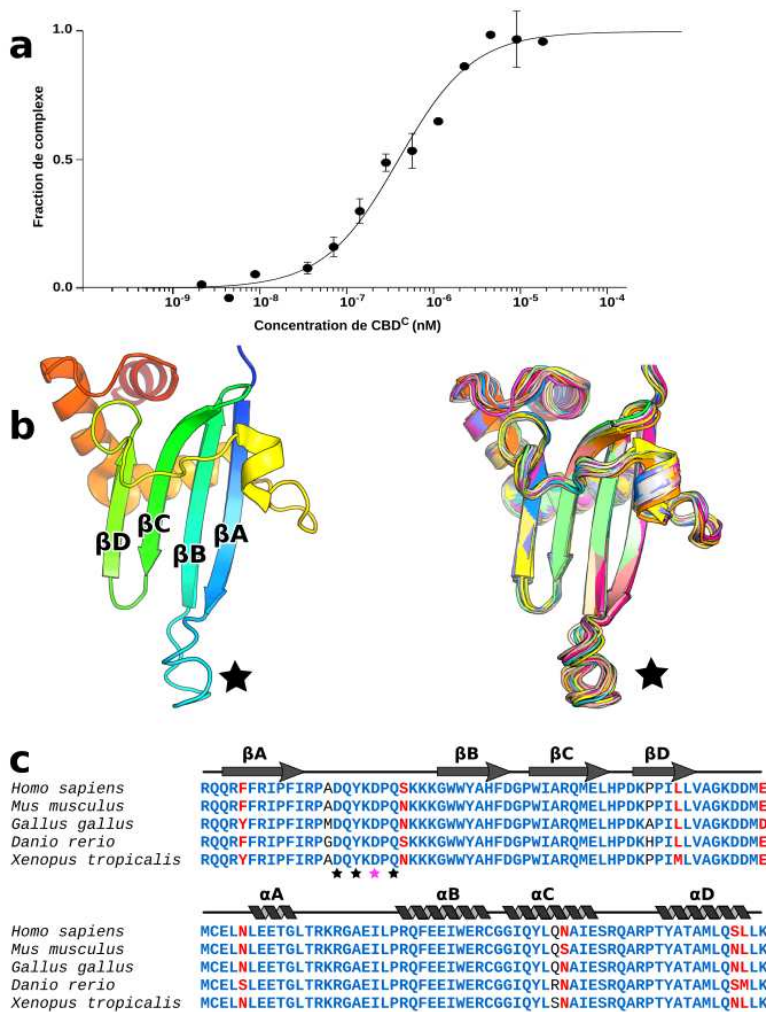


Figure 26 – Le CBD^c interagit avec la tête de la myosine VI

(a) Courbe MST représentative mesurant l'interaction entre le CBD^c et le fragment eGFPMD^{ins2/1Q/3HB}. Le K_d mesuré est de 0.4 μ M. La moyenne standard $\pm$ déviation de deux réplicats est représentée. (b) Structure RMN du CBD^c de la myosine VI (PDB 2K1A, (Yu et al., 2009)). L'étoile noire indique la boucle flexible entre les feuillets βA et βB du domaine. À droite, représentation des 20 structures calculées pour ce fragment, avec la même orientation qu'à gauche. La boucle βA - βB explore différentes conformations en solution, reflétant sa flexibilité. (c) Alignement du CBD^c de différentes espèces. Les résidus strictement conservés et les résidus similaires sont indiqués en bleu et en rouge, respectivement. Les éléments de structure secondaire sont également indiqués. La mutation des résidus indiqués avec une étoile abolit l'interaction entre le CBD^c et la tête de la myosine VI. L'étoile magenta indique la mutation D1189N, présente dans le catalogue COSMIC de mutations somatiques liées au cancer.

Plus important encore, et comme décrit précédemment avec les expériences SAXS, la force de l'interaction est dépendante du nucléotide (**tableau 4**). En effet, les moteurs pré-incubés avec MgADP uniquement, ou avec MgADP.BeFx (un analogue du MgATP non hydrolysé, (Fisher et al., 1995; Jin et al., 2017) interagissent plus faiblement avec le CBD (7.6 et 22.4 μ M, respectivement). De plus, aucune interaction n'est détectée quand le fragment MD^{ins2/1Q/3HB} se trouve sans nucléotide, en accord avec les résultats obtenus par SAXS. Tous ces résultats indiquent que le domaine moteur doit adopter une conformation en « *pré-powerstroke* » (**figure 4**) stabilisée par la présence de MgADP.Pi dans la poche du nucléotide pour interagir avec la queue. Chez la myosine VI, dans l'état « *pré-powerstroke* » la position de l'insert 2 crée une surface d'interaction qui est absente dans les autres états du cycle moteur (**figure 25**).

Tableau 4 – La tête de la myosine VI interagit avec le CBD

Tête		Queue	K_d (μ M)	n
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	MgADP.VO ₄	SAH-fin	0.5 ± 0.2	2
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	MgADP.VO ₄ + Ca ²⁺	SAH-fin	0.6 ± 0.2	2
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	MgADP.VO ₄	DT-fin	0.4 ± 0.1	2
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	MgADP.VO ₄	CBD ^C	0.5 ± 0.1	3
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	MgADP.VO ₄ + Ca ²⁺	CBD ^C	0.3 ± 0.2	2
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	MgADP.VO ₄	CBD ^C _{D1180V+Y1182D+D1184R+Q1186V}	n.b.	2
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	MgADP	CBD ^C	7.6 ± 1.7	2
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	MgADP.BeFx	CBD ^C	22.4 ± 4.1	2
eGFP MD ^{ins2/IQ/3HB}	sans nucléotide	CBD ^C	n.b.	2
MD MgADP.VO ₄		YFP CBD	3.1 ± 0.4	2
MD ^{ins2} MgADP.VO ₄		YFP CBD	0.4 ± 0.1	2
MD ^{ins2} MgADP.VO ₄ + 3mM Ca ²⁺		YFP CBD	0.5 ± 0.1	2
MD ^{ins2} MgADP.VO ₄		YFP CBD _{L1}	0.4 ± 0.1	2
MD ^{ins2} sans nucléotide		YFP CBD	n.b.	2
eGFP MD ^{ins2} MgADP.VO ₄		CBD ^C	0.3 ± 0.1	3
MD ^{ins2/IQ/3HB} sans nucléotide		YFP CBD	9.1 ± 1.2	3
MD ^{ins2/IQ/3HB} sans nucleotide + Ca ²⁺		YFP CBD	w.b. (> 20 μ M)	2
MD ^{ins2/IQ/3HB} sans nucléotide		YFP CBD ^N	6.8 ± 0.4	2

Toutes les mesures ont été réalisées avec le même tampon, contenant 20 mM Tris pH 7.0, 50 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1 mM TCEP et 0.05% Tween-20, et en ajoutant le nucléotide correspondant (2 mM MgADP ± 2 mM VO₄ ou BeFx). L'EGTA a été remplacé par 3 mM CaCl₂ dans les conditions indiquées avec +Ca²⁺.

Afin de définir l'importance de la région « cou » (insert 2/CaM, IQ/CaM et 3HB, **figure 21**) pour l'adoption d'une forme auto-inhibée, des tests ont été réalisés avec des fragments plus courts mais contenant le domaine moteur. L'analyse par MST montre que l'interaction entre le domaine moteur seul (résidus 1-788, MD, **figure 21**) et le CBD est ~10 fois plus faible qu'avec le fragment 1-917 (MD^{ins2/IQ/3HB}). Or, le fragment MD^{ins2} (résidus 1-813, **figure 21**) a une affinité similaire à celle du fragment 1-917 (K_d ~0.4 μ M). Ensemble, ces mesures indiquent que les principaux contacts responsables de l'adoption de l'état auto-inhibée se font entre la partie C-terminale du CBD (CBD^C) et le domaine moteur et l'insert 2 (**figure 21, 25a**), et uniquement quand le domaine moteur adopte une conformation en PPS. Il est important de remarquer qu'un K_d de ~0.4 μ M représente une estimation faible de l'affinité de la liaison entre la tête et le CBD de la myosine VI puisque dans le cas de la myosine VI entière, l'interaction est intramoléculaire, augmentant la concentration locale et favorisant l'interaction.

1.II.2.2.2 - La boucle β A- β B, principale responsable de l'interaction

Le modèle SAXS et les données d'interaction suggèrent que le CBD^C s'introduit dans une cavité entre le domaine moteur et l'insert2/CaM (**figure 21, 25a**). Si ce modèle est correct, une boucle très exposée et flexible dans le CBD^C entre les brins β A- β B (**figure 25a**) pourrait avoir un rôle majeur dans l'interaction. Il est intéressant de noter que cette boucle n'a pas de fonction connue jusqu'à présent. Or, sa séquence est très conservée dans l'évolution (**figure 26c**), suggérant que cette région pourrait avoir une fonction importante. Plus encore, des mutations dans cette boucle ont été retrouvées dans des tissus cancéreux (comme P1187S et D1189N, **figure 26c**, catalogue COSMIC, cancer.sanger.ac.uk).

Afin de tester le rôle de cette région dans l'interaction entre le CBD^C et la tête de la myosine VI, des mutations faux-sens ont été introduites (D1189V, Y1191D, D1193R et Q1195V, **figure 26c**) et l'interaction a été vérifiée par MST. Alors que ces résidus sont exposés et que la structure du CBD^C n'est pas affectée par la mutation, le quadruple mutant n'interagit pas avec le fragment MD^{ins2/IQ/3HB} pré-incubé avec MgADP.VO₄ (K_d calculé avec le CBD^C sauvage dans les mêmes conditions $\sim 0.6 \mu\text{M}$). Ces résultats révèlent pour la première fois que cette boucle dans le CBD^C a un rôle important pour l'inhibition de la myosine VI, ce qui explique sa conservation. Ces résultats renforcent de plus le modèle généré par SAXS en précisant comment le CBD et la tête de myosine VI pourraient interagir (**figure 25a**).

1.II.2.2.3 - Des interactions supplémentaires entre le CBD^N et la région IQ

Une étude décrivant en partie les interactions participant à l'adoption de la forme auto-inhibée a été récemment publiée (Batters et al., 2016). Dans cette étude, la myosine VI FL est utilisée dans des conditions sans nucléotide. Ce faisant, les auteurs n'ont pas pu observer la contribution la plus importante, celle ayant lieu entre le CBD et le domaine moteur adoptant une conformation PPS (**figure 25, tableau 4**). Néanmoins, cette étude a permis de mettre en évidence une interaction faible ($8 \mu\text{M}$) entre le fragment MD^{ins2/IQ/3HB} sans nucléotide et le CBD entier (CBD-fin). Comme décrit précédemment, dans des conditions sans nucléotide il n'y a pas d'interaction entre le CBD^C et le MD^{ins2/IQ/3HB}. Or, une interaction similaire à celle publiée a été mesurée entre le fragment MD^{ins2/IQ/3HB} et le CBD entier ($\sim 9 \mu\text{M}$, **tableau 4**). De plus, une interaction similaire est observée quand uniquement la partie N-terminale du CBD (CBD^N) est utilisée ($\sim 7 \mu\text{M}$). Ces résultats suggèrent que le CBD^N interagit avec le « cou » de la myosine VI, très probablement avec le

domaine IQ (lié à une CaM dépourvue de Ca^{2+} , apo-CaM), complétant la surface d'interaction entre le CBD^C et le MD^{ins2} décrite ci-dessus. L'étude publiée par Batters *et al.* propose que cette interaction est régulée par le calcium. Afin de tester cette hypothèse, l'expérience de MST réalisée entre le CBD et MD^{ins2/IQ/3HB} a été reproduite avec 3 mM CaCl_2 dans le tampon. Les résultats montrent, en effet, que l'interaction entre ces deux fragments est plus faible en présence de Ca^{2+} (K_d faible $> 20 \mu\text{M}$) que d'EGTA ($K_d \sim 9 \mu\text{M}$).

En résumé, les expériences de MST ont permis de démontrer que :

- Les principaux contacts responsables de l'adoption de la forme auto-inhibée ont lieu entre une boucle exposée dans la partie C-terminale du CBD et l'interface entre le domaine moteur et l'insert 2.
- Pour que cette interaction se produise, le domaine moteur doit adopter une conformation en « *pre-powerstroke* », par la liaison de MgADP.Pi dans la poche du nucléotide.
- Enfin, des interactions complémentaires ont lieu entre la partie N-terminale du CBD et la région IQ/apo-CaM. La présence de calcium déstabilise cette interaction.

1.II.2.3 - Cristallographie

Les essais de MST ont permis de mettre en évidence quelles sont les régions participant aux principales interactions responsables de la stabilisation de l'état auto-inhibée de la myosine VI. Or, ces essais ne permettent pas de définir quelles sont les surfaces exposées (ou disponibles) quand la myosine VI adopte cette conformation. Par exemple, la question se pose de savoir si dans le monomère inactif la surface d'interaction avec les partenaires est toujours disponible, tant dans le CBD^N (site « RRL ») comme dans le CBD^C (site « WWY »), ou si le monomère doit d'abord s'ouvrir (par exemple, grâce au calcium) avant de pouvoir interagir avec des partenaires.

Dans un premier temps, j'ai essayé de cristalliser la myosine VI entière (M6-FL). En effet, la M6-FL peut être produite dans des cellules d'insecte *Sf9* et est assez soluble après purification (concentrations autour de 16 mg/ml, soit $\sim 100 \mu\text{M}$). En plus, elle est très stable en solution. Des tests de cristallisation ont donc été menés sur ce construit, en présence de MgADP.VO₄ + EGTA afin de favoriser l'adoption de la forme auto-inhibée. Cependant, aucune piste claire n'a été obtenue malgré des nombreux efforts.

En parallèle, j'ai décidé d'essayer de cristalliser le complexe entre le fragment MD^{ins2} et le CBD^C. En effet, l'affinité entre les deux fragments ($K_d \sim 0.4 \mu\text{M}$) est suffisamment élevée pour permettre sa cristallisation. Des cristaux ont été obtenus, mais leur analyse a indiqué que seul le domaine moteur de la myosine VI a été incorporé dans la maille cristalline et le CBD^C est absent de ces cristaux. Les efforts doivent continuer afin d'en arriver à cristalliser ce complexe.

1.II.2.4 - Microscopie

La myosine VI entière a une masse d'environ 180 kDa (147 kDa pour la M6-FL, plus deux CaM dans l'état inhibé). En solution, la molécule a un Rg calculé par SAXS de 48.5 Å, avec un Dmax de ~ 200 Å. La particule devrait donc être assez grande pour utiliser la cryo-microscopie électronique (cryo-EM) afin d'obtenir un modèle précis de la structure de la myosine VI auto-inhibée. Pour cette partie, j'ai collaboré avec Pierre-Damien Coureux (École polytechnique, Palaiseau), expert en cryo-microscopie et en moteurs moléculaires myosine (Coureux et al., 2003, 2004).

Les premiers tests par coloration négative ont montré que la particule peut être identifiée sur les grilles. Plus encore, des différences de conformation (forme ouverte ou forme plus compacte) sont observées selon la condition utilisée : MgADP.VO₄ plus Ca²⁺ ou EGTA, respectivement (**figure 25**). Ce projet continue dans le but d'obtenir une structure 3D de la myosine VI auto-inhibée par cryo-EM.

1.II.2.5 - Conclusion

Le premier objectif de cette partie du projet était de caractériser quelles sont les interactions intramoléculaires permettant à la myosine VI d'adopter une conformation auto-inhibée, et repliée sur elle-même. Les analyses biochimiques et biophysiques réalisées ont permis de décrire l'enveloppe de la molécule inactive. Le modèle généré par SAXS suggère que le point d'inflexion pourrait se situer après le PTD (rés. ~ 909) et avant le SAH (**figure 25**). Cette région pourrait être assez flexible pour permettre au CBD de revenir vers la tête de la myosine VI. En effet, le SAH canonique ne commence qu'au résidu 915, ce qui pourrait conférer à cette région une certaine flexibilité. Le SAH jouerait donc un rôle important pour l'auto-inhibition de la myosine VI. Il est très important de remarquer que le SAH n'est pas critique pour la fonction *in vivo* de la myosine VI (Mukherjea et al., 2014), au moins pour les fonctions qui ont été analysées (c'est-à-dire, l'endocytose et la maintenance de la morphologie de l'appareil de Golgi). Le SAH permettrait donc l'introduction d'un

espace entre le domaine moteur et le CBD (et donc les membranes avec les cargos), mais aussi l'adoption de l'état auto-inhibé.

La capacité pour adopter un état auto-inhibé a également été décrite dans d'autres myosines, comme la myosine VIIa (Sakai et al., 2015; Umeki et al., 2009; Yang et al., 2009), la myosine X (Umeki et al., 2011) et la myosine V (Li et al., 2008, 2005; Liu et al., 2006) ; mais aussi chez les kinésines (Cross and Scholey 1999, moteurs moléculaires se déplaçant sur les microtubules). Il est intéressant de noter que la myosine VI, la myosine VIIa et la myosine X adoptent une morphologie générale très similaire dans l'état auto-inhibée (**figure 27**). Dans les trois cas, le domaine C-terminale de chaque myosine interagirait avec le domaine moteur. Plus encore, les trois myosines ont un domaine SAH dans leur séquence qui permettrait au domaine C-terminal d'atteindre le domaine moteur. Certains domaines acquis au cours de l'évolution semblent donc avoir un rôle clé pour l'adoption d'un état auto-inhibé qui régule leur activité. Dans le même sens, la myosine VI est le seul membre connu de la superfamille des myosines ayant acquis un insert (insert 2) lui permettant de se déplacer vers l'extrémité négative des filaments d'actine (Ménétreay et al., 2005; Park et al., 2007; Wells et al., 1999). Comme décrit précédemment, cet insert a également un rôle clé pour l'adoption de l'état auto-inhibée, car c'est à l'interface entre l'insert 2 et le domaine moteur que le CBD^C interagit.

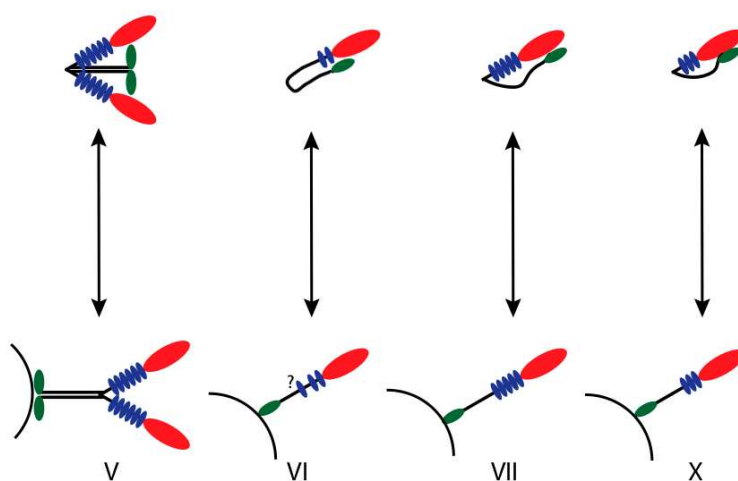


Figure 27 – Auto-inhibition dans la famille des myosines non-conventionnelles (Masters et al., 2016).

Schéma représentant les états auto-inhibés des myosines V, VI, VII et X, ainsi que son état activé. Les myosines VI, VII et X adoptent des états inactifs similaires. La myosine V, quant à elle, adopte un état auto-inhibé très différent. En effet, elle contient un bras de levier dépourvu de SAH mais très long et très rigidifié par les chaînes légères qui y sont fixés. L'état dimérique des myosines VI et X activées ne sont pas représentés car ils sont controversés. Des résultats récents de notre laboratoire démontrent leur existence et les ont mieux caractérisés.

Mes expériences ont également permis de mieux comprendre comment la myosine VI serait activée dans la cellule. Une fois produite, la myosine VI auto-inhibée diffuse dans la cellule y compris à travers un réseau d'actine corticale dense en tant que monomère inactif (Lister et al., 2004). Des signaux extérieurs sont donc nécessaires pour activer la fonction de la myosine. Ici, le rôle du calcium a été étudié. En effet, l'addition de calcium semble ouvrir la molécule comme conséquence d'une diminution de l'affinité entre la tête et la queue de la myosine VI. Ceci est en accord avec le fait que la myosine VI doit se trouver en présence de calcium pour pouvoir interagir avec des liposomes grâce au site de liaison aux lipides présent dans le CBD (Batters et al., 2016; Spudich et al., 2007). Très probablement, la liaison du calcium à la deuxième CaM entraîne un changement conformationnel de cette dernière déstabilisant l'interaction avec le CBD. Cette déstabilisation momentanée serait suffisante pour ouvrir la molécule inhibée, permettant l'interaction avec les partenaires. Le rôle du partenaire GIPC1 dans l'activation de la myosine VI a été étudié plus en détail dans la section 1.II.3.1.2.4 de ce chapitre (page 75).

Le calcium semble donc jouer un rôle clé pour réguler l'activité de la myosine VI. La question se pose donc de savoir dans quelles situations physiologiques le calcium peut réguler l'activité de la myosine VI. Dans les cellules neurosécrétrices le recrutement de cette myosine sur les granules de sécrétion est dépendante du calcium (Tomatis et al., 2013). Certaines voies de l'autophagie, en lien avec la myosine VI, sont également régulées par le niveau de calcium intracellulaire (Decuypere et al., 2013). Otoferlin, un partenaire de la myosine VI (Heidrych et al., 2009; Roux et al., 2009), interagit directement avec des canaux de calcium (Hams et al., 2017). L'invasion de *Shigella*, une bactérie pathogène, dans des cellules épithéliales produit une augmentation locale de la concentration de calcium (Bonnet and Tran Van Nhieu, 2016). Dans ce processus, l'augmentation locale très rapide de calcium est nécessaire pour le recrutement de la myosine II (Bonnet and Tran Van Nhieu, 2016), mais l'activité de la myosine VI pourrait également être régulée par ces signaux calciques (communication personnelle). Récemment, des contacts directs entre le réticule endoplasmique et la membrane plasmique, permettant de délivrer le calcium à des endroits précis, ont été décrits (Caldieri et al., 2017; Johannes, 2017; Phillips and Voeltz, 2015). De plus, des ondes de calcium transitoires semblent avoir un rôle clé dans le mouvement dirigé des cellules, l'organisation du cytosquelette et la dynamique des adhésions cellulaires (Ridley et al., 2003; Wei et al., 2009). Il reste cependant à démontrer que le calcium est un signal important pour la régulation de l'activité de la myosine VI dans ces processus cellulaires ainsi que dans des tissus dans lequel le calcium a un rôle

fonctionnel clé, comme le tissu cardiaque (Karolczak et al., 2013, 2014; Redowicz, 2007), et les stéréocils des cellules ciliées internes (Gillespie and Müller, 2009; Kazmierczak and Müller, 2012).

Finalement, ce même comportement a été décrit pour la forme auto-inhibée des myosines V et VIIa, activées elles aussi par le calcium (Sakai et al., 2015; Wang et al., 2004). En effet, la myosine VIIa contient cinq motifs IQ potentiellement capables de lier des CaMs. Or, le premier motif IQ est reconnu par des CaM uniquement en présence de Ca^{2+} (Sakai et al., 2015), suggérant que la dissociation de la CaM en absence de Ca^{2+} permet une certaine flexibilité à cette région, nécessaire pour l'adoption de l'état auto-inhibée. En présence de Ca^{2+} (forme active), la liaison de la CaM rigidifie le bras de levier et favorise la motilité du moteur (Sakai et al., 2015). La myosine X, quant à elle, est activée par la présence de $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ interagissant avec le domaine PH (« *Plekstrin Homology* », Umeki et al., 2011). Dans les quatre cas, la forme inhibée est plus compacte que la forme active, facilitant sa diffusion dans la cellule. De plus, l'auto-inhibition empêcherait une consommation excessive d'ATP, car le moteur est activé uniquement en présence de signaux externes et seulement à l'endroit où il est nécessaire.

Dans l'avenir, les mutants du CBD^C incapables d'interagir avec la tête de la myosine VI (voir section 1.II.2.2.2) seront utilisés pour l'étude de la fonction de la myosine VI dans la cellule. En effet, dans le contexte d'une myosine VI entière, ces mutants permettront de tester de façon conservatrice un moteur constitutivement actif pour lequel toutes les parties fonctionnelles connues de la molécule sont intactes (région de dimérisation, motifs d'interaction du CBD avec ses partenaires). Idéalement, l'obtention d'une structure à haute résolution (par cristallographie ou par microscopie) de la forme auto-inhibée permettrait d'obtenir des mutants constitutivement inactifs (avec des interactions renforcées entre la tête et la queue de la myosine VI). Ensemble, ces deux mutants permettront de mieux comprendre le rôle de l'activation de la myosine VI dans la cellule par ses partenaires, ainsi que par différents signaux, tels que le PIP_2 . Des techniques d'optogénétique pourront également être utilisées afin de contrôler localement l'activation de la myosine VI.

1.II.3 *Caractérisation de l'interaction entre la myosine VI et ses partenaires cellulaires*

La myosine VI a été décrite comme participant à différentes fonctions dans les cellules eucaryotes. Pour cela, elle utilise plusieurs protéines adaptatrices ou partenaires, présentes à différents endroits dans la cellule (membrane plasmatique, vésicules ou autres). Ces adaptateurs sont donc responsables de recruter la myosine VI et définissent non seulement l'endroit de son recrutement, mais très probablement aussi la fonction qu'elle doit effectuer (Sweeney and Houdusse, 2010a). Selon le modèle actuel, les partenaires interagissant avec la myosine VI pourraient, en effet, moduler son activité en favorisant l'adoption d'une conformation active particulière, adaptée à la fonction que la myosine VI doit effectuer dans la cellule.

L'objectif de cette partie du projet a donc été de caractériser différents complexes formés par la myosine VI et plusieurs de ses partenaires : GIPC1 (section 1.II.3.1, page 62), NDP52 (section 1.II.3.2.1, page 81), Optineurine (section 1.II.3.2.2, page 84) et TOM1 (section 1.II.3.2.3, page 87). Pour ce faire, le partenaire a été d'abord étudié de façon isolé afin de trouver les fragments nécessaires pour caractériser son interaction avec la myosine VI. Ensuite, ces fragments ont été étudiés alors qu'ils interagissent, en complexe, avec la myosine VI.

1.II.3.1 - *GIPC1*

GIPC1 (*GAIP Interacting Protein C-terminus 1*) est l'un des partenaires de myosine VI le plus étudié. En association avec la myosine VI, il est impliqué dans plusieurs processus cellulaires, tels que la migration cellulaire, la cytokinèse, l'endocytose et le recyclage des récepteurs transmembranaires (Katoh, 2013; Tumbarello et al., 2013). GIPC1 est également très important dans le cadre du cancer. Il est surexprimé dans différents types de tumeur, et il facilite la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (Choi et al., 2010; Kirikoshi and Katoh, 2002; Muders et al., 2006, 2009; Wang et al., 2010; Yavelsky et al., 2008). De nouvelles études ont montré que GIPC1 est une cible intéressante pour le traitement du cancer, et de nouvelles thérapies visant cette protéine sont en cours de développement (Pal et al., 2014; Patra et al., 2012). Or, à ce jour, on ne connaît pas le rôle exact de ces deux acteurs dans le développement du cancer. Des études plus détaillées sont donc nécessaires pour élucider les mécanismes, les propriétés et les fonctions exactes de la myosine VI et GIPC1 au cœur même de ces processus.

GIPC1, comme les autres membres de la famille GIPC (GIPC2 et GIPC3) est constitué de trois domaines (**figure 28**) : une région N-terminale (GH1) qui semble induire l'oligomérisation, un domaine PDZ, ainsi qu'un domaine C-terminal (ou GH2) d'interaction avec la myosine VI (Katoh, 2013). Grâce à cette combinaison de domaines, GIPC1 joue le rôle d'un adaptateur qui interagit avec la myosine VI et, via son domaine PDZ, il est capable de charger des cargos (notamment des protéines membranaires avec une séquence de liaison au domaine PDZ) sur la protéine motrice (Katoh, 2013).

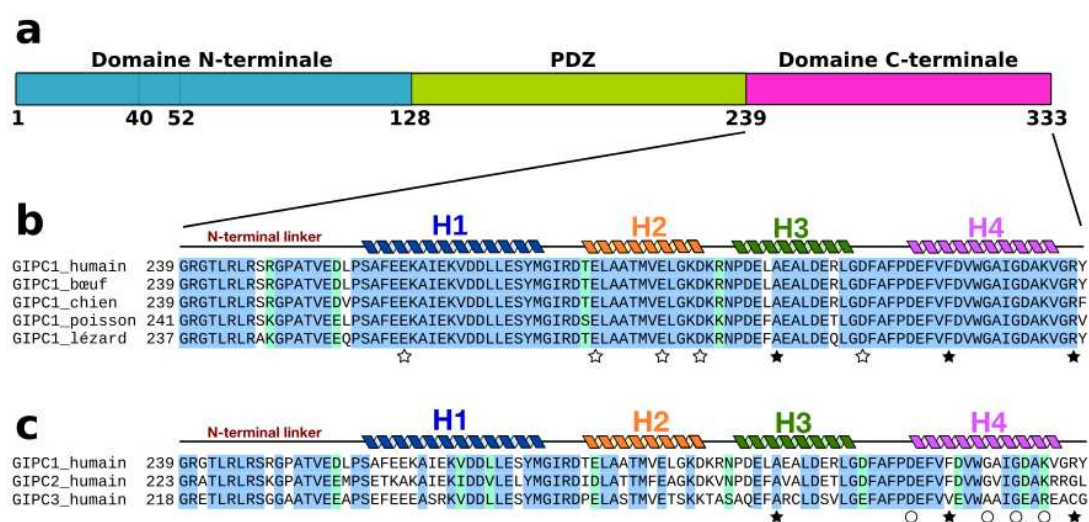


Figure 28 – Conservation dans la famille GIPC

(a) Schéma de l'organisation des domaines de GIPC. (b) Conservation de la séquence du domaine C-terminal de GIPC1. Les éléments de structure secondaire (voir **figure 29**) sont indiqués. Les résidus strictement conservés et les résidus similaires sont indiqués en bleu et en vert, respectivement. Les étoiles noires indiquent les résidus participant à l'interaction avec le CBD de la myosine VI (voir **tableau 7**). Les étoiles blanches désignent les résidus n'ayant pas de rôle dans l'interaction. (c) Conservation des membres de la famille GIPC chez l'humain. Les cercles blancs indiquent des résidus exposés appartenant à la surface d'interaction avec le CBD de la myosine VI. Les étoiles noires indiquent les résidus participant à l'interaction avec la myosine VI.

1.II.3.1.1 - Identification et caractérisation du domaine d'interaction avec la myosine VI

Dans un premier temps, le domaine C-terminal d'interaction avec la myosine VI a été étudié. Ce domaine n'a aucune homologie de séquence avec des protéines connues dans la PDB. Un alignement de la séquence de GIPC1 issue de différents organismes révèle cependant une région très conservée en C-terminal (résidus 239 jusqu'à la fin, **figure 28**). Ce fragment 239-fin (GIPC1_{ct}) a été choisi pour commencer à caractériser l'interaction avec le CBD de la myosine VI.

Le fragment GIPC1_{Ct} a été produit chez *E. coli*, permettant la purification de grandes quantités de protéine (avec un rendement de >10 mg/L de culture). Il s'agit en effet d'un fragment très soluble (la concentration maximale atteinte est de 20 mg/ml, soit 1.8 mM) et stable en solution. L'analyse par SEC-MALS révèle un seul pic correspondant à une espèce homogène de 10.5 kDa (monomérique) avec une concentration de protéine dans le pic de ~75 µM (**tableau 5**). De plus, l'analyse par SAXS montre que le Rg de la protéine est stable et n'augmente pas en fonction de la concentration de protéine utilisée (entre 10 et 500 µM), confirmant la stabilité du monomère (**tableau 6**). Également, des tests d'interaction ont été effectués afin de confirmer que le fragment isolé est fonctionnellement actif et peut interagir avec le CBD de la myosine VI (voir section 1.II.3.1.2 Caractérisation de l'interaction entre la myosine VI et GIPC1).

Tableau 5 – Caractérisation par MALS des fragments GIPC

Protéine	Concentration de protéine (µM)	MM mesurée (kDa)	MM théorique (kDa)	MM mes/théor [#]
GIPC1 _{Ct}	74.1	10.5	10.8	1.0
GIPC _{52-fin}	Pic 1 (87% de masse)	0.5	33.9	1.1
	Pic 2 (13% de masse)	0.5	69.1	2.2
GIPC _{52-fin}	50 ⁽¹⁾	129.6	31.3	4.1

[#]Rapport entre les masses moléculaires mesurées et théoriques.

⁽¹⁾ Injection directe (voir méthodes, page 131)

Tableau 6 – Caractérisation par SAXS des fragments GIPC

Protéine	Concentration	Rg [#] (Å)
GIPC1 _{Ct}	0.3 mg/ml (26 µM)	24.1 ± 1.3
	1.8 mg/ml (167 µM)	24.9 ± 1.8
	5.5 mg/ml (127 µM)	25.5 ± 1.3
GIPC _{52-fin}	0.6 mg/ml (19 µM)	27.6 ± 0.7
	1.6 mg/ml (50 µM)	27.1 ± 3.8
	3.4 mg/ml (110 µM)	30.1 ± 0.3

[#]Rg calculé avec l'approximation de Guinier

Les premiers essais de cristallisation ont montré que la nucléation de la protéine est favorisée à pH acide, entre 4.0 et 5.0 (le pI théorique de la protéine est de 4.6). Cependant, il s'agit d'une condition difficile à reproduire et encore plus difficile à optimiser. C'est pour cela que j'ai décidé de faire appel à la RMN pour résoudre la structure du fragment GIPC1_{Ct}. En collaboration avec C. Roumestand et P. Barthe (CBS, Montpellier), nous avons obtenu la structure RMN du domaine C-ter de GIPC1, responsable de l'interaction avec la myosine VI. Le domaine est formé par quatre hélices α amphiphiles très compactes précédées d'une

région flexible qui pourrait être le lien entre le domaine PDZ et le domaine C-ter (**figure 29a,b, 28b**). La majorité des résidus hydrophobes sont cachés à l'intérieur du domaine, tandis que la surface extérieure est polaire et riche en résidus chargés (**figure 29c,d,e**). Quelques résidus hydrophobes sont cependant exposés en surface, comme Phe319, ainsi que deux alanines Ala301, Ala312.

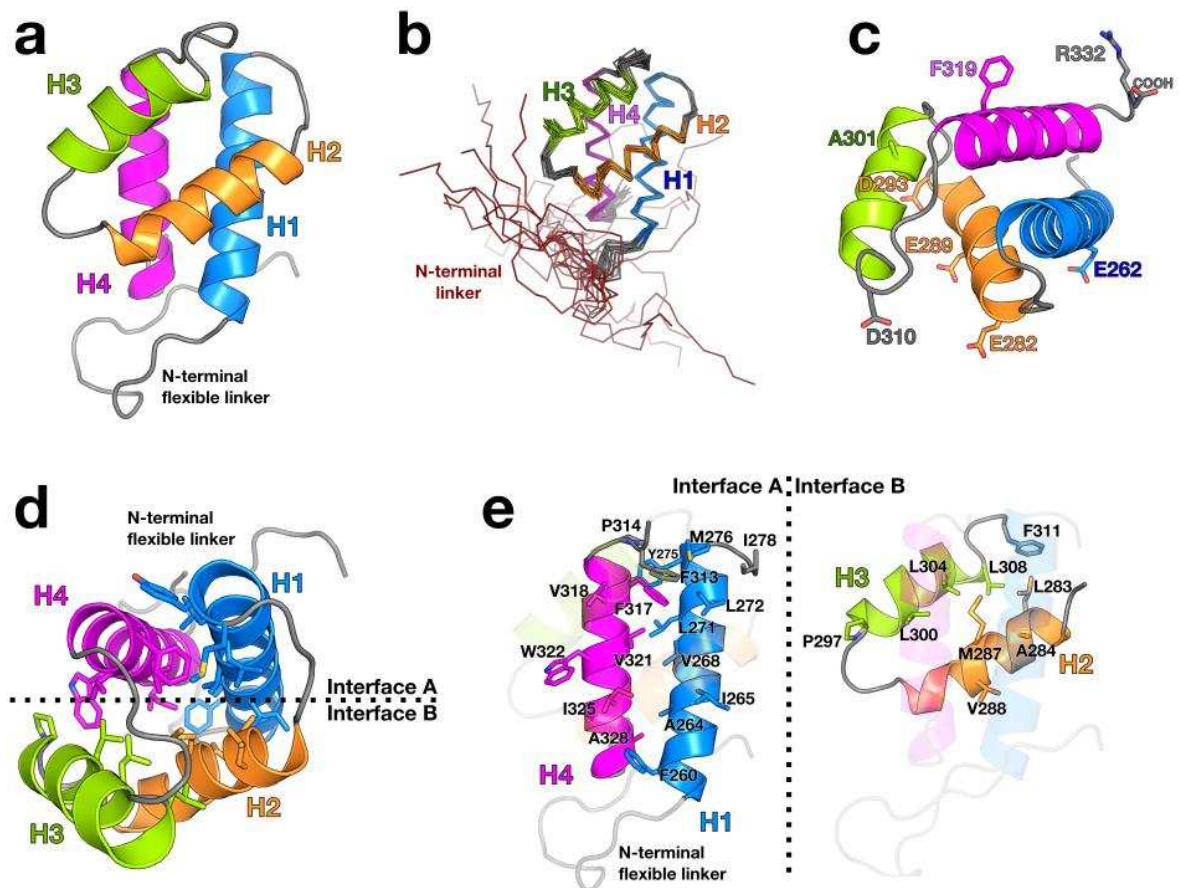


Figure 29 – Le domaine C-terminale de GIPC1 adopte une structure avec quatre hélices compactes **(a)** Vue générale de la structure RMN du fragment GIPC1_{Ct}. **(b)** Représentation des 20 structures RMN calculées. La région N-terminale adopte des positions multiples et très différentes, tandis que le reste du domaine est plus rigide (r.m.s.d. de 0.88 Å entre les différentes représentations RMN si la région N-terminale n'est pas prise en compte). **(c)** Représentation des résidus de surface les plus exposés. **(d)** Vue supérieure du domaine. La structure est stabilisée par des interactions hydrophobes à l'intérieur du domaine (les chaînes latérales hydrophobes sont représentées). **(e)** Vue ouverte du cœur du domaine.

La structure RMN a été utilisée pour trouver des homologues structuraux avec le serveur DALI (Holm and Sander, 1995). Toutes les structures de similarité suffisamment élevée (Z score > 6.0) sont en fait des structures de domaines PWI, comme *Nab2* ou *RNA-binding protein 25*. Les domaines PWI (nommés ainsi car ils contiennent les résidus Pro-Trp-Ile, PWI) sont des petits domaines capables d'interagir avec l'ADN et/ou l'ARN, présents à l'extrémité N-terminale ou C-terminale de certaines protéines participant à la maturation du pré-ARNm (Szymczyna et al., 2003). Il s'agit d'un domaine soluble et globulaire formé par un faisceau de quatre hélices α , comme GIPC1_{Ct}. En effet, la structure de GIPC1_{Ct} est très similaire à celle du domaine PWI de Nab2 (PDB 2JPS, r.m.s.d. de 2.1 Å pour 61 C α) malgré le fait que les deux protéines ont des séquences très peu conservées (28.8% similarité, 13.5% identité).

Dans le but d'étudier le domaine PDZ de GIPC1, en plus du domaine d'interaction avec la myosine VI, des fragments plus longs ont été produits. Ainsi, un fragment PDZ-end commençant directement au domaine PDZ (résidus 128-fin) a été purifié en fusion avec l'YFP. Après plusieurs essais, des fragments longs contenant une partie du domaine N-terminal (qui semble avoir un rôle dans l'oligomérisation de la protéine, (Kedlaya et al., 2006; Reed et al., 2005) ont pu être purifiés : ce sont les fragments 40-fin et 52-fin (**figure 28a**). Le fragment 40-fin étant moins stable, j'ai poursuivi les investigations avec le fragment 52-fin. Ce fragment est capable de dimériser à basse concentration (~13% de dimère à ~0.5 μ M, **tableau 5**). Or, à très haute concentration (80 μ M) la masse moléculaire de la protéine correspond à un tétramère (**tableau 5**). L'analyse par SAXS confirme ces résultats et montre que le R_g est stable entre ~1 et 50 μ M (**tableau 6**), mais il augmente légèrement à 110 μ M. La courbe de distribution des distances suggère également un changement de la morphologie de la particule à 110 μ M. Ensemble, ces résultats indiquent qu'un changement se produit à très haute concentration, et que le fragment correspondant aux résidus 52-fin peut se retrouver sous forme monomérique (basse concentration), dimérique (entre ~1 et 50 μ M) ou oligomérique (>80 μ M). Il est actuellement impossible de produire en grande quantité la protéine entière pour des expériences *in vitro*. Toutes les approches de production en bactérie ont échouées. Il n'a donc pas été possible de déterminer si les 51 résidus N-ter (très riches en Gly, Pro et résidus chargés) participent également à l'oligomérisation de GIPC1.

1.II.3.1.2 - Caractérisation de l'interaction entre la myosine VI et GIPC1

1.II.3.1.2.1 - Analyse par MST de l'interaction

Dans le but de caractériser l'interaction entre le CBD de la myosine VI et GIPC1, des essais de MST ont été menés avec les fragments décrits précédemment (**tableau 7, figure 30**). Dans un premier temps, les mesures effectuées montrent que le fragment C-ter de GIPC1, GIPC1_{Ct}, interagit avec le CBD de la myosine VI (construit CBD-fin) avec une affinité relativement élevée ($K_d \sim 0.7 \mu\text{M}$).

Afin de caractériser comment la myosine VI interagit avec GIPC1_{Ct}, des essais de MST avec des construits plus long de la myosine VI ont été effectués. En fait, uniquement le fragment CBD^N semble participer à l'interaction, car tous les construits essayés (SAH-fin, CBD-fin et CBD^N) ont une affinité similaire pour GIPC1_{Ct} (**tableau 7**). Ces résultats montrent que l'interaction entre la myosine VI et GIPC1 est directe et n'implique pas de modifications post-traductionnelles, car les deux protéines ont été produites dans la bactérie. De plus, le même résultat a été obtenu avec le fragment SAH-fin purifié à partir de cellules d'insecte *Sf9* (**tableau 7**). L'interaction semble avoir une composante ionique puisque l'affinité est 10 fois moins importante (**tableau 7**) en présence de 300 mM KCl (au lieu de 100 mM KCl).

Tableau 7 – GIPC1_{Ct} interagit avec le CBD^N

GIPC1	Myosine VI	$K_d (\mu\text{M})$	n
GIPC1 _{Ct}	^{YFP} CBD-fin	$0.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$	2
^{YFP} GIPC1 _{Ct}	SAH-fin	$0.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$	3
^{YFP} GIPC1 _{Ct}	SAH-fin [*]	$0.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$	2
^{YFP} GIPC1 _{Ct}	SAH-fin ^{* EINE}	$0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
^{YFP} GIPC1 _{Ct}	SAH-fin	$10.2^{\#} \pm 1.1 \mu\text{M}$	2
^{YFP} GIPC1 _{Ct}	CBD ^N	$0.6 \mu\text{M}$	1
GIPC1 _{Ct}	^{YFP} CBD ^N	$0.7 \mu\text{M}$	1
^{YFP} GIPC1 _{PDZ-fin}	SAH-fin	$0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
^{YFP} GIPC1 _{52-fin}	SAH-fin	$0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
GIPC1 _{52-fin}	^{YFP} CBD-fin	$0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
GIPC1 _{Ct-ΔN}	^{YFP} CBD-fin	$0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$	3
GIPC1 _{Ct-ΔN}	^{YFP} CBD-fin _{NI}	$0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
GIPC1 _{Ct-ΔN}	^{YFP} CBD-fin _{LI}	$23.1 \pm 7.5 \mu\text{M}$	2

Sauf précision contraire, les construits de myosine VI utilisés contiennent le petit insert (SI). Toutes les expériences ont été réalisées dans 20 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP et 0.05% Tween-20, à l'exception de la mesure indiquée avec ([#]), réalisée à 300 mM KCl.

* Fragment SAH-fin purifié à partir de cellules d'insecte *Sf9*.

Côté GIPC1, les essais de MST montrent que l'interaction se fait uniquement avec le domaine C-ter car les fragments PDZ-fin et 52-fin présentent la même affinité pour le CBD de la myosine VI que le fragment GIPC1_{Ct} (**tableau 7**). De plus, le *linker* flexible en N-ter du domaine (**figure 29b**) ne participe pas à l'interaction avec le CBD de la myosine VI, car des fragments dans lesquels le linker a été enlevé (GIPC1_{Ct-ΔN}) interagissent de la même façon avec la myosine VI (**tableau 7**).

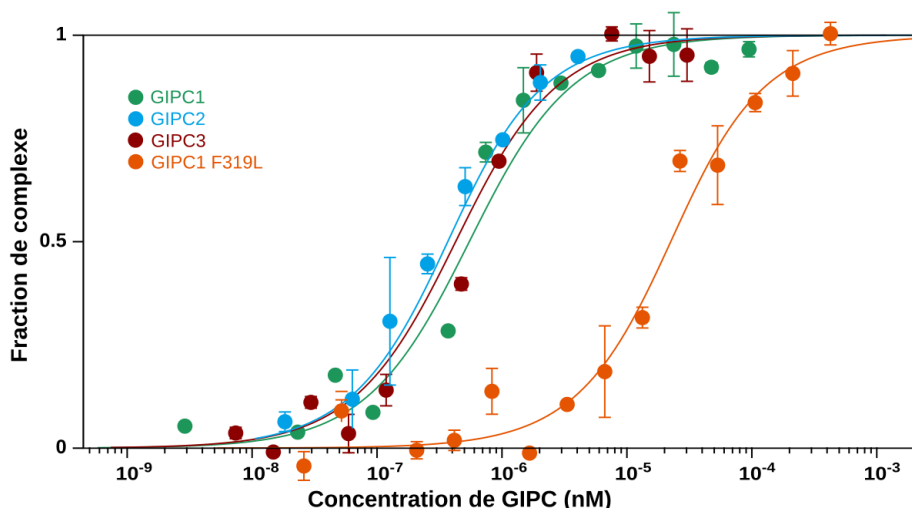


Figure 30 – Courbes MST représentatives pour la caractérisation de l'interaction entre GIPC et le CBD de la myosine VI

Les trois membres de la famille GIPC (GIPC1, GIPC2 et GIPC3) interagissent avec une affinité similaire avec le CBD de la myosine VI (YFP-CBD-fin), $\sim 0.4 \mu\text{M}$. L'interaction avec le mutant F319L est cependant 40 fois plus faible ($K_d \sim 16 \mu\text{M}$). La moyenne $\pm$ déviation standard de deux réplicats est représentée.

L'interaction entre GIPC1_{Ct} et la myosine VI est dépendante de l'isoforme de cette dernière (**tableau 7**). En effet, GIPC1_{Ct} a une affinité similaire pour les isoformes SI (CBD-fin, avec le petit insert) et NI (CBD-fin_{NI}, sans inserts), mais l'interaction avec l'isoforme LI+SI (CBD-fin_{LI}, avec les deux inserts présents dans le CBD) est beaucoup plus faible ($K_d \sim 23 \mu\text{M}$). Les résultats avec l'isoforme LI sont en accord avec ce qui a été publié récemment (Wollscheid et al., 2016). En effet, des structures RMN réalisées avec un fragment plus court que le construit CBD^N mais contenant le grand insert (**figure 13**) montrent que cet insert adopte une structure en hélice α qui se replie sur le CBD et vient masquer le site « RRL » d'interaction avec les partenaires. La faible interaction mesurée pour GIPC1 avec cette isoforme suggère que l'insert et GIPC1 sont en compétition pour interagir avec une surface proche ou similaire. Ces isoformes auraient donc une préférence pour les partenaires « WWY » tels que Dab2. En effet, Dab2 est considéré comme un élément essentiel pour recruter la myosine VI dans le cadre de l'endocytose médiée par la clathrine

(Morris et al., 2002; Spudich et al., 2007). De plus, le repliement du LI sur le site « RRL » crée une nouvelle surface qui pourrait participer à la liaison avec la chaîne lourde de la clathrine (Wollscheid et al., 2016) constituant l'enveloppe de certaines vésicules endocytiques (Smith et al., 1998). En effet, l'isoforme LI est sélectivement localisée dans les puits de clathrine des cellules épithéliales (Buss et al., 2001), suggérant que la myosine VI LI est particulièrement importante pour l'endocytose dépendante de clathrine des cellules polarisées. Le LI servirait donc à moduler et à spécifier l'activité de la myosine VI. Le rôle du petit insert (SI) dans l'interaction avec GIPC1 n'a cependant jamais été caractérisé auparavant. L'isoforme SI est en effet surexprimée, par exemple, dans des tumeurs d'ovaire (Wollscheid et al., 2016) indiquant que cette isoforme pourrait être sélectionnée positivement dans le contexte du développement tumoral et du processus métastatique. La présence du petit insert pourrait faire apparaître un nouveau site de phosphorylation, permettant un degré de régulation supplémentaire chez la myosine VI (Tomatis et al., 2013). Cette phosphorylation semble avoir un rôle clé dans l'exocytose chez les cellules neurosécrétrices.

1.II.3.1.2.2 - Caractérisation de la surface d'interaction

Afin de mieux comprendre comment l'interaction entre GIPC1 et la myosine VI se produit, des essais de mutagenèse ont été menés basés sur la structure RMN obtenue. Comme décrit précédemment, la recherche de structures homologues à GIPC1_{Ct} a permis de trouver Nab2, une protéine avec un domaine PWI homologue au domaine C-ter de GIPC1. Malgré le fait que les deux protéines ont des séquences très peu conservées (28.8% de similarité, 13.5% d'identité), l'analyse des structures indique que Nab2 possède une phénylalanine très exposée au solvant (Phe73) sur la même surface que la Phe319 de GIPC1 (**figure 31**), elle aussi exposée au solvant. Chez Nab2, des expériences de mutagenèse ont montré que cette surface participe à l'interaction avec Mlp1 (*Myosin-like protein 1*, Grant et al., 2008), suggérant qu'une interaction similaire pourrait avoir lieu entre GIPC1_{Ct} et la myosine VI. Plus important encore, deux mutations ponctuelles sur des résidus de GIPC1 appartenant à cette surface, F319L et R332H, ont été retrouvées dans des tissus obtenus à partir de cancers ovariens et de sein (catalogue COSMIC, cancer.sanger.ac.uk), ainsi que dans des cancers des voies aérodigestives supérieures (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, Stransky et al., 2011). Tout ceci semble indiquer que cette surface pourrait participer à l'interaction avec la myosine VI (**figure 31**).

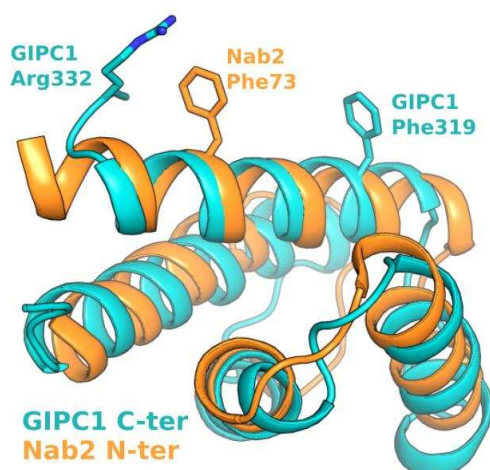


Figure 31 - GIPC1 C-ter et Nab2 N-ter ont des structures très similaires

Comparaison entre la structure du domaine N-ter de Nab2 (PDB 2V75, Grant et al., 2008)) et le domaine C-ter de GIPC1. Les deux structures sont similaires (r.m.s.d. de 2.1Å pour 61 Cα) et possèdent une phénylalanine très exposée sur la même surface.

Dans le but de tester cette hypothèse, l'interaction entre la myosine VI et le fragment GIPC1_{Ct-ΔN} contenant les mutations F319L ou R332H a été caractérisée (**tableau 8, figure 30**). Les deux mutants présentent une affinité sensiblement moins forte pour le construit CBD-fin, $K_d = 16$ et $9.5 \mu M$ respectivement. Afin de mieux caractériser la surface d'interaction, des résidus chargés ont été introduits dans cette surface. Ces expériences ont permis de trouver un mutant incapable d'interagir avec le CBD de la myosine VI (**tableau 8**), le triple mutant A301K+F319E+R332E. Grâce à la RMN nous avons vérifié que le repliement du domaine n'est pas affecté par l'introduction de ces mutations. Plus tard, j'ai observé que le double mutant A301K+F319E est suffisant pour abolir l'interaction entre GIPC1_{Ct} et le CBD de la myosine VI. Finalement, des mutations sur les surfaces restantes de GIPC1_{Ct-ΔN} ont également été introduites (**figure 32**), mais elles n'ont aucun effet sur le K_d mesuré avec CBD-fin. Ces expériences ont donc permis de définir précisément la surface de GIPC1 participant à l'interaction avec la myosine VI.

Tableau 8- Caractérisation de la surface de GIPC1 participant à l'interaction avec le CBD de la myosine VI

GIPC1 _{Ct-Δlinker}	K_d (μM)	<i>n</i>
WT	0.4 ± 0.1	3
F319L (COSMIC)	16.1 ± 1.7	2
F319E	4.6 ± 0.2	2
R332H (COSMIC)	9.5 ± 2.0	2
A301K, F319E	n.b.	2
A301K, F319E, R332E	n.b.	2
E289R, D293K	0.6 ± 0.2	2
D280R, E282R	0.5 ± 0.3	2
E282R, D310R	0.2 ± 0.1	2
E262S, E289R	0.3 ± 0.1	2

Toutes les expériences ont été réalisées avec ^{YFP}CBD-fin

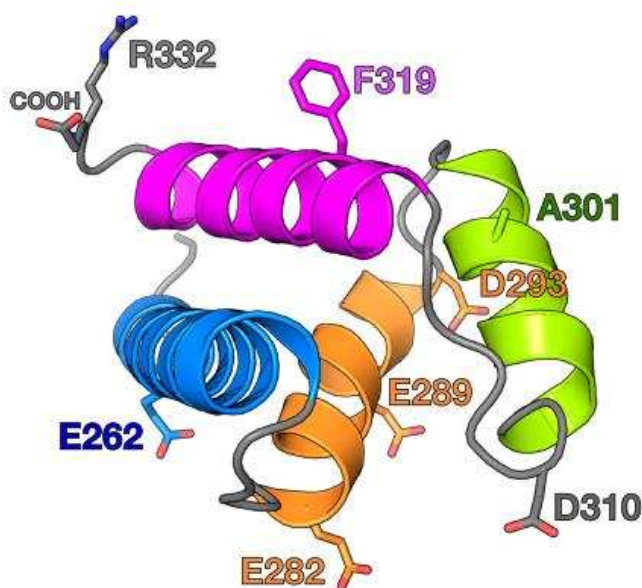


Figure 32 - Analyse des surfaces du fragment GIPC1_{ct}

Résidus choisis pour les expériences de mutagenèse réalisées (**tableau 8**) afin de trouver la surface participant à l'interaction avec le CBD de la myosine VI.

L'analyse des séquences montre que les résidus nécessaires pour interagir avec le CBD sont conservés non seulement chez la famille GIPC1 (**figure 28b**), mais aussi chez les homologues GIPC2 et, dans une certaine mesure, GIPC3 (**figure 28c**). Or, l'interaction de GIPC2 et GIPC3 avec myosine VI n'a jamais été décrite auparavant, et aucune fonction n'est attribuée aux domaines GIPC2_{ct} et GIPC3_{ct}. Cependant, des mutations faux-sens somatiques sur ces domaines sont associées au cancer (Kirikoshi and Katoh, 2002). De plus, des mutations de GIPC3 sont responsables d'une forme de surdité familiale (Charizopoulou et al., 2011). Des expériences de MST ont été réalisées et ont permis de décrire pour la première fois que GIPC2 et GIPC3 interagissent avec le CBD de la myosine VI avec une affinité similaire à GIPC1 ($\sim 0.4 \mu\text{M}$, **tableau 9**, **figure 30**), suggérant que le domaine C-ter de la famille GIPC a évolué en gardant sa capacité pour interagir avec la myosine VI. L'interaction avec GIPC2 et GIPC3 est également dépendante de l'isoforme (**tableau 9**), dans le même sens que GIPC1. La séquence des domaines PDZ de la famille GIPC étant aussi très conservée, la question se pose de savoir quel est le rôle des différents homologues. La clé semble être l'expression différentielle et la compartimentation subcellulaire (proteinsatlas.org). Par exemple, GIPC1 est le seul membre de la famille présent dans le foie, tandis que GIPC3 est le seul exprimé dans le tissu adipeux. GIPC3 est important pour la maintenance de la structure des stéréocils dans les cellules ciliées de l'oreille interne, où il co-localise avec la myosine VI (Charizopoulou et al., 2011). À niveau subcellulaire, GIPC1 se retrouve principalement au niveau de la membrane plasmique et des jonctions cellulaires (**figure 33**). GIPC2 est quant à lui présent majoritairement dans le noyau cellulaire (**figure 33**). Finalement, GIPC3 a été retrouvé dans les corps nucléaires et

l'appareil de Golgi (**figure 33**). La myosine VI (isoforme NI) est en effet également présente dans le noyau cellulaire (Fili et al., 2017; Zorca et al., 2015). Plus concrètement, elle est associée à des endroits avec une transcription active. Elle interagit avec la RNA polymérase II (Fili et al., 2017), et semble réguler son activité. GIPC2 et GIPC3, aussi présents dans le noyau, pourraient donc avoir un rôle dans ce contexte ensemble avec la myosine VI. Cette expression différentielle permettrait un degré de régulation additionnel dans la régulation de l'activité de la myosine VI en complexe avec les membres de la famille GIPC.

Tableau 9 – La myosine VI interagit avec GIPC2 et GIPC3

GIPC	Myosin VI	K_d	n
GIPC2 _{PDZ-end}	^{YFP} CBD-fin	$0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
GIPC2 _{PDZ-end}	^{YFP} CBD-fin _{NI}	$0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
GIPC2 _{PDZ-end}	^{YFP} CBD-fin _{LI}	n.b.	2
GIPC3 _{Ct}	^{YFP} CBD-fin	$0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$	3
GIPC3 _{Ct}	^{YFP} CBD-fin _{NI}	$0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
GIPC3 _{Ct}	^{YFP} CBD-fin _{LI}	n.b.	2

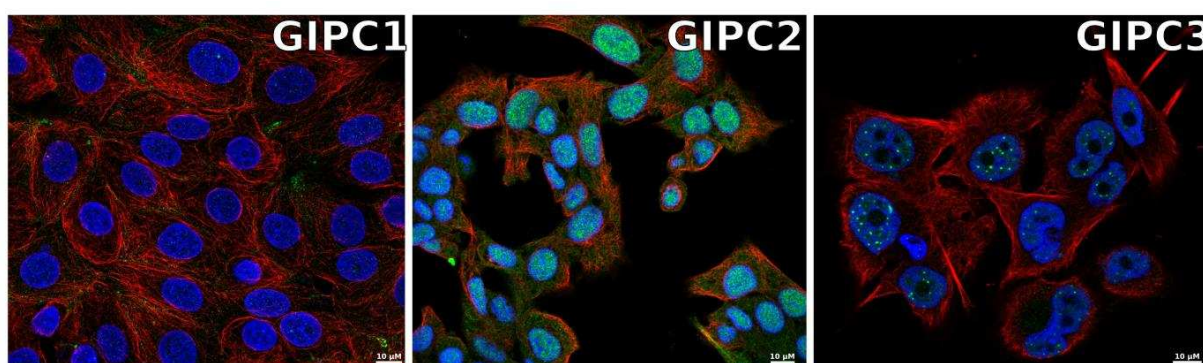


Figure 33 – Les différents membres de la famille GIPC sont recrutés dans différents endroits de la cellule (adapté de www.proteinatlas.org).

GIPC1 est recruté à la membrane plasmatique et, en particulier, aux jonctions cellulaires (cellules MCF7). GIPC2 se retrouve principalement dans le noyau cellulaire (cellules U-2 OS), mais aussi dans le cytoplasme. GIPC3 est, quant à lui, retrouvé dans le noyau, les corps nucléaires et l'appareil de golgi (cellules U-2 OS). Dans les trois images, les microtubules sont marqués en rouge, le noyau en bleu et GIPC en vert.

1.II.3.1.2.3 - Production et caractérisation du complexe

myosine VI-GIPC1

Comme décrit dans les sections 1.II.1 et 1.II.3.1.1, tant le CBD de la myosine VI comme le domaine C-ter de GIPC1 peuvent être produits et purifiés à partir d'*E. coli*. Afin d'obtenir la structure atomique du complexe à l'aide de la cristallographie aux rayons X, les deux protéines doivent donc être mélangées pour former le complexe avant les essais de cristallogénèse. Cependant, le mélange des protéines entraîne sa précipitation. En effet, un

précipité très visible se forme quand les deux protéines sont mises ensemble, même à basse concentration. Ceci m'a empêché de réaliser les expériences de titration par RMN afin de déterminer les résidus participant à l'interaction sur les deux protéines. Ces expériences avaient été prévues avec P. Barthe et C. Roumestand (CBS, Montpellier).

Pour éluder ce problème, j'ai pensé à la co-purification des deux protéines avec des vecteurs compatibles. Dans un premier temps, ces expériences ont montré que les deux protéines s'expriment, mais elles se retrouvent dans la fraction non soluble après la lyse des bactéries. Le même résultat est obtenu avec des vecteurs duals, optimisés pour la co-expression de protéines. Pendant de nombreux mois j'ai essayé d'optimiser les conditions de purification (tampon, détergents, sels, additifs, conditions de lyse des bactéries...) afin de solubiliser le complexe, mais sans succès. Finalement, l'utilisation d'une colonne de Nickel compatible avec un tampon de lyse sans imidazole (*cOmplete His-tag purification column*, de Roche) a permis de purifier les complexes formés par différents fragments de GIPC1 et du CBD de la myosine VI. La faible solubilité observée était donc une conséquence de l'imidazole (20 mM) présent dans le tampon de lyse utilisé (utilisé en routine pour éviter les interactions non-spécifiques avec le Nickel et réduire les contaminants). En effet, une fois le protocole de co-expression optimisé, plusieurs complexes ont été purifiés :

- CBD^N + GIPC1_{Ct} ;
- CBD^N + GIPC1_{Ct-ΔN} ;
- CBD-fin + GIPC1_{Ct-ΔN} ;
- DT-fin + GIPC1_{Ct-ΔN} ;
- SAH-fin + GIPC1_{Ct-ΔN}.

Tous ces complexes ont été caractérisés par SEC-MALS et les résultats sont résumés dans le **tableau 10**. En bref, les complexes formés avec des petits fragments du CBD (CBD^N) adoptent des stœchiométries aberrantes (2:3, 4:4...), très probablement suite à l'utilisation de petits fragments sortis du contexte de la protéine entière. Cependant, les complexes contenant la totalité du CBD, comme CBD-fin, DT-fin et SAH-fin, adoptent une stœchiométrie 1:1.

Les expériences de cristallogénèse ont permis de trouver des conditions de cristallisation pour la plupart de ces complexes. L'analyse des cristaux par SDS-PAGE a permis de confirmer la présence des deux protéines dans les cristaux (**figure 34**). Avec le fragment CBD^N en complexe avec GIPC1 (tant GIPC1_{Ct} comme GIPC1_{Ct-ΔN}) des cristaux diffractant jusqu'à 7.5 Å ont été obtenus. Des cristaux avec des dérivés contenant de la

sélenométhionine (SeMet) ont également été obtenus. Or, aucune information utile n'a pu être obtenue car la résolution était trop basse, et ce malgré des essais d'optimisation des conditions très poussés.

Comme décrit précédemment, le fragment 52-fin de GIPC1 est capable de dimériser, puis tétramériser à plus haute concentration. Ce fragment a également été co-purifié avec le fragment CBD-fin de la myosine VI. L'analyse par SEC-MALS montre que, à faible concentration (0.6 μM), le complexe est principalement monomérique. Or, à plus haute concentration ($\sim 69 \mu\text{M}$), un complexe 2:2 est retrouvé (**tableau 10**).

Tableau 10 – Caractérisation par MALS des complexes myosine VI-GIPC1

Myosine VI	GIPC1	Concentration du complexe (μM)	MM mesurée (kDa)	MM [#] théorique (kDa)	MM mes/théor
CBD ^N	GIPC1 _{Ct}	1.2	83.4	23.1	3.6
CBD ^N	GIPC1 _{Ct-ΔN}	2.0	94.3	21.5	4.4
CBD-fin	GIPC1 _{Ct-ΔN}	2.0	35.5	35.7	1.0
CBD-fin	GIPC1 _{Ct-ΔN}	170.0	33.6	35.7	0.9
YFPDT-fin	GIPC1 _{Ct-ΔN}	0.5	79.8	71.2	1.1
SAH-fin	GIPC1 _{Ct-ΔN}	0.3	48.4	53.1	0.9
SAH-fin	GIPC1 _{Ct-ΔN}	49.9	56.9	53.1	1.1
CBD-fin	GIPC1 _{52-fin}	Pic 1 (96.8% de masse)	0.6	52.7	56.8
		Pic 2 (3.2% de masse)	0.2	118.4	56.8
CBD-fin	GIPC1 _{52-fin}	68.7	101.7	56.8	1.8

[#]Masse moléculaire théorique pour un complexe 1:1



Figure 34 – Cristaux obtenus avec le complexe GIPC1_{Ct-ΔN} et CBD^N co-purifiés chez *E. coli*

Le complexe purifié cristallise et forme des cristaux cubiques (group d'espace I432) contenant les deux protéines (analyse SDS-PAGE à droite).

1.II.3.1.2.4 - La liaison à GIPC1 permet la dimérisation de la myosine VI

Des complexes avec des fragments de la myosine VI plus longs contenant la région de dimérisation (3HB-fin et PTD^C-fin) ont également été purifiés. En absence de GIPC1, ces fragments sont monomériques, et ce même à haute concentration (**tableau 1**, voir section 1.II.1.2.4. du présent chapitre). Or, en présence de GIPC1_{Ct-ΔN} ils adoptent une forme dimérique. En effet, la caractérisation de ces complexes par MALS et par SAXS montre qu'ils sont monomériques en solution à faible concentration, mais dimériques à plus haute concentration (**tableau 11, 12**). L'analyse par SAXS révèle également que le fragment PTD^C-fin ($R_g \sim 48 \text{ \AA}$) est plus compacte que le complexe PTD^C-fin+GIPC1_{Ct-ΔN} ($R_g \sim 60 \text{ \AA}$), en accord avec la dimérisation observée. De plus, le modèle généré par SAXS (**figure 35**) suggère une dimérisation interne, suivie d'une région plus globulaire. Ce modèle est très spéculatif car plusieurs enveloppes 3D peuvent être obtenues à partir d'une même courbe 2D. De plus, l'interprétation peut être très subjective. Cependant, ce modèle semblerait indiquer que GIPC1_{Ct-ΔN} ne participe pas directement à la dimérisation de la protéine. Ce modèle est en accord avec le fait que les complexes formés par GIPC1 avec des fragments de la queue de la myosine VI tels que CBD-fin sont monomériques (**tableau 10**). En effet, les complexes GIPC1_{Ct} avec des fragments petits de Myo6 sont des complexes 1:1 et une stœchiométrie 2:2 n'est retrouvée que lorsque la région de dimérisation proximale est présente dans le fragment de Myo6 (**tableau 10, 11**).

Tableau 11 – Caractérisation par MALS des complexes plus longs entre la myosine VI et GIPC1

Myosine VI	GIPC1	Concentration de protéine (μM)	MM mesurée (kDa)	MM théorique [#] (kDa)	MM mes/théor
PTD ^C -fin 875-fin	GIPC1 _{Ct-ΔN}	0.3	55.7	57.3	1.0
		18 ⁽¹⁾	96.5	57.3	1.7
		45 ⁽¹⁾	107.3	57.3	1.9
3HB-fin 834-fin	GIPC1 _{Ct-ΔN}	3.8	67.4	61.8	1.1
		152 ⁽¹⁾	123.0	61.8	2.0

[#]Masse moléculaire théorique pour un complexe 1:1

⁽¹⁾ Injection directe (voir méthodes, page 131)

Tableau 12 – Caractérisation par SAXS des complexes plus longs entre la myosine VI et GIPC1

Protéine	Concentration	Rg (Å)
PTD ^C -fin 875-fin	0.6 mg/ml (11.8 μM)	48.8 ± 1.3
	2.0 mg/ml (43.2 μM)	47.4 ± 0.3
PTD ^C -fin+GIPC1 _{Ct}	1.0 mg/ml (17.4 μM)	57.6 ± 1.2
	1.7 mg/ml (30.0 μM)	61.0 ± 1.0
	2.7 mg/ml (46.4 μM)	58.5 ± 1.3

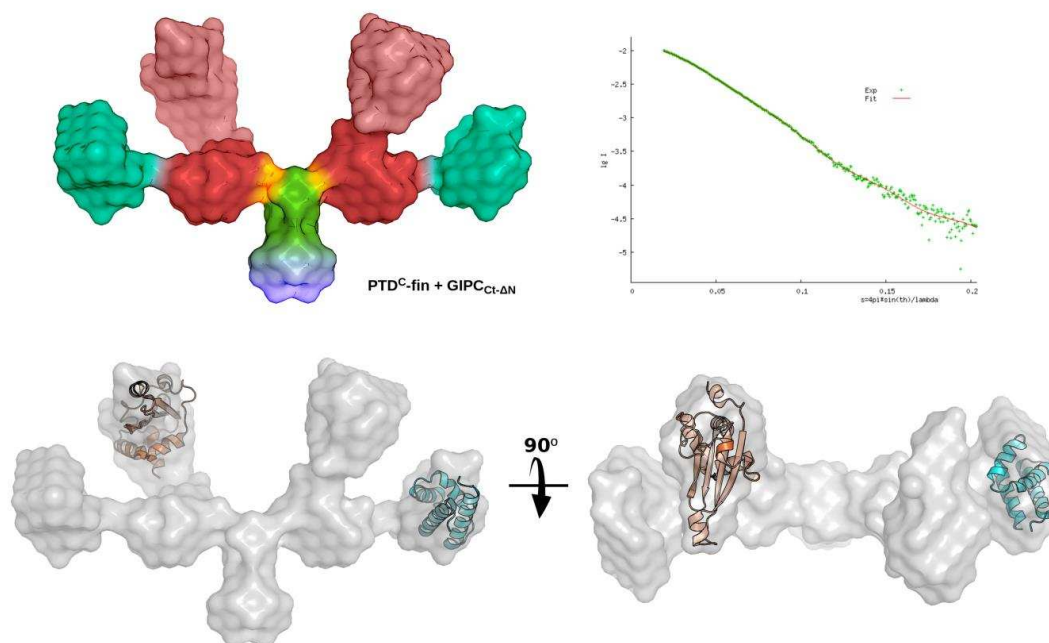


Figure 35 – Modèle SAXS du complexe PTD^C-fin + GIPC_{Ct-ΔN}

Représentation de l'enveloppe SAXS *ab initio* obtenue avec le programme DAMMIF (Franke and Svergun, 2009) ($\chi^2 = 1.284$, Dmax du construit de 152 Å). 20 modèles sont alignés et moyennés pour calculer l'enveloppe la plus probable avec DAMAVER (Volkov and Svergun, 2003). En accord avec les résultats de MALS (**tableau 11**), une symétrie d'ordre 2 (P2) a été imposée. La densité des parties supérieures (marron clair) et latérales (turquoise) sont compatibles avec les structures du CBD^C et de GIPC_{Ct-ΔN}, respectivement. Dans le modèle présenté en haut, le reste de l'enveloppe a été colorié selon les couleurs de la **figure 21** : bleu (PTD), vert (SAH), orange (DT), rouge (CBD^N) et marron clair (CBD^C).

Afin de mieux caractériser la dimérisation de la myosine VI, des fragments contenant uniquement la région prédite d'oligomérisation ont été analysés (**figure 21**, **figure 36**) : 875-955, 875-940, 880-940 et 888-940. La caractérisation par SEC-MALS montre que les fragments commençant au résidu 880 et 888 (fin de la deuxième hélice, H2, **figure 36**) sont monomériques, tandis que les construits débutant à l'intérieur de l'hélice H2 (rés. 875) sont dimériques (**tableau 13**).

Il a été proposé que le SAH pourrait être le principal acteur dans la dimérisation de la myosine VI (Kim et al., 2010). En effet, des simulations de dynamique moléculaire montrent qu'un décalage de 10Å dans le sens du SAH conférerait une complémentarité quasi parfaite entre les chaînes latérales chargées positives et négatives du SAH (**figure 37**). Or, le fragment SAH-fin (avec ou sans GIPC_{1Cc}) est monomérique même à très haute concentration (**tableau 1, 10**), indiquant que les interactions hydrophobes dans le domaine 3HB sont nécessaires pour la dimérisation de la myosine VI. De plus, le peptide 875-940, trop court selon les prédictions de Kim et al., est dimérique (**tableau 13**). Tous ces résultats indiquent que la complémentarité entre les charges positives et négatives dans le SAH n'est

pas critique pour la dimérisation de la myosine VI. Des expériences d'ultracentrifugation analytique plus récentes avec le SAH de la myosine VI (rés. 926-1023) sont en accord avec ces résultats puisqu'ils ont montré que le fragment est monomérique (Wolny et al., 2017).

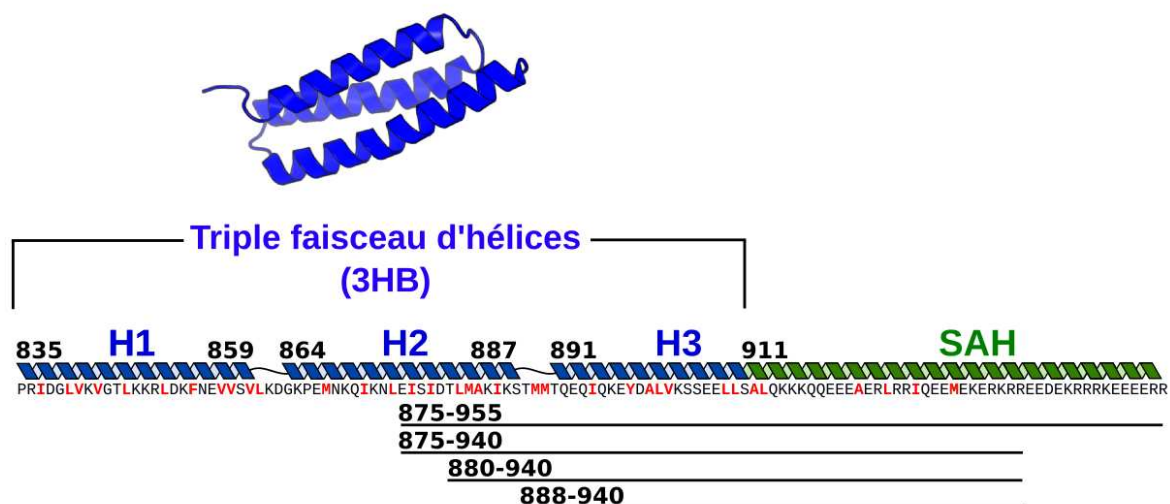


Figure 36 – La queue proximale de la myosine VI

Schéma du triple faisceau d'hélices (3HB) et du SAH. Les trois hélices du 3HB (H1, H2 et H3) sont connectées par de courtes régions flexibles. Les numéros des résidus sont indiqués. Les résidus hydrophobes sont indiqués en rouge.

Tableau 13 - Caractérisation de la région de dimérisation de la myosine VI par SEC-MALS

Myosine VI	Concentration de protéine (μM)	MM mesurée (kDa)	MM théorique [#] (kDa)	MM mes/théor
875-940	2.0	10.63	9.64	1.1
	4.6	13.76	9.64	1.4
	25.6	20.41	9.64	2.1
875-955	2.3	12.80	11.54	1.1
	6.9	19.41	11.54	1.7
	14.7	23.91	11.54	2.1
880-940	173.4	9.13	8.35	1.1
888-940	220.4	7.97	7.50	1.1

Ces résultats contrastent avec ce qui a été mesuré pour les construits PTD^C-fin (875-fin) et 3HB-fin (834-fin) : ils sont en effet monomériques en solution en absence de GIPC1_{Ct}. Dans le contexte de la myosine VI entière, le 3HB forme un faisceau fermé, replié sur lui-même (Mukherjea et al., 2009). Ceci impliquerait la présence d'interactions intramoléculaires entre la région 3HB et la queue C-terminale de la myosine VI, empêchant sa dimérisation. La liaison de GIPC1_{Ct} sur le CBD masquerait ces interactions, permettant ainsi la dimérisation de la myosine VI dans la région proximale. A noter que les fragments 875-940 et 875-955, dépourvus de la queue C-terminale, peuvent dimériser même en absence de GIPC1_{Ct}.

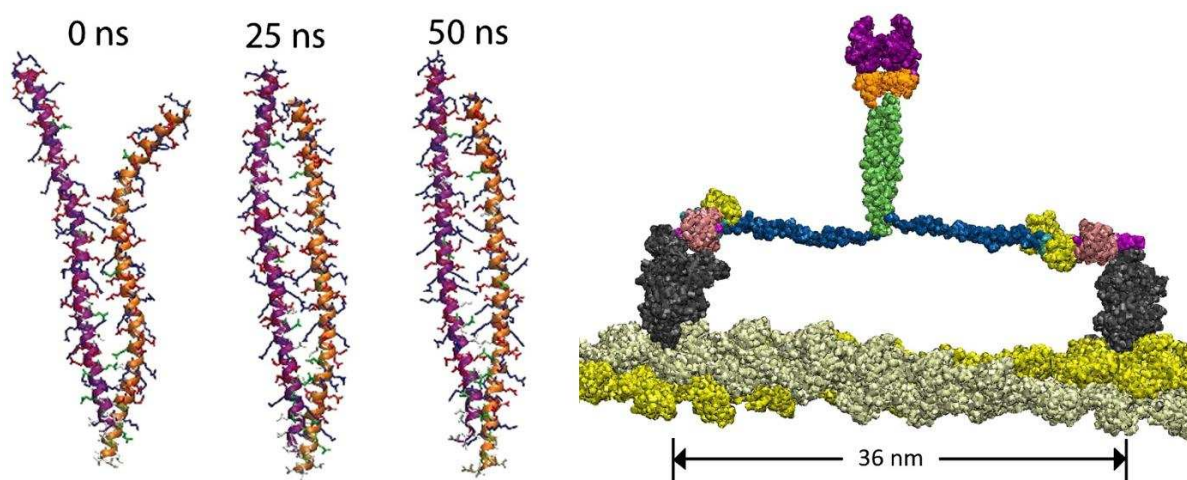


Figure 37 – Modèle proposé pour la dimérisation via le SAH (Kim et al., 2010)

Des simulations de dynamique moléculaire montrent que les SAH isolés ont une tendance à interagir pour former un dimère. Un décalage de 10 Å dans l'axe vertical permet d'obtenir une complémentarité entre les charges positives et négatives du SAH.

Ainsi, notre modèle actuel propose que des signaux cellulaires, tels que le calcium, sont les responsables de l'ouverture du monomère inactif (**tableau 3**, voir section 1.II.2 de ce chapitre). Une fois ouvert, la liaison aux partenaires tels que GIPC1 empêcherait la fermeture du monomère, gardant la myosine VI sur sa forme active. En même temps, cette interaction favoriserait l'ouverture du 3HB et donc la dimérisation proximale de la myosine VI. Le recrutement d'une troisième CaM sur le 3HB assurerait également la stabilisation du bras de levier (Mukherjea et al., 2009, 2014)

Le fait que le fragment 3HB-fin avec GIPC1 dimérise à haute concentration montre que, lorsque la concentration locale de monomères actifs est suffisamment élevée, par exemple grâce à des partenaires recrutant des monomères sur des vésicules, la myosine VI peut être capable de dimériser. Des partenaires monomériques pourraient donc participer, indirectement, à la dimérisation de la myosine VI. De plus, plusieurs protéines adaptatrices sont dimériques (Tumbarello et al., 2013), favorisant indirectement l'interaction entre les monomères de myosine VI pour produire une protéine dimérique, active et processive. GIPC1 est également capable de dimériser en présence du CBD de la myosine VI pour former un complexe 2:2 (**tableau 10**). Ceci montre que dans le contexte du dimère de GIPC1, chaque monomère de GIPC1 pourrait, en effet, recruter une myosine VI dimérique, permettant l'adoption d'un réseau myosine VI-GIPC1 et l'augmentation de la concentration locale de myosines (**figure 38a**).

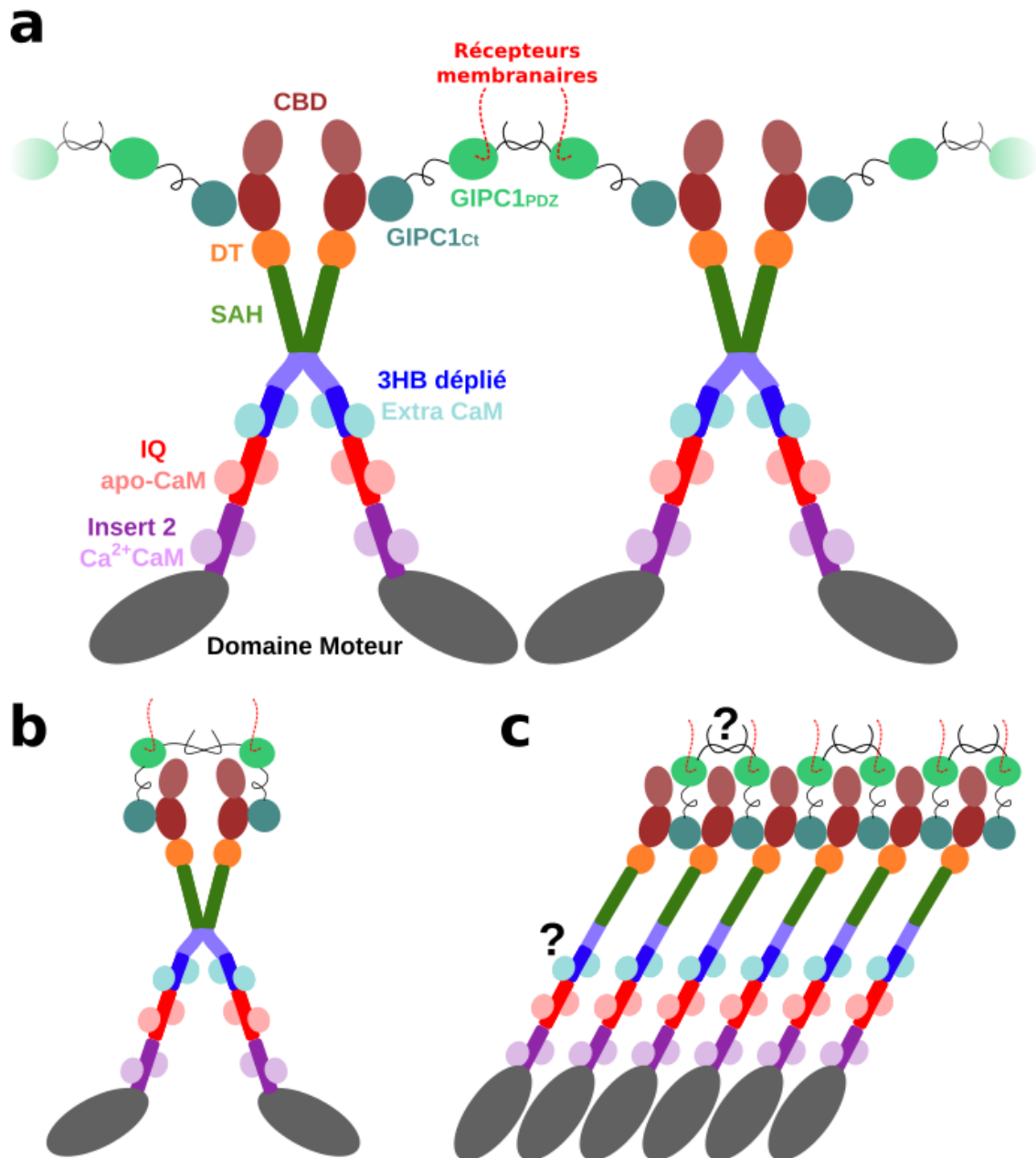


Figure 38 – Modèles d'un réseau myosine VI-GIPC1

Chaque domaine GIPC1_{Ct} interagit avec **(a)** une myosine VI différente ou **(b)** une même myosine VI. **(c)** Modèle proposé par Shang *et al.* (Shang *et al.*, 2017). Voir section 1.III.1, page 98.

Si le modèle proposé est correct, la myosine VI entière devrait montrer une très faible activité ATPase en absence de signaux permettant son ouverture, comme le Ca^{2+} . Elle serait sous forme auto-inhibée, inactive. En présence de Ca^{2+} la myosine s'ouvrirait pour donner une forme monomérique qui pourrait se refermer sur elle-même pour redevenir inactive, ou bien dimériser. L'addition d'un partenaire tel que GIPC1 déplacerait l'équilibre en empêchant la fermeture, favorisant ainsi l'adoption d'une forme dimérique, active et processive. Afin de valider ce modèle, nous avons réalisé des essais ATPase en collaboration

avec le laboratoire de Lee Sweeney (Université de Floride, US). Les résultats montrent, en effet, que la myosine VI atteint son activité ATPase maximale uniquement en présence de Ca^{2+} et de GIPC1 (**tableau 14**). L'interaction entre GIPC1_{Ct} et la myosine VI entière a été analysée (**tableau 15**). En accord avec ce modèle, en présence de MgADP.VO₄+EGTA (forme auto-inhibée, voir aussi section 1.II.2.1 et 1.II.2.2) l'interaction mesurée entre la myosine VI et GIPC1 est plus faible ($\sim 3 \mu\text{M}$) que celle obtenue avec le CBD isolé ($\sim 0.6 \mu\text{M}$, **tableau 7**) ou en présence de MgADP.VO₄+CaCl₂ ($\sim 0.4 \mu\text{M}$, forme ouverte) ou sans nucléotide ($\sim 0.5 \mu\text{M}$).

Tableau 14 – GIPC1 active l'activité ATPase de la myosine VI en présence d'actine

Condition		Taux ATPase (sec^{-1})
0 μM CaCl ₂	0 μM GIPC1 _{Ct}	0.61
100 μM CaCl ₂	0 μM GIPC1 _{Ct}	2.77
0 μM CaCl ₂	10 μM GIPC1 _{Ct}	6.21
100 μM CaCl ₂	10 μM GIPC1 _{Ct}	7.57

Tableau 15 – L'interaction de GIPC1 avec la myosine VI est en compétition avec les interactions intramoléculaires qui stabilisent l'état auto-inhibé de la myosine VI

GIPC1	Myosine VI	K_d (μM)	n
^{YFP} GIPC1 _{Ct}	M6-FL MgADP.VO ₄ + Ca^{2+}	$0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
^{YFP} GIPC1 _{Ct}	M6-FL sans nucléotide + EGTA	$0.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$	2
^{YFP} GIPC1 _{Ct}	M6-FL MgADP.VO ₄ + EGTA	$2.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$	2

1.II.3.2 - Autres partenaires

Tout le savoir-faire que j'ai acquis avec l'étude de GIPC1 (seul et en contexte de l'interaction avec le CBD de la myosine VI) a pu être directement appliqué pour l'étude d'autres protéines adaptatrices. Cependant, ces expériences ayant commencé plus tard pendant ma thèse, les résultats sont plus limités mais constitueront le point de départ pour d'autres personnes travaillant avec la myosine VI dans l'avenir du laboratoire. Ces études ont été en partie réalisées par des étudiants de master 2 que j'ai dirigés pendant ma troisième et quatrième année de thèse.

1.II.3.2.1 - NDP52

NDP52 (« *Nuclear Dot Protein 52 kDa* », aussi nommée CALCOCO2) est une protéine adaptatrice interagissant avec le motif « RRL » du CBD de la myosine VI (Morriswood et al., 2007; Wollscheid et al., 2016). NDP52 comporte un domaine N-terminal (SKITCH), une longue région de dimérisation en *coiled-coil*, et deux domaines en doigt de zinc en C-terminal (**figure 39**). L'extrémité C-terminale de NDP52 participe à l'interaction avec l'ubiquitine et la myosine VI (Morriswood et al., 2007; Xie et al., 2015). Le réseau de protéines interagissant avec NDP52 permet de recruter la myosine VI pour participer à l'autophagie sélective médiée par le système immunitaire inné. En effet, par son intermédiaire, la dégradation d'agents pathogènes infectieux (comme les entérobactéries) peut se faire dans les cellules de mammifères en reconnaissant spécifiquement les agents pathogènes recouverts d'ubiquitine (Xie et al., 2015).

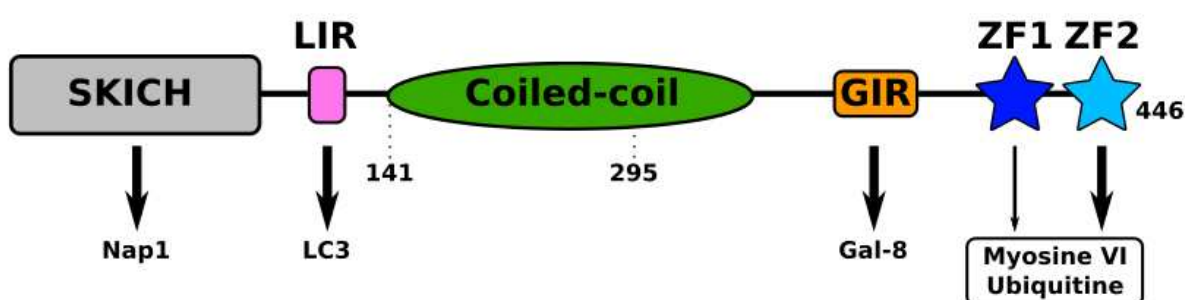


Figure 39 - Schéma représentant l'organisation de NDP52 (adapté de Xie et al., 2015).

La molécule de NDP52 dispose d'un domaine SKITCH N-terminal suivi d'un domaine LIR d'interaction avec LC3 et d'autres protéines similaires à l'ubiquitine, une grande région en *coiled-coil*, un domaine GIR d'interaction avec Gal-8 (« *Galactin-8 interacting region* ») et deux doigts de zinc (ZF1 et ZF2). L'interaction avec LC3, Galectin-8 et l'ubiquitine à travers des domaines LIR, GIR et ZF, respectivement, est essentielle pour le rôle de NDP52 comme adaptateur de l'autophagie.

1.II.3.2.1.1 - Identification et caractérisation des fragments interagissant avec la myosine VI

Il a été décrit que les doigts de zinc présents dans l'extrémité C-ter de NDP52 (résidus 365-446) sont les responsables de l'interaction avec le CBD de la myosine VI (Morriswood et al., 2007). Ainsi, le fragment 295-fin (**figure 39**, contenant 56 résidus du domaine *coiled-coil* afin de permettre la dimérisation du fragment) a été produit chez *E. coli*. Or, des essais de MST effectués dans les mêmes conditions qu'avec GIPC1 montrent que ce fragment interagit très faiblement avec le CBD de la myosine VI ($K_d = 200 \mu\text{M}$, **tableau 16**, **figure 40**).

À cette époque, j'ai rencontré Chris Toseland (Kent University, Canterbury), intéressé au rôle des myosines, dont la myosine VI, dans le noyau cellulaire. Dans ce contexte, il a caractérisé l'interaction entre le CBD de la myosine VI et NDP52 (car NDP52 est également une protéine nucléaire (Korioth et al., 1995)), retrouvant des constantes de dissociation autour de $1 \mu\text{M}$ (Fili et al., 2017). Autre que la technique utilisée (polarisation de fluorescence), la principale différence entre nos expériences est l'utilisation de la protéine entière (NDP52 FL) dans son cas. Il a donc été d'accord pour nous envoyer sa protéine déjà purifiée comme contrôle afin de caractériser l'interaction par MST. Comme attendu, un K_d similaire à celui retrouvé par C. Toseland a été mesuré par MST (**tableau 16**, **figure 40**) en utilisant le CBD entier (CBD-fin, $K_d \sim 1.1 \mu\text{M}$). De plus, un résultat similaire a été obtenu avec le fragment CBD^N ($K_d \sim 1.2 \mu\text{M}$) et SAH-fin ($K_d \sim 0.7 \mu\text{M}$), indiquant que, comme GIPC1, NDP52 interagit principalement avec le sous-domaine CBD^N de la myosine VI.

Tableau 16 – Caractérisation de l'interaction entre NDP52 et la myosine VI

NDP52	Myosin VI	K_d	n
295-fin	^{YFP} CBD-fin	$200 \pm 10 \mu\text{M}$	2
NDP52 FL	^{YFP} CBD-fin	$1.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$	4
NDP52 FL + 50 μM ZnCl ₂	^{YFP} CBD-fin	$0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$	2
^{YFP} NDP52 FL + 50 μM ZnCl ₂	SAH-fin [*]	$0.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$	2
^{YFP} NDP52 FL + 50 μM ZnCl ₂	SAH-fin ^{EINE}	$0.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$	2
^{YFP} NDP52 FL	CBD ^N	$1.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$	2

Fragment SAH-fin purifié à partir de cellules d'insecte *Sf9*.

Les doigts de zinc de NDP52, responsables de l'interaction avec la myosine VI, ont besoin de Zn²⁺ pour stabiliser sa structure (Xie et al., 2015). Les expériences de MST ont donc été répétées en présence de 50 μM de ZnCl₂. En effet, une affinité un peu plus importante a été mesurée ($K_d \sim 0.4 \mu\text{M}$, **tableau 16**, **figure 40**), confirmant le rôle des doigts de zinc dans l'interaction avec la myosine VI.

En conséquence, NDP52 FL a été utilisé pour la suite des analyses de l'interaction avec la myosine VI. L'analyse de NDP52 FL par SEC-MALS montre un pic correspondant à une espèce dimérique quasi homogène (**figure 41**), en accord avec la littérature (Kim et al., 2013).

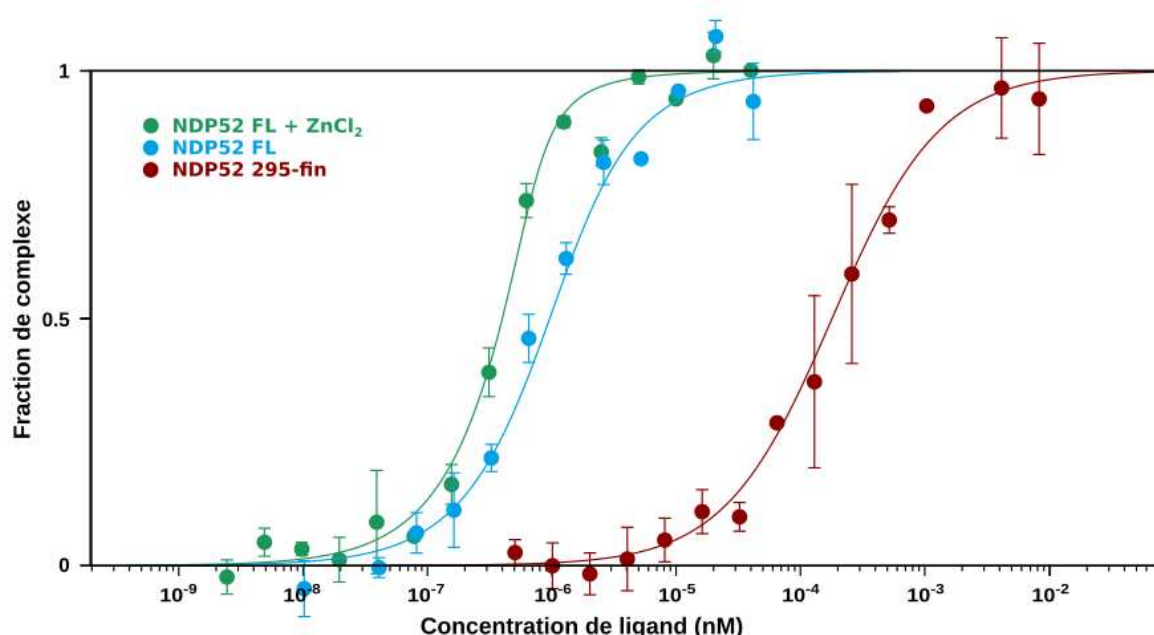


Figure 40 – NDP52 interagit avec le CBD de la myosine VI

Courbes MST représentatives mesurant l'interaction entre le fragment ^{YFP}CBD-fin de la myosine VI et différents fragments de NDP52. La moyenne $\pm$ déviation standard de deux réplicats est représentée. Voir aussi **tableau 16**.

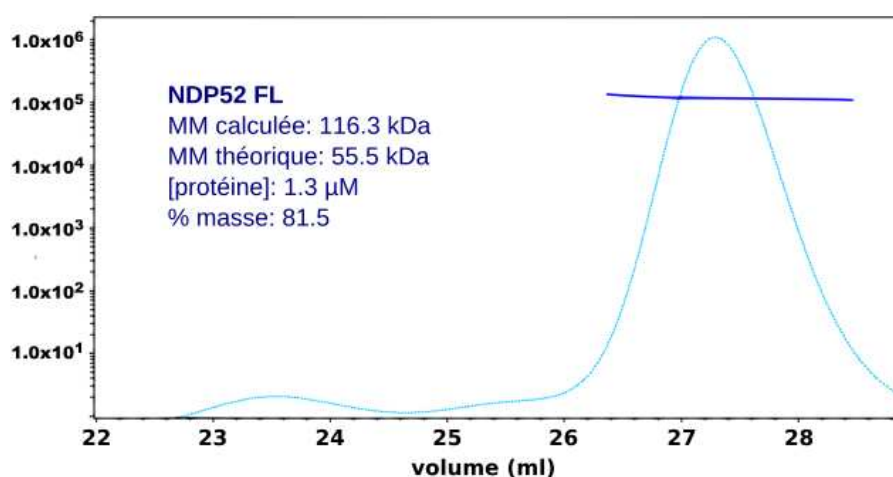


Figure 41 – NDP52 est dimérique en solution

Analyse par SEC-MALS de NDP52 montrant le signal en sortie du réfractomètre (bleu clair) et la masse moléculaire (MM, bleu). La concentration de protéine dans le pic est également indiquée. La colonne est équilibrée et éluée avec 20 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl et 1 mM TCEP.

1.II.3.2.1.2 - Production et caractérisation du complexe myosine VI-NDP52

Afin de purifier le complexe formé par le CBD de la myosine VI et NDP52, des systèmes de co-expression similaires à ceux mis en place avec GIPC1 ont été utilisés. Or, et contrairement à GIPC1, le rendement est très faible (<0.1 mg de protéine/L de culture) et ne permet pas d'atteindre une concentration suffisante pour débiter les essais de cristallisation. En effet, le peu de complexe formé ne résiste pas au passage sur les colonnes de purification. Le même résultat a été obtenu avec différents fragments du CBD de la myosine VI (SAH-fin, CBD-fin et CBD^N).

J'ai donc décidé de mélanger les deux protéines, purifiées séparément, avec différents ratios molaires (1:1, 2:1 et 1:2), mais aucune piste de cristallisation claire n'a été obtenue malgré de nombreux efforts. Il est cependant important de remarquer que quand NDP52 et le CBD de la myosine VI sont mélangés il n'y a pas de formation de précipité, comme c'est le cas pour GIPC1. Dans l'avenir, et si aucune piste de cristallisation n'est trouvée, ceci ouvre la possibilité d'utiliser la RMN afin de déterminer les résidus de la myosine VI participant à l'interaction avec NDP52 par titration (uniquement dans ce sens, car NDP52 a un poids moléculaire très élevé, ~107 kDa pour le dimère, rendant son analyse RMN difficile).

1.II.3.2.2 - Optineurine

Optineurine est une protéine cytosolique interagissant avec le motif « RRL » du CBD de la myosine VI (Sahlender et al., 2005). Comme NDP52, elle contient des domaines N-ter pour l'interaction avec d'autres protéines, dont LC3 ; une longue région en *coiled-coil*, et des doigts de Zn en C-ter (Ying and Yue, 2016, **figure 42**). Elle interagit également avec l'ubiquitine (Wagner et al., 2008). Elle peut également être ubiquitylée à plusieurs endroits de sa séquence, permettant sa régulation (Liu et al., 2014; Shen et al., 2011). Comme NDP52, optineurine est aussi un récepteur pour l'autophagie grâce à l'interaction avec LC3 et l'ubiquitine.

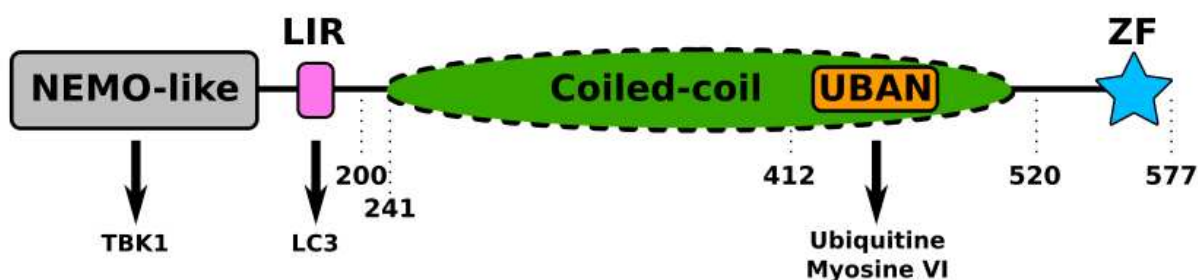


Figure 42 - Schéma représentant l'organisation d'optineurine (adapté de Nakazawa et al., 2016).
 La molécule d'optineurine dispose d'un domaine NEMO-like N-terminal suivi d'un domaine LIR d'interaction avec LC3 et d'autres protéines similaires à l'ubiquitine, une grande région en *coiled-coil* (contenant un domaine d'interaction avec l'ubiquitine, UBAN) et un domaine en doigt de zinc (ZF). La région en *coiled-coil* est fragmentée : la prédiction n'est pas parfaite dans l'ensemble de la région, mais elle contient des fragments d'environ 20-70 résidus avec une haute probabilité de former une structure en *coiled-coil*, séparées par des régions avec une probabilité ~0.

1.II.3.2.2.1 - Identification et caractérisation des fragments interagissant avec la myosine VI

Il a été décrit que le domaine UBAN d'optineurine (**figure 42**), dans la région en *coiled-coil*, interagit avec l'ubiquitine (Nakazawa et al., 2016) et le CBD de la myosine VI (Sahlender et al., 2005). En effet, des études de double-hybride (dans des cellules de mammifère) ont permis de caractériser la région participant à l'interaction avec la myosine VI, comme étant le fragment 412-520 (**figure 42**). Or, aucune interaction entre le fragment 200-526 et le CBD de la myosine VI n'a été observée par MST (**tableau 17**). De plus, aucune interaction n'est détectée entre le fragment 200-526 d'optineurine et la myosine VI entière (en présence de calcium pour favoriser la forme ouverte). Il est important de remarquer que ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles qui ont permis de mesurer l'affinité entre le CBD de la myosine VI et GIPC ou NDP52.

Tableau 17 – Caractérisation de l'interaction entre optineurine et la myosine VI

Optineurine	Myosin VI	K_d	n
200-526	^{YFP} CBD-fin	n.b.	3
^{YFP} 200-526	SAH-fin	n.b.	2
^{YFP} 200-526	M6-FL MgADP.VO ₄ + Ca ²⁺	n.b.	1
221-fin	^{YFP} CBD-fin	5.6 ± 1.0 μM	3
221-fin + 50 μM ZnCl ₂	^{YFP} CBD-fin	1.4 ± 0.2 μM	2
^{YFP} 221-fin	SAH-fin	3.5 ± 0.4 μM	2
221-fin	^{YFP} CBD-fin _{Li}	n.b.	2

Comme NDP52, optineurine contient un domaine en doigt de Zn à l'extrémité C-terminale (**figure 42**). Dans le cas de NDP52, ce domaine est essentiel pour l'interaction avec le CBD de la myosine VI (**tableau 16**, Morriswood et al., 2007) et avec l'ubiquitine (Xie et al., 2015). Il est donc raisonnable de penser que le doigt de Zn présent sur optineurine participe aussi à l'interaction avec la myosine VI. Afin de vérifier cette hypothèse un fragment plus long a été produit (221-fin) et l'interaction avec le CBD de la myosine VI a été mesurée. Comme pour NDP52, les deux protéines interagissent avec une affinité de l'ordre du micromolaire ($K_d \sim 4 \mu\text{M}$, **tableau 17**). Confirmant le rôle du domaine en doigt de Zn, l'affinité de l'interaction est légèrement plus importante en présence de Zn ($K_d \sim 1.4 \mu\text{M}$, **tableau 17**). Afin de vérifier que l'interaction observée représente vraiment l'interaction entre le CBD de la myosine VI et optineurine, des expériences de MST avec le fragment 221-fin ont été réalisées avec l'isoforme LI de la myosine VI. En effet, il a été décrit par des expériences de *pull-down* que cette isoforme n'interagit pas avec optineurine FL (Wollscheid et al., 2016). Confirmant ces résultats, aucune interaction n'a été observée entre les fragments 221-fin d'optineurine et $^{\text{YFP}}$ CBD-fin_{LI} (**tableau 17**).

Concernant la purification de complexes optineurine-myosine VI, les résultats sont très similaires à ceux obtenus avec NDP52. En effet, le complexe ne peut pas être purifié par co-expression : les deux protéines sont produites, mais le complexe est séparé dans les colonnes de purification. Contrairement à ce qui est observé avec GIPC1, le mélange de deux protéines déjà purifiées, optineurine et le CBD de la myosine VI (différents fragments : SAH-fin, CBD-fin et CBD^N) reste soluble, mais les deux protéines sont séparées suite au passage par une colonne de gel filtration. L'augmentation du rayon d'hydratation (R_h) de la particule mesurée par DLS indique en effet que la formation du complexe en solution est probable. La RMN pourrait donc être également utilisée afin de trouver les résidus sur la surface de la myosine VI participant à l'interaction avec optineurine. Ensemble avec les résultats obtenus avec NDP52, ces expériences permettraient l'introduction de mutations sélectives sur le CBD abolissant l'interaction avec uniquement un des deux partenaires. Ces mutants incapables d'interagir avec NDP52 ou avec optineurine pourraient ensuite être introduits dans des cellules afin de comprendre quel est le rôle de ces interactions. Les deux partenaires, NDP52 et optineurine, ainsi que la myosine VI ont des rôles clés dans l'autophagie qu'il reste cependant à définir (Tumbarello et al., 2013). Ces mutants permettraient de les étudier séparément pour comprendre quel est le rôle exact de leur association dans ce processus, par exemple.

1.II.3.2.3 - TOM1

Contrairement aux autres partenaires que j'ai étudiés, TOM1 (« *Target Of Myb1* ») utilise le site « WWY » sur le CBD^c pour son interaction avec le CBD de la myosine VI. TOM1 est un partenaire présent dans les endosomes (Tumbarello et al., 2012), comme GIPC1. TOM1, GIPC1 et la myosine VI sont retrouvés sur des vésicules présentes à la périphérie cellulaire (Tumbarello et al., 2012). Dans ce contexte, TOM1 représente un lien avec l'autophagie, car la perte de myosine VI et de TOM1 réduit le transport de cargos des endosomes jusqu'aux autophagosomes (Tumbarello et al., 2012).

1.II.3.2.3.1 - Production et caractérisation des chimères myosine VI-TOM1

La région de TOM1 participant à l'interaction avec la myosine VI (rés. 299-fin, Tumbarello et al., 2012) contient un motif similaire à celui de Dab2 (**figure 43**). Comme dans le cas de Dab2, des prédictions de structure secondaire indiquent que cette région est probablement désordonnée. La structure du CBD^C en complexe avec Dab2 est connue (Yu et al., 2009, **figure 14**), et elle montre que Dab2 est capable de dimériser indirectement le CBD de la myosine VI. Comme Dab2 est rapidement dégradé quand il est exprimé de façon isolé, les auteurs ont eu recours à l'utilisation de chimères myosine VI-Dab2 pour purifier et cristalliser le complexe. Ces chimères contiennent le CBD^C, suivi d'un *linker* flexible contenant un site de coupure à la thrombine, puis la région d'interaction avec la myosine VI de Dab2.

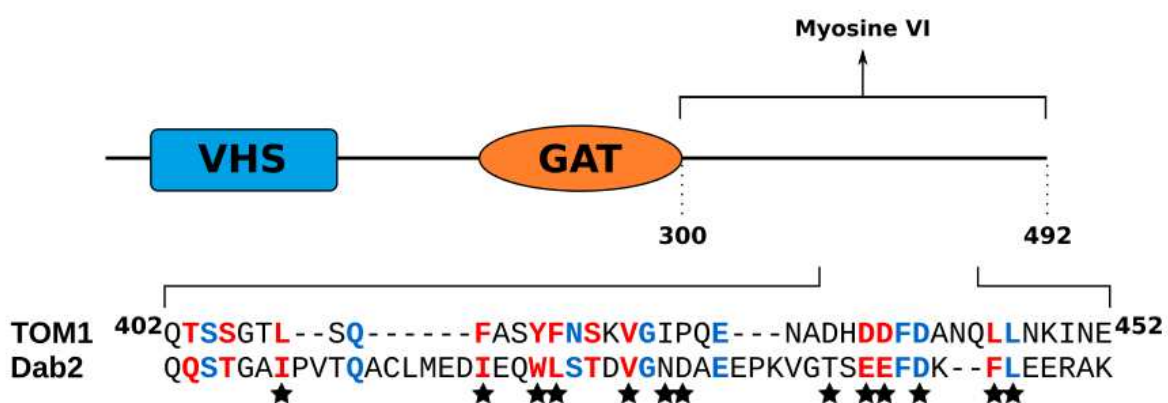


Figure 43 - Schéma représentant l'organisation de TOM1.

TOM1 dispose d'un domaine VHS impliqué dans le trafic cellulaire, un domaine GAT (GGA And Tom1, important pour la reconnaissance de l'ubiquitine) et une queue C-terminale désordonnée où se trouve la région d'interaction avec la myosine VI. Cette région contient une région similaire à la séquence de Dab2 participant à l'interaction avec le CBD de la myosine VI (les résidus strictement conservés et similaires sont indiqués en bleu et rouge, respectivement). Les résidus de Dab2 participant à l'interaction avec la myosine VI sont indiqués avec une étoile.

La même stratégie a été utilisée afin de produire les complexes avec TOM1. Deux fragments de TOM1 ont été utilisés : TOM1_{court} (résidus 408-461) et TOM1_{long} (résidus 394-461). En se basant sur la structure du CBD^C avec Dab2 publiée, le fragment TOM1_{court} devrait être capable d'interagir avec un monomère du CBD, tandis que le construit TOM1_{long} pourrait interagir avec deux monomères, potentiellement dimérisant le CBD, comme Dab2. Les chimères ont été conçues avec un site de coupure à la TEV à l'intérieur du *linker*, car cette protéase est plus spécifique que la thrombine.

Dans un premier temps, et dans le but de vérifier que TOM1 et la myosine VI interagissent dans les chimères, le fragment CBD^C a été utilisé. Comme décrit précédemment, ce fragment ne peut être purifié qu'avec la mutation L1238K (Yu et al., 2009), car autrement il est très peu soluble et montre des signes d'agrégation. Ceci représente donc un excellent contrôle pour déterminer si les deux protéines interagissent : en effet, la chimère CBD^C_{WT}-TOM1_{court} est soluble quand elle est exprimée dans la bactérie, suggérant que les deux protéines sont en interaction, car autrement le CBD^C ne devrait pas être soluble. Afin de vérifier que le complexe est formé, la protéine a été incubée avec la protéase TEV et analysée par SEC-MALS. Les deux protéines sont éluées dans un seul pic, avec une masse moléculaire calculée de 28.1 kDa (taille théorique du complexe 26.5 kDa, concentration dans le pic ~9 µM, **tableau 18**). Ces résultats suggèrent donc que les deux protéines sont en effet ensemble et forment un complexe stable et monomérique.

Tableau 18 – Caractérisation de l'interaction entre TOM1 et la myosine VI

Myosine VI	TOM1	Concentration de protéine (µM)	MM mesurée (kDa)	MM [#] théorique (kDa)	MM mes/théor
CBD ^C	TOM1 _{court}	8.8	28.1	26.5	1.1
CBD-fin	TOM1 _{court}	7.0	32.5	35.1	0.9
CBD-fin	TOM1 _{long}	Pic 1 (15.1% de masse)	0.3	68.5	36.1
		Pic 2 (84.9% de masse)	1.7	35.5	36.1

[#] Masse moléculaire théorique pour un complexe 1:1

Ensuite, le CBD entier a été utilisé. Deux chimères ont été produites : CBD-TOM1_{court} et CBD-TOM1_{long}. Dans les deux cas, les chimères sont incubées avec la protéase TEV et analysées par SEC-MALS. Comme attendu, le construit CBD-TOM1_{court} est homogène et monomérique (**tableau 18**). Or, la chimère CBD-TOM1_{long} a un comportement différent, et plusieurs pics sont observés dans le profil d'éluion (**tableau 18, figure 44**). Le calcul des tailles, ainsi que l'analyse par SDS-PAGE montre qu'un complexe 2:2 (CBD:TOM1_{long}) est formé et représente 15.1% de la masse injectée. La concentration moyenne dans le pic de

dimère est de 0.3 μM , indiquant que la constante de dimérisation est relativement basse. Afin de confirmer ces résultats, des expériences SAXS ont également été réalisées (**tableau 19**). En effet, la masse moléculaire calculée de la chimère CBD-TOM1_{long} correspond à un complexe 2:2 (concentration de protéine entre ~ 25 et $\sim 94 \mu\text{M}$), en accord avec les résultats de SEC-MALS. Le Rg est stable et n'augmente pas avec la concentration de protéine utilisée, indiquant qu'il n'y a pas de formation d'oligomères de plus grand ordre.

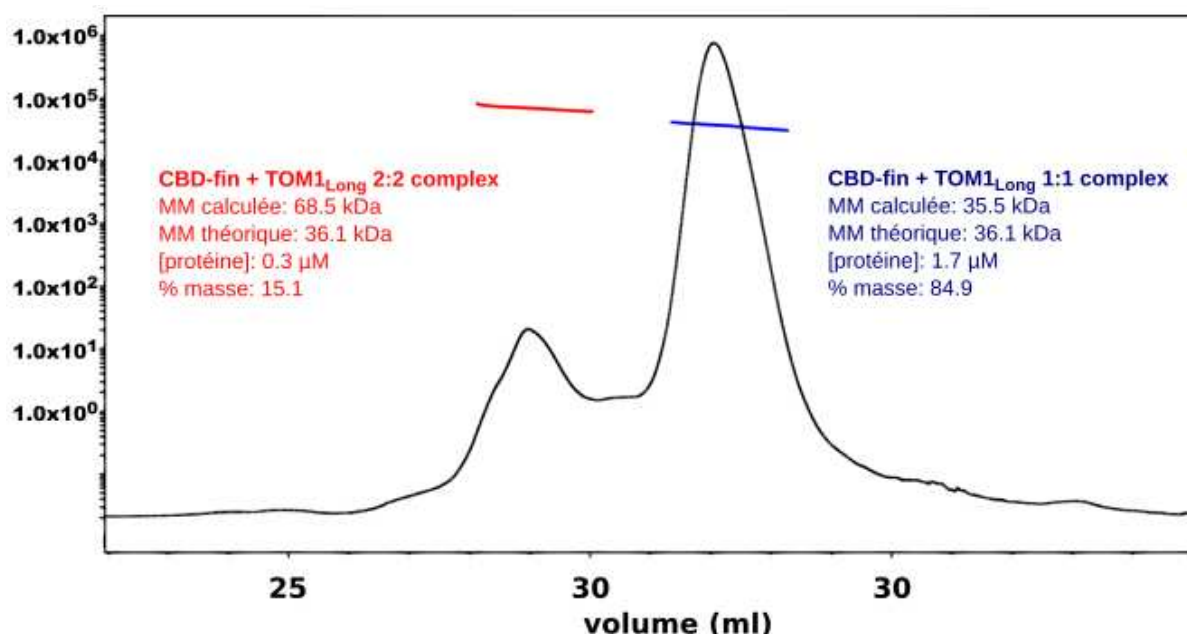


Figure 44 – TOM1_{Long} dimérise le CBD de la myosine VI en solution

Analyse par SEC-MALS de la chimère CBD-fin+TOM1_{Long} (incubée avec la protéase TEV pour couper la chaîne peptidique et libérer les deux protéines) montrant le signal du réfractomètre (noir) et les masses moléculaires (MM, bleu et rouge). La concentration de protéine dans le pic est également indiquée. La colonne est équilibrée et éluée avec 20 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl et 1 mM TCEP.

Tableau 19 – Caractérisation par SAXS des complexes avec TOM1

Protéine	Concentration	Rg (Å)	I(0)	MM mesurée (kDa)	MM mes/théor
CBD-fin+TOM1 _{Long}	0.9 mg/ml (25 μM)	30.2 $\pm$ 0.1	0.052	70.3 [#]	1.9 ⁽¹⁾
	2.1 mg/ml (58 μM)	33.0 $\pm$ 0.2	0.150	78.9	2.2 ⁽¹⁾
	3.4 mg/ml (94 μM)	32.1 $\pm$ 0.2	0.220	79.7	2.2 ⁽¹⁾
CBD-fin+TOM1 _{Long} +GIPC1 _{CT-ΔN}	1.6 mg/ml (35 μM)	58.6 $\pm$ 0.4	0.100	94.1	2.0 ⁽²⁾
	2.7 mg/ml (59 μM)	59.4 $\pm$ 0.1	0.150	83.6	1.8 ⁽²⁾

[#]Pour plus de détails concernant le calcul de la masse moléculaire expérimentale, voir méthodes (page 130)

⁽¹⁾ Masse moléculaire théorique pour un complexe 1:1 ; le complexe est donc 2:2

⁽²⁾ Masse moléculaire théorique pour un complexe 1:1:1 ; le complexe est donc 2:2:2

1.II.3.2.3.2 - Le CBD de la myosine VI interagit avec TOM1 et GIPC1

Le CBD de la myosine VI contient deux sites majeurs d'interaction : le site « RRL », présent sur le sous-domaine N-terminale du CBD (CBD^N) ; et le site « WWY », sur le CBD^C. Il a été proposé que ces deux sous domaines pourraient fonctionner comme des modules indépendants (Arden et al., 2016), c'est-à-dire, que deux protéines adaptatrices pourraient interagir en même temps avec le CBD d'une seule myosine VI, chacune reconnaissant un des deux sous-domaines.

Afin de vérifier cette possibilité, les chimères CBD-TOM1_{court} et CBD-TOM1_{long} (isoforme NI, sans inserts) ont été co-exprimées avec GIPC1_{Ct-ΔN}, incubées avec la protéase TEV (afin de couper le linker entre le CBD et TOM1) et analysés par SEC-MALS. Dans le premier cas, un seul pic est observé, avec une masse moléculaire calculée de 43.9 kDa (taille théorique 45.01 kDa, **tableau 20**), indiquant que les trois protéines forment un complexe 1:1:1, stable en solution. De plus, le construit CBD-TOM1_{court} interagit avec GIPC1_{Ct}, avec une affinité comparable à celle mesurée entre CBD-fin et GIPC1_{Ct} (**tableau 20**), indiquant que les deux partenaires peuvent interagir en même temps avec le CBD. Afin de favoriser l'interaction CBD – TOM1, ces expériences ont été réalisées avec la chimère CBD-TOM1_{court} sans incubation à la protéase TEV.

La co-expression de la chimère CBD-TOM1_{long} avec GIPC1_{Ct-ΔN} rend un résultat similaire à basse concentration: les trois protéines interagissent pour former un complexe 1:1:1 (49.3 kDa, concentration ~ 0.2 μM). Or, à plus haute concentration, TOM1_{long} et GIPC1_{Ct-ΔN} interagissent avec le CBD de la myosine VI pour former un complexe 2:2:2 (**tableau 19, 20**). Dans ce cas, TOM1_{long} dimérise le CBD de la myosine VI. Chaque CBD peut, à son tour, recruter un monomère de GIPC1_{Ct-ΔN}.

Tableau 20 – Caractérisation de l'interaction entre TOM1, GIPC1 et la myosine VI

Myosine VI	TOM1	GIPC1	Concentration de protéine (μM)	MM mesurée (kDa)	MM théorique [#] (kDa)	MM mes/théor
CBD-fin	TOM1 _{Court}	GIPC1 _{Ct-ΔN}	0.3	43.9	45.1	1.0
CBD-fin	TOM1 _{Long}	GIPC1 _{Ct-ΔN}	0.8	49.3	46.1	1.1
CBD-fin	TOM1 _{Long}	GIPC1 _{Ct-ΔN}	53.7 ⁽¹⁾	77.3	46.1	1.7

[#] Masse moléculaire théorique pour un complexe 1:1:1

⁽¹⁾ Injection directe (voir méthodes, page 131)

La myosine VI est recrutée par GIPC1 et TOM1 à la périphérie de la cellule, sur des vésicules d'endocytose dépourvues de clathrine. Il a été suggéré que les deux protéines facilitent le mouvement des vésicules à travers le réseau d'actine pour atteindre les endosomes précoces et de signalisation (Aschenbrenner et al., 2003; Dance et al., 2004; Naccache et al., 2006; Tumbarello et al., 2012). Dans ce contexte, GIPC1 est recruté sur ces endosomes par APPL1 (Varsano et al., 2006; Zhang and Simons, 2014), et des mutations sur le domaine PDZ de GIPC1 abolissent l'interaction avec APPL1 (Varsano et al., 2006). APPL1, quant à lui, interagit avec des récepteurs et des molécules de signalisation telles que l'insuline (Cheng et al., 2012), Akt (Schenck et al., 2008) et Wnt (Rashid et al., 2009). De son côté, le domaine VHS de TOM1 (**figure 43**) est impliqué dans le trafic cellulaire grâce à l'interaction avec des récepteurs présents dans le *trans*-golgi, tels que sortilin (Lohi et al., 2002). TOM1 interagit également avec Endofin (Seet et al., 2004), une protéine endosomale impliquée dans la régulation du trafic membranaire. Ensemble, ce réseau d'interactions suggère un rôle complémentaire pour GIPC1 et APPL1 dans le trafic et la maturation des endosomes précoces, ainsi que dans le recyclage des récepteurs membranaires. Ce processus nécessite l'activité de la myosine VI, puisque l'utilisation d'un mutant de la myosine VI affectant son activité moteur inhibe le trafic de ces vésicules (Aschenbrenner et al., 2004). Les trois protéines ont également un rôle clé dans le fonctionnement des endosomes de signalisation. La déplétion de la myosine VI perturbe la localisation et la composition de ces endosomes (Masters et al., 2017), et l'atténuation de l'expression de TOM1 produit une perte de la signalisation liée à ces endosomes (Masters et al., 2017). D'un autre côté, les domaines VHS et GAT de TOM1 interagissent avec des protéines clés pour l'autophagie, telles que l'ubiquitine et Tollip (Yamakami et al., 2003). TOM1 représente en fait le lien entre les endosomes et l'autophagie. En effet, la déplétion simultanée de myosine VI et de TOM1 réduit le transport de cargos des endosomes jusqu'aux autophagosomes, ainsi que la maturation de ces derniers (Tumbarello et al., 2012). Or, dans le contexte cellulaire, très peu est connu sur la façon dont la liaison aux partenaires régule l'activité de la myosine VI, et comment des partenaires individuels dirigent la myosine vers des sites spécifiques dans la cellule.

1.III - Conclusion

L'objectif principal de cette partie du projet était de caractériser différents complexes formés par la myosine VI et plusieurs partenaires. Dans un premier temps, l'objectif était donc de cristalliser le CBD de la myosine VI avec différents partenaires, afin de comparer les structures des complexes. Pendant presque trois ans, j'ai essayé de trouver les fragments du CBD les plus adaptés pour les caractériser de façon isolée, mais aussi pour effectuer des tests fonctionnels d'interaction et pour les purifier avec différents partenaires. Depuis, j'ai cristallisé plusieurs complexes, mais la diffraction des cristaux était trop faible pour résoudre la structure. Sans jamais quitter mon objectif principal, j'ai donc décidé de caractériser les complexes à l'aide de mutations sans attendre les structures.

Le partenaire que j'ai étudié le plus est GIPC1. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence l'affinité entre GIPC1 et le CBD de la myosine VI, autour de 0.4-0.8 μ M selon les fragments utilisés (**tableau 7**). Cette interaction est assez forte et comparable à l'affinité observée entre d'autres myosines et leurs partenaires (Fili et al., 2017; Pylypenko et al., 2013; Yu et al., 2017). Plus encore, la myosine VI interagit non seulement avec GIPC1, mais aussi avec les autres membres de la famille GIPC, GIPC2 et GIPC3, avec une affinité similaire (**tableau 9**). Ces résultats attribuent pour la première fois une fonction définie au domaine C-terminal très conservé dans la famille GIPC, nommé GH2 (« *GIPC Homology 2* », **figure 28c**). Le domaine GH1 (« *GIPC Homology 1* »), quant-à-lui, est le domaine N-ter d'oligomérisation (**figure 28a**). La dimérisation de GIPC1 est très peu caractérisée et limitée à des expériences de double hybride ou de *pull-down* (Kedlaya et al., 2006; Reed et al., 2005). Les expériences de MALS et de MST que j'ai réalisées ont permis de montrer que GIPC1 dimérise en solution à faible concentration (~ 1 μ M, **tableau 5**), mais il est également capable de former des tétramères stables (**tableau 5, 6**).

Mais le plus important a été d'étudier le rôle de l'interaction avec GIPC1 dans le contexte de la myosine VI entière. Mes recherches ont mis en évidence la dimérisation interne de la myosine VI, favorisée par GIPC1. En effet, tant le domaine GIPC1_{ct} comme le fragment 834-fin (ou 875-fin) de la myosine VI sont monomériques en solution. Or, quand les deux protéines sont co-exprimées, la myosine VI est capable de dimériser (**tableau 11, figure 35**). Des expériences de MALS ont permis de définir la région de dimérisation (**figure 36, tableau 13**). En effet, la myosine VI est capable de dimériser grâce à une séquence de dimérisation interne. Cette séquence est masquée dans la myosine VI inactive et forme un domaine à trois hélices (triple helix bundle, 3HB, **figure 36**). L'ouverture de ce

faisceau, suite à l'interaction avec des partenaires tels que GIPC1, rend possible la dimérisation interne de la myosine VI.

Dans le contexte de la cellule, GIPC1 forme très probablement des clusters à proximité de la membrane (Hasson, 2003), grâce à l'interaction entre son domaine PDZ et les queues cytoplasmiques de récepteurs membranaires (Katoh, 2013), augmentant ainsi la concentration locale de GIPC1 et favorisant l'oligomérisation. Chaque monomère est, à son tour, capable de recruter un CBD de la myosine VI (**tableau 10, figure 38**), permettant ainsi le recrutement de plusieurs myosines VI sur les vésicules d'endocytose, augmentant la concentration locale du moteur et favorisant son activation. La géométrie exacte adoptée par le dimère de GIPC1 en complexe avec deux myosines VI doit être étudiée davantage. La cristallisation de ce complexe 2:2 permettrait par exemple de déterminer si la position des myosines VI dans ce complexe est compatible avec sa dimérisation interne. L'analyse par SAXS est également nécessaire pour confirmer la morphologie du complexe en solution. Comme décrit précédemment, la morphologie du complexe a un impact direct sur les propriétés mécaniques de la myosine VI. La dimérisation permet en effet la coordination entre les deux têtes d'une myosine VI. Cette coordination semble critique pour le rôle d'ancrage (Sweeney and Houdusse, 2010a). En tant que transporteur, la coordination entre les deux têtes est également nécessaire, mais plusieurs monomères attachées sur une même vésicule sont également capables de la transporter (Sivaramakrishnan and Spudich, 2009).

Avec les résultats obtenus pour l'étude de la forme inactive de la myosine VI (section 1.II.2), un modèle plus précis de l'activation de la myosine VI par ses partenaires cellulaires peut être proposé et des controverses sont élucidées. Ce modèle suggère que la myosine VI, une fois produite, diffuse dans la cellule et à travers le réseau dense d'actine corticale en tant que monomère inactif. Des signaux cellulaires, tels que le calcium, sont les responsables de l'ouverture du monomère inactif (**figure 25, tableau 3**, voir aussi section 1.II.2.5 pour plus de détails). La liaison du calcium entraînerait une déstabilisation de la forme inactive. Cette déstabilisation temporaire est exploitée par différentes protéines dans la cellule. La liaison aux partenaires tels que GIPC1 empêcherait la fermeture du monomère, gardant la myosine VI sur sa forme active. De plus, une troisième CaM est recrutée sur le 3HB, permettant la stabilisation du bras de levier (Mukherjea et al., 2009, 2014). Mes expériences indiquent que le monomère doit d'abord s'ouvrir par l'effet du calcium avant de pouvoir interagir avec les partenaires, car les essais de MST effectués avec la myosine VI entière (et en présence d'EGTA) montrent que l'interaction avec GIPC1 est 10 fois plus

faible qu'en présence de CaCl_2 , ou avec le CBD isolé (**tableau 7, 15**). Une fois la myosine VI monomérique ouverte, l'interaction avec GIPC1 promeut sa dimérisation. Ceci impliquerait la présence d'interactions intramoléculaires entre le CBD et la région 3HB, empêchant la dimérisation de la myosine VI inactive. La liaison de GIPC1 sur le CBD est incompatible avec ces interactions, et peut donc contribuer à déstabiliser la région de dimérisation interne. Une autre possibilité est que la liaison avec GIPC1 entraîne des changements conformationnels dans la queue de la myosine VI, permettant ainsi sa dimérisation. Ceci montrerait que même des partenaires monomériques, comme GIPC1_{ct}, pourraient faciliter indirectement la dimérisation de la myosine VI. Une publication décrivant ces résultats est en cours de préparation.

Ce modèle, bien qu'il soit en accord avec les résultats obtenus, doit encore être confirmé et notamment analysé avec d'autres partenaires utilisant le CBD^N de la myosine VI pour l'interaction, comme GIPC1. Or, les deux autres partenaires étudiés, NDP52 et Optineurine (section 1.II.3.2.1 et 1.II.3.2.2, respectivement) interagissent plus faiblement avec le CBD et les complexes ne peuvent pas être analysés aussi facilement que GIPC1. Une autre protéine interagissant avec le CBD^N de la myosine VI est l'ubiquitine et, plus concrètement, la poly-ubiquitine K63 (He et al., 2016, **figure 45**. Le CBD interagit avec la di-ubiquitine K63 (di-Ub K63) avec une affinité similaire à celle de GIPC1 ($K_d \sim 0.6 \mu\text{M}$, **figure 46a**). Mais à la différence de GIPC1, l'analyse par MALS et DLS du mélange 1:2 (ratio molaire) de di-Ub K63 avec le fragment PTD^C-fin (875-fin) révèle une population unique et monodisperse avec une masse moléculaire correspondant à un complexe 2:4 (**figure 46b**, concentration $40 \mu\text{M}$). La di-Ub K63 ayant deux ubiquitines capables d'interagir chacune avec un CBD (**figure 45**), l'hypothèse la plus simple est d'imaginer deux dimères de myosine VI (à travers de la région proximale) chacun interagissant avec une di-Ub K63 (**figure 46b**). Dans ce cas aussi, ces résultats suggèrent que l'interaction avec l'ubiquitine permettrait la dimérisation interne de la myosine VI, mais cette hypothèse doit être confirmée avec des analyses complémentaires.

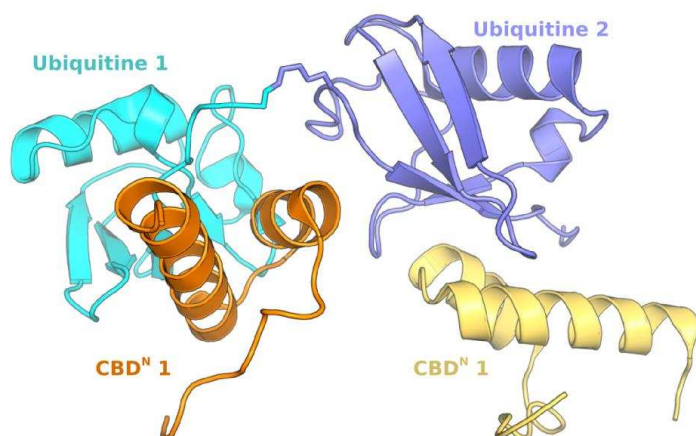


Figure 45 – Structure du complexe di-Ub K63 avec la partie N-ter du CBD^N de la myosine VI

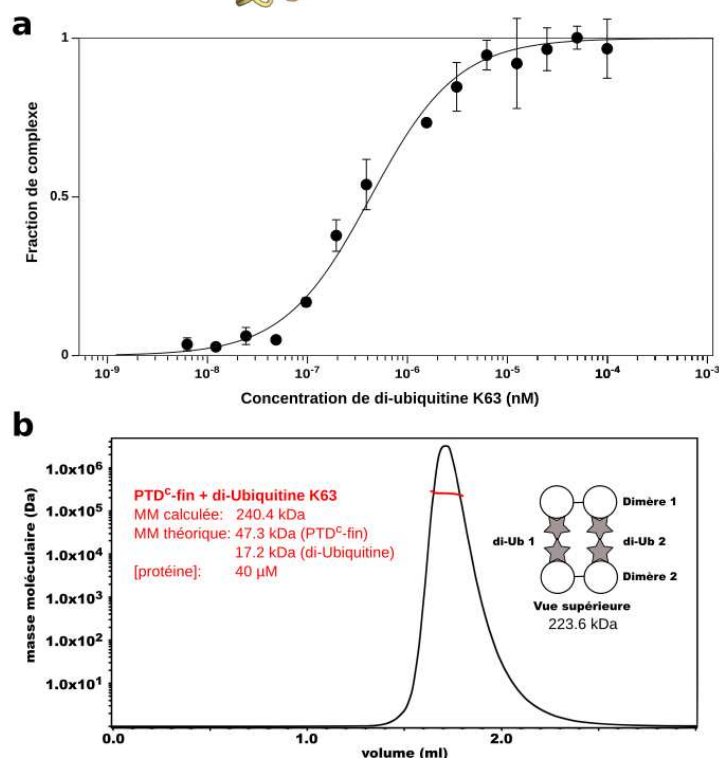


Figure 46 - La di-ubiquitine K63 interagit avec la queue de la myosine VI

(a) MST représentative de l'interaction entre le construit ^{YFP}CBD-fin de la myosine VI et la di-ubiquitine K63 ($K_d = 0.6 \pm 0.3 \mu M$). **(b)** Analyse par MALS (injection directe) du fragment PTDC-fin + di-ubiquitine K63 montrant le signal sortant du réfractomètre (noir) et la masse moléculaire (M.M, rouge). La concentration de protéine dans le pic est également indiquée.

NDP52 et Optineurine ont des doigts de zinc en position C-terminale. Dans les deux cas, ils sont nécessaires pour l'interaction avec le motif RRL du CBD de la myosine VI. C'est également le cas de T6BP (aussi appelé TAX1BP1, Morriswood et al., 2007). Or, d'autres protéines interagissant avec la même région de la myosine VI n'ont pas de doigts de zinc, comme GIPC1 ou DOCK7 (Sobczak et al., 2016, une GEF de la GTPase Rac1). Il est donc raisonnable de penser que le mode d'interaction utilisé par les protéines avec des doigts de zinc est différent de celui utilisé par les protéines dépourvues de ce domaine. Le CBD de la

myosine VI contient plusieurs sites de phosphorylation, dont les thréonines 1097 et 1100 (séquence TINT dans le CBD^N, **figure 9**, Sahlender et al., 2005). La mutation de cette séquence en EINE (mutations phosphomimétiques) abolit l'interaction avec optineurine (Sahlender et al., 2005), mais n'a aucun effet sur la reconnaissance de NDP52 et de GIPC1 (**tableau 7, 16**). De plus, optineurine semble favoriser une dimérisation de la myosine VI très différente de celle observée avec GIPC1 selon des expériences de microscopie électronique (**figure 47**, Phichith et al., 2009). Ensemble, ces résultats montrent que tous les partenaires décrits comme « RRL » n'interagissent pas de la même façon avec le CBD de la myosine VI. D'ailleurs, il a été décrit que la mutation du site RRL à ARL (mutation compatible avec le repliement du domaine CBD, Wollscheid et al., 2016) abolit complètement l'interaction avec GIPC1 et réduit de façon significative la force de l'interaction avec optineurine, mais n'a pas d'impact sur la liaison de NDP52 ou T6BP (**figure 12**). Parmi ces trois protéines, optineurine est la seule à avoir un seul doigt de zinc (**figure 42**, de type C₃H), tandis que NDP52 (C₃H et C₂H₂) et T6BP (C₂H₂ dans les deux cas) en ont deux chacun (**figure 39**). Ceci montre que, même parmi les partenaires ayant des doigts de zinc, les modes d'interaction avec la myosine VI peuvent être différents.

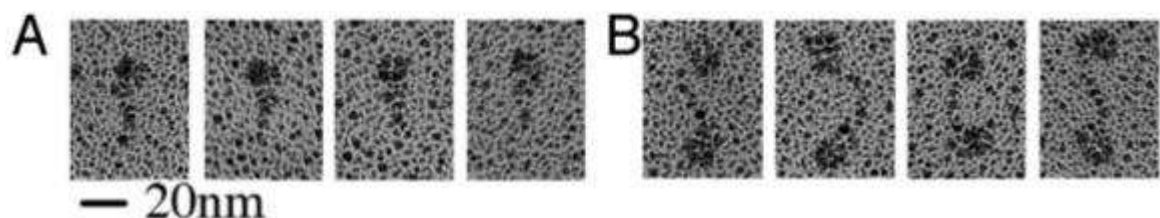


Figure 47 - Optineurine dimérise la myosine VI FL

Images représentatives de la myosine VI entière seule (**A**) ou en complexe avec optineurine (**B**). La myosine VI dimérisée par optineurine adopte une configuration presque linéaire, avec un angle de $\sim 180^\circ$ entre les deux domaines globulaires (domaines moteur).

Différents partenaires utiliseraient donc différentes surfaces du CBD pour interagir. Suite à ces différences, et à la diversité dans la propre morphologie de chaque partenaire de la myosine VI, il est donc possible de proposer que toutes les protéines interagissant avec la myosine VI ne façonnent pas le moteur de la même façon. Ces différences pourraient donc avoir des conséquences sur l'activité de la myosine VI et seraient être liées à la fonction de transporteur, d'ancrage, de senseur de force ou d'organisateur du réseau d'actine que doit

effectuer la myosine VI. De plus, les données déjà obtenues avec GIPC1 et celles provenant des structures résolues par cristallographie ou RMN avec d'autres partenaires, permettront d'effectuer des mutants ponctuels empêchant de façon sélective l'interaction entre ces partenaires et la myosine VI. Ainsi, le rôle exact de l'interaction entre la myosine VI et chaque partenaire pourra être étudiée *in vivo*. Des expériences de biologie cellulaire définiront si le partenaire a un rôle pour dicter l'action que la myosine VI doit effectuer une fois recrutée, ou si son rôle est uniquement d'activer et de positionner la myosine VI à l'endroit où elle est nécessaire. Ceci permettra d'établir le rôle exact de ces interactions dans la cellule. De plus, les études structurales menées avec plusieurs partenaires de la myosine VI définiront les caractéristiques associées à chacune de ces fonctions, i.e. transport ou ancrage. Ainsi, des mutants de la myosine VI sélectivement capables soit d'ancrer, soit de transporter pourront être conçus. Ces mutants permettront d'établir l'action exacte que la myosine VI effectue pour une fonction donnée dans la cellule.

1.III.1 - La surprise à la fin

À la toute fin de ma thèse, une publication décrivant plusieurs structures de GIPC a été publiée (Shang et al., 2017, publié le 24 mai 2017) :

1. **GIPC1 seul** (résidus 52-327) : à 1.90 Å de résolution (PDB 5V6B) ;
2. **PlexinD1** (partenaire de GIPC1), à 2.70 Å (PDB 5V6R);
3. **GIPC1+PlexinD1**, à 3.20 Å (PDB 5V6T) ;
4. **GIPC1_{ct}+myosine VI HCBD** (contenant uniquement la première moitié du CBD^N, rés. 1052-1096), à 3.50 Å (PDB 5V6E) ;
5. **GIPC2_{ct}+myosine VI HCBD**, à 3.60 Å (PDB 5V6H).

Les conclusions de cette étude sont détaillées ci-dessous. De nombreux résultats décrits dans cet article sont en accord avec ce que nous avons trouvé mais pas tous. Il est très important de remarquer que l'utilisation d'un fragment du CBD de la myosine aussi petit (uniquement 44 résidus, contenant le motif « RRL ») rend difficile l'interprétation de certains des résultats publiés, surtout lorsqu'ils sont comparés à nos résultats obtenus avec le CBD entier. Plus concrètement, les principaux résultats reportés par Shang *et al* sont :

A) Le fragment 52-fin de GIPC1 est capable de dimériser. En effet, Shang *et al* décrivent la structure d'un fragment de GIPC1 quasiment identique à celui que j'ai utilisé, 52-fin (il est important de remarquer que les auteurs ont supprimé les six derniers résidus, sans aucune raison apparente). Dans cette structure, GIPC1 forme un dimère dans lequel un grand nombre d'interactions se produit entre les domaines N-ter et PDZ de chaque monomère (**figure 48**) ; en fait un échange (« *swapping* ») s'effectue pour former le domaine N-ter (GH1). Ce dimère est donc prédit comme particulièrement stable et compact. Ce dimère a un Rg calculé de 28.2 Å, en accord avec ce que nous avons observé par SAXS (**tableau 6**). En effet, la courbe SAXS théorique du dimère est très proche de la courbe expérimentale ($\chi^2 = 0.75$) que nous avons collecté. Cependant, ces expériences ne permettent pas de démontrer si le « *swapping* » observé dans la structure cristallographique se produit également en solution.

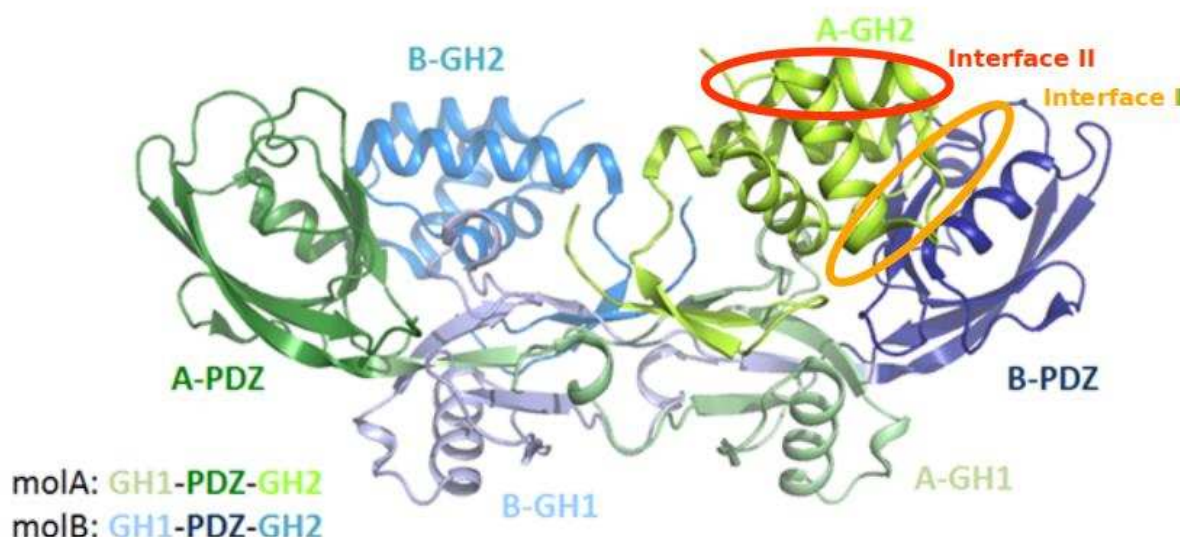


Figure 48 – Structure du dimère GIPC1 52-fin (Shang et al., 2017)

Vue générale de la structure cristallographique du fragment 52-fin de GIPC1. Dans le cristal, le dimère est très stable puisqu'il implique un échange des chaîne polypeptidiques pour constituer le domaine GH1 : le dernier brin β du domaine GH1 d'une molécule n'appartient pas à la même chaîne polypeptidique que le reste du domaine GH1. Ce faisant, les domaines GH1 établissent d'importantes interactions générant un dimère très stable.

B) Le CBD de la myosine VI interagit avec GIPC1, GIPC2 et GIPC3. En plus de la structure de GIPC1_{Ct} + HCBD, les auteurs ont également résolu une structure quasi identique avec GIPC2_{Ct} + HCBD (avec une résolution de 3.6Å). Ils ont également mis en évidence l'interaction de la myosine VI avec les trois homologues (GIPC1, GIPC2 et GIPC3) par des expériences de *pull-down*. Cependant, ils ne décrivent pas l'affinité entre la myosine VI et GIPC.

C) La surface de GIPC1 participant à l'interaction avec le CBD de la myosine VI. La structure de GIPC1_{Ct} + HCBD (avec une résolution de 3.5Å) montre que ces deux protéines interagissent pour constituer des oligomères linéaires dans le cristal (**figure 49**), avec cinq répétitions par unité asymétrique. Pour ce faire, GIPC1 utilise deux surfaces d'interaction avec le HCBD. La surface d'interaction que j'ai caractérisée (autour de la F319, **tableau 8, figure 30, 32**) grâce à l'analyse de la structure RMN de GIPC1_{Ct} participe à l'interaction avec le HCBD, et la Phe319 a effectivement un rôle clé dans cette interaction (cette surface est nommée « *interface II* » par les auteurs). Or, d'après la structure cristallographique, les auteurs proposent que GIPC1_{Ct} ait une autre surface d'interaction avec le HCBD (« *interface I* »), favorisant la formation d'oligomères linéaires (**figure 49**). Les auteurs confirment la présence de ces oligomères en solution par des expériences de centrifugation analytique. Il est vrai que nous avons nous même constaté que des

fragments petits de myosine VI précipitaient très facilement en ajoutant le partenaire GIPC1. Des stœchiométries aberrantes ont aussi été observées par MALS pour les complexes entre GIPC1_{Ct} et de petits fragments du CBD de la myosine VI. Notez cependant que cette oligomérisation n'est pas observée dans nos expériences avec des fragments plus grands de myosine VI. C'est pour cela que j'avais écarté l'idée de travailler sur ces petits fragments de myosine VI pour décrire l'interface avec GIPC1.

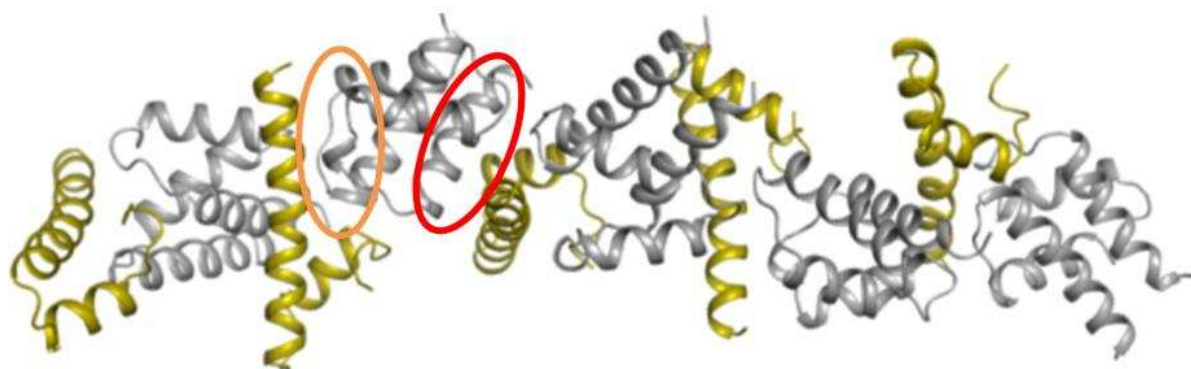


Figure 49 – Structure du complexe myosine VI-GIPC1_{Ct} (Shang et al., 2017)

Dans la structure cristallographique, GIPC1_{Ct} (gris) interagit avec le fragment HCBd de la myosine VI (jaune) sur deux surfaces opposées, ce qui permet la formation d'oligomères linéaires, en sandwich.

Notez de plus que dans la structure de GIPC1 seul (52-326), l'interface I se trouve à l'intérieur du dimère, et est donc inaccessible (**figure 48**). Les auteurs proposent que GIPC1 est donc auto-inhibé dans cet état dimérique. Leur modèle prévoit que la liaison avec PlexinD1 à la membrane libère cette auto-inhibition, et permet au domaine C-ter de se trouver disponible pour interagir avec le CBD de la myosine VI.

Or, plusieurs de nos résultats contredisent ce modèle :

1. Nous observons aussi la formation d'oligomères entre le CBD^N et GIPC1_{Ct} (**tableau 10**). Cependant, GIPC1_{Ct} forme des complexes 1:1 avec les fragments plus grands contenant le CBD entier (SAH-fin, DT-fin, CBD-fin), même à très haute concentration.
2. L'introduction du mutant F319E sur le fragment GIPC1_{Ct} produit une diminution de l'affinité pour le CBD de la myosine de ~10 fois, et le double mutant A301K+F319E n'interagit plus avec le CBD (**tableau 8**). Or, dans la structure publiée, le résidu A301 ne participe pas à l'interaction avec le HCBd. Des expériences de RMN ont montré que la structure du triple mutant A301K+F319E+R332E est identique à celle de la protéine sauvage, indiquant que le repliement du domaine n'est pas en cause.

3. Dans la structure du complexe, les résidus D280 et E282 se retrouvent à l'interface I d'interaction avec le HCBD (interface I). Cependant, les mutants D280R et E282R n'ont pas d'effet sur l'interaction avec le CBD-fin de la myosine VI (**tableau 8**). L'introduction de la longue chaîne latérale de l'arginine, chargée positivement, devrait affaiblir l'interaction entre GIPC1_{Ct} et le CBD de la myosine VI si l'interface I participait réellement à cette interaction.
4. Les essais de MST montrent que l'affinité mesurée avec GIPC1 52-fin est identique à celle mesurée avec le fragment GIPC1_{Ct}, suggérant que GIPC1 52-fin n'est pas auto-inhibé. En effet, l'interface II, contenant le résidu F319, est accessible dans la structure publiée (**figure 48, 49**, cercle rouge).

Ensemble, ces résultats suggèrent qu'une surface proche de l'interface II (pour inclure l'A301, **figure 48, 49**, cercle rouge) est, en effet, la principale surface d'interaction avec le CBD entier de la myosine VI. Les expériences de MST indiquent que l'interface I ne participe pas à l'interaction avec le CBD entier (ou que sa contribution est très faible). L'hélice HCBD isolée est très hydrophobe et contient plusieurs chaînes aromatiques exposées en surface. L'interaction observée entre l'interface I et le HCBD pourrait être un artefact suite à l'utilisation d'un fragment du CBD très petit et sorti de son contexte protéique habituel.

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé des expériences de MSTs avec GIPC1_{52-fin} et un fragment très similaire au HCBD (rés. 1080-1131). Comme décrit précédemment, l'interface I n'est pas accessible dans le dimère GIPC1 52-fin (**figure 48**, cercle orange). En effet, l'affinité mesurée est très faible ($K_d = 69.8 \pm 7 \mu\text{M}$, $n=2$). Ce petit fragment de myosine VI interagit normalement avec le fragment GIPC1_{Ct} ($K_d = 0.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$, $n=2$). L'interface II étant disponible et accessible dans le dimère de GIPC1, le fragment 52-fin de GIPC1 interagit avec les fragments SAH-fin et CBD-fin de la myosine VI avec une affinité identique à celle mesurée avec le fragment GIPC1_{Ct} (**tableau 7**).

Ceci est en accord avec le fait que GIPC1_{Ct} forme des oligomères avec le HCBD (car il y a deux surfaces d'interaction), mais uniquement des complexes 1:1 avec le CBD entier. Des résultats préliminaires de motilité *in vitro* réalisés en collaboration avec le laboratoire de Lee Sweeney montrent que l'addition de GFP-GIPC1_{Ct} en présence de Ca^{2+} permet de visualiser le déplacement de la myosine VI entière sur des filaments d'actine par des expériences de TIRF. La fluorescence mesurée exclut la formation d'oligomères. Ce

déplacement est donc le résultat d'une dimérisation de la myosine VI. Jumelés à d'autres de nos expériences (MST, MALS et SAXS), les résultats indiquent que l'interface II, autour de la Phe319, est la principale surface d'interaction avec GIPC1. Comme décrit précédemment, des expériences de cristallographie et de SAXS sont en cours afin de visualiser directement l'interface d'interaction entre la myosine VI et GIPC1, ainsi que pour caractériser la forme et stœchiométrie du complexe formé par le dimère de GIPC1 et le CBD de la myosine VI. De plus, le dimère de GIPC1 doit également être davantage caractérisé. Le « *swapping* » produit pour former les domaines GH1 devrait rendre un dimère très stable, car un grand nombre d'interactions se produisent entre les domaines N-ter et PDZ de chaque monomère (**figure 48**). Or, à basse concentration (0.5 μ M) la protéine est en équilibre monomère-dimère (13%-87%, respectivement, **tableau 5**). Des mutants de GIPC1 incapables de dimériser peuvent également être envisagés afin d'étudier le rôle de cette dimérisation dans la cellule.

En conclusion, l'étude menée par Shang et collègues décrit le dimère formé par GIPC1, et comment il serait activé par des partenaires utilisant le PDZ de GIPC1 pour l'interaction. Cependant, du fait de l'utilisation du HCBD uniquement, ils n'ont pas étudié le rôle de GIPC dans l'activation et la dimérisation interne de la myosine VI. Ces travaux n'ont donc pas caractérisé la forme active adoptée par la myosine VI suite à la liaison aux partenaires. Les travaux effectués pendant ma thèse, ainsi que ceux qui sont toujours en cours dans le laboratoire, permettront de définir de façon précise comment les partenaires activent et façonnent la myosine VI pour ses différentes fonctions dans la cellule. La description des structures atomiques des complexes, ainsi que leur caractérisation biophysique, sera couplée à des expériences *in vitro* et dans la cellule afin de comprendre le rôle précis que ces protéines ont dans le contexte des cellules.

CHAPITRE 2 : Les myosines MyTH4-FERM

sont des moteurs polyvalents

2.1 Introduction

2.1.1 Les myosines MyTH4-FERM

La superfamille des myosines est constituée de plus de 45 classes (Odrionitz and Kollmar, 2007; Pasha et al., 2016; Sebé-Pedrós et al., 2014). Un groupe particulier parmi les myosines dites « non conventionnelles » contient un ou deux domaines MyTH4-FERM dans sa queue (**figure 50**) : ce sont les myosines MyTH4-FERM. Dans le génome humain, il s'agit des myosines VIIa, VIIb, X et XVa qui se déplacent vers l'extrémité positive des filaments d'actine.

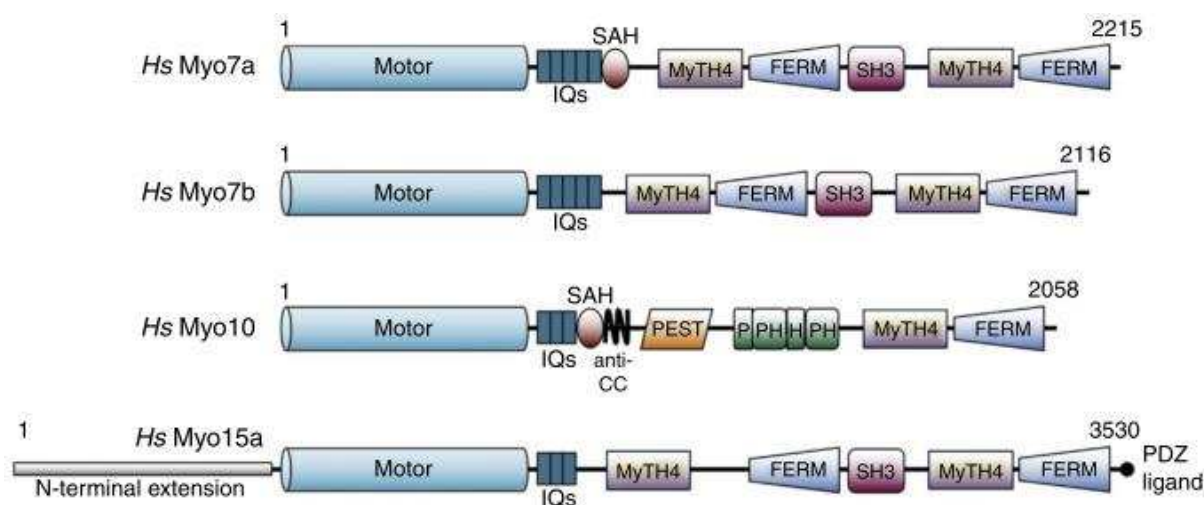


Figure 50 - Organisation simplifiée des myosines MyTH4-FERM humaines (Weck et al., 2017).

Comme toutes les myosines, les myosines MyTH4-FERM (MF) contiennent un domaine moteur en N-terminal et plusieurs régions IQ de liaison à la calmoduline. En plus, la myosine XVa contient une extension avant le domaine moteur. La myosine VIIa et la myosine X ont un SAH (« *Single α -helix* »). À l'exception de la myosine X, toutes contiennent deux domaines MF en C-terminal, séparées par un domaine SH3. La myosine X, quant à elle, contient un seul domaine MF précédé d'un domaine PEST et trois domaines PH (« *Pleckstrin Homology* »).

Les myosines MyTH4-FERM (MF) sont apparues très tôt dans l'évolution. En effet, elles sont retrouvées dans des organismes allant des amibes aux humains (Sebé-Pedrós et al., 2014). Des études menées avec l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Dicty, Dd) indiquent que les myosines MF ont des rôles anciens et conservés dans la médiation des interactions entre la membrane et le cytosquelette dans des structures protrusives telles que les filopodes (Petersen et al., 2016; Tuxworth et al., 2001). Parmi les quatre myosines MF exprimées chez les humains (myosine VIIa, VIIb, X et XVa), les myosines VIIa et XVa sont retrouvées dans les stéréocils des cellules ciliées (Hasson et al., 1995; Liang et al., 1999), la myosine VIIb est présente, quant à elle, dans les microvillosités des cellules épithéliales (Chen et al., 2001), tandis que la myosine X est retrouvée dans les filopodes (Berg et al., 2000, **figure 51**).

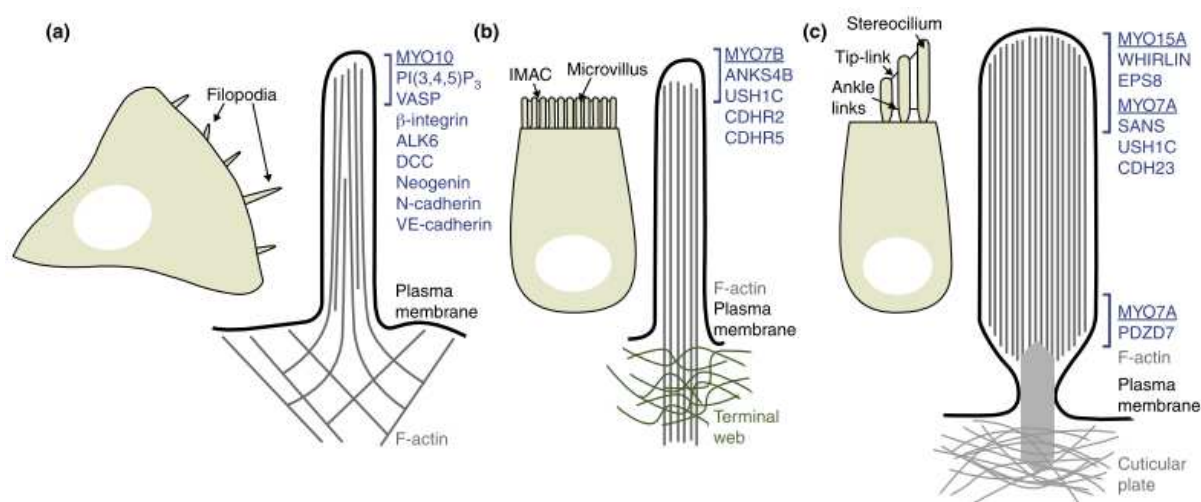


Figure 51 - Protrusions cellulaires associées aux myosines MyTH4-FERM (Weck et al., 2017). Filopodes **(a)**, microvillosités **(b)** et stéréocils **(c)**. La localisation des myosines MyTH4-FERM et leurs partenaires est indiquée.

Le domaine MyTH4-FERM est un supramodule constitué par un domaine MyTH4 (*Myosin Tail Homology 4*) et un domaine FERM (*band 4.1*, *ezrin*, *radixin*, *moesin*) interagissant étroitement (Wu et al., 2011). Le domaine FERM est un domaine d'interaction avec d'autres protéines et, dans différentes myosines, ce domaine interagit avec des récepteurs participant à la signalisation, avec des protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire ainsi qu'avec des protéines de liaison à l'actine (Boëda et al., 2002; Liu et al., 2008; Zhang et al., 2004). Le domaine FERM est également impliqué dans l'auto-inhibition des myosines VIIa et X de mammifère, ainsi que la myosine VIIa de drosophile (Umeki et al., 2009, 2011; Yang et al., 2009). Le domaine MyTH4, quant à lui, a été moins caractérisé pour

son interaction avec d'autres protéines dans la cellule. Il a été démontré cependant que pour la myosine X de mammifère et la myosine VII de *Dicty*, le domaine Myth4 interagit avec les microtubules dans la cellule (Hirano et al., 2011; Moen et al., 2011; Narasimhulu and Reddy, 1998; Weber et al., 2004; Woolner et al., 2008). En effet, cette interaction est critique pour l'orientation du fuseau mitotique des mammifères (Kwon et al., 2015; Woolner et al., 2008). Grâce à cette possibilité, ces myosines représentent un lien entre les microtubules et les filaments d'actine, les deux principaux réseaux du cytosquelette cellulaire.

La myosine VII de *Dicty* (DdMF7) et la myosine X humaine se trouvent à l'extrémité des filopodes et sont essentielles pour son extension (Berg and Cheney, 2002; Bohil et al., 2006; Tuxworth et al., 2001), suggérant que cette fonction a été conservée pendant l'évolution (Petersen et al., 2016). Elles transportent des récepteurs et d'autres protéines à l'intérieur des filopodes (Kerber and Cheney, 2011), et sont nécessaires pour l'adhésion des cellules au substrat (Tuxworth et al., 2001; Zhang et al., 2004). D'autres myosines MF de mammifère, telles que la myosine XV, VIIa et VIIb ont des rôles clés dans l'extension et/ou l'organisation de protrusions cellulaires remplies d'actine, telles que les stéréocils et les microvillosités (Belyantseva et al., 2005; Crawley et al., 2014; El-Amraoui and Petit, 2005). La myosine X de mammifère et la myosine XV de drosophile sont nécessaires pour les adhésions intercellulaires dépendantes de la cadhérine dans les cellules épithéliales (Liu et al., 2012, 2008). Ensemble, ces fonctions montrent que les myosines MF ont évolué pour participer à des fonctions similaires, et ce dans des types cellulaires et des organismes très divers.

2.1.1.1 - Les myosines VII

La classe des myosines VII contient deux membres : la myosine VIIa et la myosine VIIb, qui contiennent deux domaines MF dans la queue C-terminale, séparés par un domaine SH3 (**figure 50**). En amont des domaines MF, la myosine VIIa contient une région SAH (« *Single α -helix* ») et une possible région de dimérisation. En effet, la dimérisation des myosines VII est encore très débattue car leur séquence ne possède pas de domaine de dimérisation en *coiled-coil* caractéristique d'autres myosines (Li et al., 2017; Peckham, 2011; Sato et al., 2017). Des études récentes montrent cependant que la dimérisation pourrait être importante pour son activité (Sakai et al., 2015; Sato et al., 2017). La myosine VIIa pourrait être dimérisée par des partenaires interagissant avec la queue C-terminale (Sakai et al., 2011). L'équipe « Motilité Structurale » travaille pour caractériser la région de dimérisation de la myosine VIIa ainsi que son implication dans les propriétés du moteur.

2.II.1.1.1 - La myosine VIIa

La myosine VIIa (aussi nommée USH1B) est un des membres les plus étudiés de cette classe. Elle est importante pour le développement des stéréocils, des expansions cytoplasmiques remplies d'actine localisées à la surface apicale des cellules ciliées de l'oreille interne, importantes pour la perception du son et de l'équilibre. Les stéréocils sont attachés entre eux afin d'assurer le maintien de leur morphologie et pour permettre la transmission de leurs mouvements (Petit and Richardson, 2009). Des mutations dans la séquence de la myosine VIIa entraînent non seulement des défauts morphologiques des stéréocils, mais aussi une mauvaise localisation des protéines interagissant avec ce moteur (Lefèvre et al., 2008). Ces défauts sont associés à l'apparition du syndrome d'Usher, un trouble génétique rare associé à la perte de l'ouïe dès la naissance, accompagnée de vertiges et d'une baisse de la vision dès l'enfance. Chacune des cinq protéines impliquées dans le syndrome d'Usher I a un rôle clé dans l'organisation des stéréocils. La cadhérine-23 et la protocadhérine-15 constituent le lien entre les stéréocils, tandis que l'harmonine et SANS étendent cette interaction en interagissant avec la queue cytoplasmique des cadhérines et avec la myosine VIIa (**figure 52**). Finalement, ce moteur myosine assure une interaction dynamique et génératrice de force avec les filaments d'actine organisés en faisceau au sein des stéréocils (Bahloul et al., 2010; El-Amraoui and Petit, 2005; Gillespie and Müller, 2009). Le complexe associant ces protéines Usher est donc responsable de la mécano-transduction qui permet de relier les cadhérines au cytosquelette sous-jacent mais il pourrait également assurer le transport des composants de ce complexe.

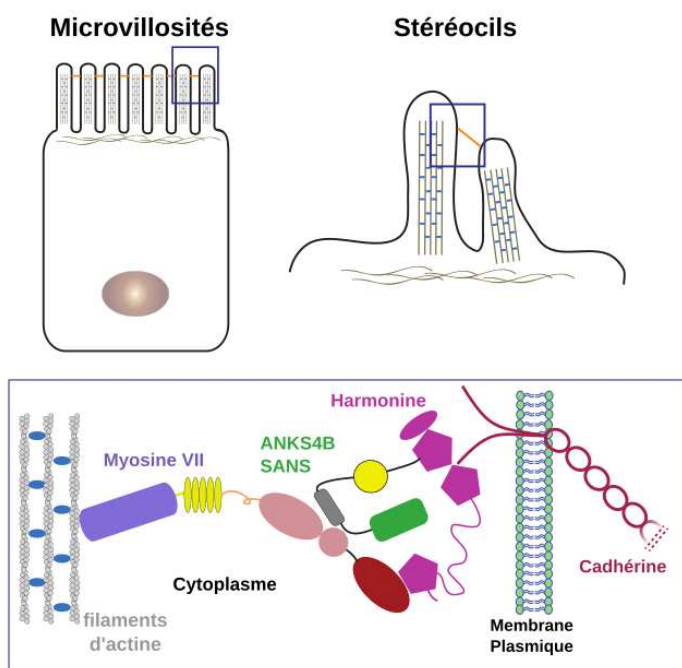


Figure 52 - Composants des microvillosités et des stéréocils.

Schéma représentant les complexes ternaires faisant le lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine dans les microvillosités épithéliales et les stéréocils. L'harmonine interagit avec la myosine VIIb et ANKS4B dans les microvillosités, et avec la myosine VIIa et SANS dans les stéréocils.

2.II.1.1.2 - La myosine VIIb

De façon parallèle, la myosine VIIb est présente dans les microvillosités, et il a été mis en évidence récemment que des interactions similaires ont lieu entre des protéines homologues à celles retrouvées dans les stéréocils (**figure 52**). En effet, la protocadherine-24 et la cadhérine CDHR5 représentent le lien entre les microvillosités. Dans ces structures, l'harmonine interagit également avec les queues cytoplasmiques des cadhérines et relie ce complexe aux filaments d'actine par l'intermédiaire de ANKS4B et de la myosine VIIb (Crawley et al., 2014, 2016; Weck et al., 2017).

2.II.1.1.3 - La myosine VII de *Dictyostelium*

Comme décrit précédemment, la myosine VII de *Dicty* (DdMF7) a des rôles similaires à ceux de la myosine X humaine. Ces deux myosines sont, en effet, nécessaires pour la formation des filopodes (Bohil et al., 2006; Tuxworth et al., 2001). Les deux moteurs ont des caractéristiques communes : ils ont un domaine SAH et un domaine MyTH4-FERM C-terminal. Or, la myosine DdMF7 a, en plus, un domaine MyTH4-FERM proximal additionnel (MF1) ainsi qu'un domaine SH3 placé entre les deux domaines MyTH4-FERMs.

L'analyse phylogénétique des myosines MF suggère l'existence d'un ancêtre, similaire à DdMF7, avec deux domaines MyTH4-FERM (Petersen et al., 2016). Au cours de l'évolution, des duplications ont conduit à l'apparition de la myosine X. Au moins un domaine MyTH4-FERM est requis pour assurer la fonction cellulaire. Très étonnamment, et malgré le temps évolutif séparant ces deux myosines, une chimère du moteur DdMF7 pour lequel le MF2 est remplacé par le domaine MF de la myosine X est capable de rétablir le phénotype défectueux dans des cellules de *Dicty* dépourvues de DdMF7 (Petersen et al., 2016).

2.Projet a. Analyse de l'interaction entre les microtubules et les domaines MyTH4-FERM et sa conservation pendant l'évolution

2.IIa. Objectifs

La première partie de notre étude des myosines MYTH4-FERM a consisté à mieux comprendre en quoi des motifs conservés au cours de l'évolution pourraient contribuer aux fonctions cellulaires requises pour former des filopodes ou lier les microtubules. Les structures du domaine MF1 de la myosine VIIa (Wu et al., 2011) et de la myosine X de mammifère (Hirano et al., 2011; Wei et al., 2011) sont connues, et leur analyse montre qu'elles sont similaires. Les microtubules ont des surfaces chargées négativement, notamment grâce aux extrémités C-terminales désordonnées riches en glutamate de l' α - et β -tubuline. L'analyse de la surface du domaine MyTH4 de la myosine X montre une région très chargée positivement (Hirano et al., 2011), suggérant un rôle dans la reconnaissance des microtubules. En effet, des mutations dans cette surface ont montré qu'elle est critique pour l'interaction. De façon très intéressante, ces résidus sont conservés dans la séquence du premier domaine MF de la myosine VII de *Dicty* (DdMF1), mais absents dans le deuxième (DdMF2). Comme la myosine X, la myosine VII de *Dicty* interagit avec les microtubules (Hirano et al., 2011; Moen et al., 2011; Weber et al., 2004; Woolner et al., 2008). Cependant, la myosine VII de *Dicty* et la myosine X de mammifère ont évolué de façon indépendante pendant plus de 600 millions d'années. La structure du supramodule MyTH4-FERM de *Dicty* est nécessaire pour comprendre comment ce domaine a évolué pour participer à des fonctions similaires dans des types cellulaires et des organismes très distants.

En collaboration avec l'équipe de Margaret A Titus (Université de Minnesota, US), le but de cette étude était de caractériser de façon plus précise l'interaction entre les microtubules et deux myosines : la myosine X humaine, ainsi que la myosine VII de *Dicty*.

2.IIIa. Résultats et discussion

Dans cette étude, des analyses biochimiques couplées à l'analyse des structures des domaines MF de mammifère et de *Dicty* ont permis de caractériser les surfaces d'interaction entre les myosines MF et les microtubules, ainsi que leur conservation pendant l'évolution. La résolution des structures cristallographiques de DdMF1 et de DdMF2 a permis de les comparer à celles des myosines MyTH4-FERM de mammifère. En effet, malgré la distance évolutive séparant les amibes des mammifères, les structures des domaines MF sont

proches. L'analyse détaillée de ces structures couplée à l'analyse phylogénétique et biochimique a permis de caractériser les surfaces d'interaction entre la myosine VII et les microtubules.

Les principaux résultats sont résumés ci-dessous :

1. La structure du supramodule MyTH4-FERM est conservée dans l'évolution. Les structures du premier et deuxième domaine MF de *Dicty* (DdMF1 et DdMF2) sont similaires à celles des myosines X et VII de mammifère. Le domaine MyTH4, composé de 7 hélices, interagit étroitement avec le FERM pour former un supramodule rigide.

2. Des insertions et des délétions modifient les surfaces exposées. En effet, l'analyse détaillée des structures révèle que des insertions, spécifiques de certaines classes de myosines, modifient les surfaces disponibles pour l'interaction avec les partenaires. Ces insertions et délétions peuvent donc moduler la spécificité des domaines MF pour certains partenaires.

3. Le domaine MF de la myosine X ainsi que les domaines DdMF1 et DdMF2 interagissent avec les microtubules. La surface d'interaction avec les microtubules sur la myosine X a été caractérisée par mutagenèse. Les résidus participant à l'interaction sur la myosine X sont présents sur DdMF1 et absents sur DdMF2. De façon très étonnante, DdMF1 interagit plus faiblement avec les microtubules ($K_d \sim 1.7 \mu\text{M}$) que DdMF2 ($K_d \sim 0.47 \mu\text{M}$).

4. Une nouvelle surface des domaines DdMF1 et DdMF2 permet l'interaction entre les domaines MyTH4 et les microtubules. Les structures de DdMF1 et DdMF2 montrent que des insertions apparues au cours de l'évolution ont modifié les surfaces participant à l'interaction avec les microtubules. Les résidus participant à l'interaction sur la myosine X sont présents sur DdMF1, mais ils sont masqués par un insert spécifique à cette myosine. Tant sur DdMF1 que DdMF2, une autre surface est apparue permettant l'interaction avec les microtubules. Les résidus sur cette surface sont conservés chez les amibes. Les propriétés du domaine MyTH4 et sa capacité à interagir avec les microtubules représentent un exemple typique d'évolution convergente.

Les résultats ont été publiés en Mars 2016 (voir **ANNEXE I**)

Planelles-Herrero VI, Blanc F, Sirigu S, Sirkia H, Clause J, Sourigues Y, Johnsrud DO, Amigues B, Cecchini M, Gilbert SP, Houdusse A* and Titus MA* (2016) Myosin MyTH4-FERM structures highlight important principles of convergent evolution. *PNAS USA* 113(21):E2906-2915.

[*co-senior authors]

2.Projet b. Caractérisation des interactions entre la myosine VII et ses partenaires assurant la liaison entre les cadhérines et les filaments d'actine dans les microvillosités et les stéréocils

2.IIb. Objectifs

Comme décrit précédemment, la myosine VII est au cœur des interactions permettant la liaison entre les queues cytoplasmiques des cadhérines et les filaments d'actine. Des complexes ternaires (**figure 52**) assurent cette liaison dans les stéréocils (myosine VIIa/SANS/Harmonine) et dans les microvillosités (myosine VIIb/ANKS4B/Harmonine). Les myosines VIIa et VIIb sont également nécessaires pour le transport de ces protéines à l'extrémité supérieure des stéréocils et des microvillosités (El-Amraoui and Petit, 2005; Weck et al., 2017). Grâce au premier domaine MF (MF1), les myosines VIIa et VIIb interagissent avec SANS et ANKS4B, respectivement (Li et al., 2016; Wu et al., 2011). Les structures des domaines MF1 de la myosine VIIa et VIIb avec des peptides de SANS et ANKS4B sont disponibles (Li et al., 2016; Wu et al., 2011). Ces deux adaptateurs interagissent de façon similaire avec le domaine MF1, mais la force de l'interaction est différente : l'interaction entre SANS et la myosine VIIa est ~20 fois plus forte. SANS et ANKS4B interagissent égale aussi de façon conservée avec les domaines PDZ N-terminaux de l'harmonine (Crawley et al., 2016; Li et al., 2016). De plus, le domaine PDZ C-terminal de l'harmonine interagit avec le domaine MF2 de la myosine VIIb, mais il a été décrit comme n'interagissant pas ou très faiblement avec le MF2 de la myosine VIIa (Li et al., 2016). Ensemble, ces données suggèrent que les complexes formés dans les stéréocils et les microvillosités ne sont pas strictement conservés. De plus, la nature et l'importance de ces interactions, ainsi que la base de leur spécificité ne sont pas connues.

En collaboration avec l'équipe de Margaret A Titus (Université de Minnesota, US), l'objectif de cette étude a été de caractériser les complexes ternaires formés dans les deux cas (myosine VIIa/SANS/Harmonine et myosine VIIb/ANKS4B/Harmonine) ainsi que de caractériser et définir les interactions qui peuvent avoir lieu entre ces protéines.

2.IIIb. Résultats et discussion

Dans cette étude, la résolution des structures du MF2 des myosines VIIa et VIIb en complexe avec le PDZ3 d'harmonine, ainsi que le MF2 de la myosine VIIb seul, ainsi que des analyses biochimiques et biophysiques ont permis de décrire la nature des interactions permettant la formation de ces complexes. De plus, les interactions entre les différents acteurs ont été caractérisées de façon systématique.

Les principaux résultats sont résumés ci-dessous :

1. Le PDZ3 d'harmonine interagit avec le MF2 des myosines VIIa et VIIb de façon homologue. Les structures des deux complexes (myosine VIIa+PDZ3 et myosine VIIb+PDZ3) montrent que le mode d'interaction d'harmonine avec les deux myosines VII est le même. Cette interaction est dépendante de l'extension C-terminal du domaine PDZ3 d'harmonine. Elle est également dépendante de l'isoforme d'harmonine. De plus, ces structures permettent de rendre compte de l'effet des mutations sur la myosine VIIa associées à la surdité.

2. Le domaine MF1 des myosines VIIa et VIIb interagissent avec SANS et ANKS4B. La force de l'interaction n'est cependant pas la même. L'affinité de SANS est plus importante pour la myosine VIIa ($K_d \sim 0.1 \mu\text{M}$) que pour la myosine VIIb ($K_d \sim 5.5 \mu\text{M}$). ANKS4B interagit de façon similaire avec les deux myosines ($K_d \sim 4\text{-}5 \mu\text{M}$).

3. Le PDZ3 d'harmonine interagit avec les domaines NPDZ1.PDZ2. L'extension C-terminal du domaine PDZ3, participant à l'interaction avec les myosines VII, interagit également avec les domaines NPDZ1.PDZ2 d'harmonine. Cette auto-association d'harmonine permet une auto-inhibition, mais aussi la formation de réseaux d'harmonine. La compatibilité entre ce réseau et le recrutement de plusieurs myosines VII a été étudiée pour proposer un modèle rendant compte des complexes qui doivent se former pour assurer le transport et la mécano-transduction (lorsque le réseau d'harmonine est associé à la queue de cadhérines au sommet de ces protrusions). De plus, nos résultats indiquent comment l'expression de différentes isoformes d'harmonine dans les stéréocils permet la modulation de la rigidité des liens entre les cadhérines et les filaments d'actine.

Les résultats ont été publiés en Juin 2017 (voir **ANNEXE II**):

Yu I*, **Planelles-Herrero VJ***, Sourigues Y, Moussaoui D, Sirkia H, Kikuti C, Stroebel D, Titus MA[&] and Houdusse A[&] (2017) Myosin 7 and its adaptors link cadherins to actin. *Nature Communications* 8: 15864.

[* co-first authors] [[&]co-senior authors]

CHAPITRE 3 : Modulation de l'activité des myosines par de petites molécules allostériques

3.1 Introduction

3.1.1 Les myosines conventionnelles

Les myosines de classe II (aussi appelées myosines conventionnelles) ont la particularité de former des filaments contenant plusieurs centaines de têtes de myosines (**figure 53**). Chez les vertébrés, des filaments de myosine II sont présents dans les muscles (strié, cardiaque et lisse) ainsi que dans des cellules non musculaires (Sellers, 2000). Elles sont également présentes dans les cellules d'eucaryotes inférieurs tels que les champignons, *Acanthamoeba* et *Dictyostelium*.

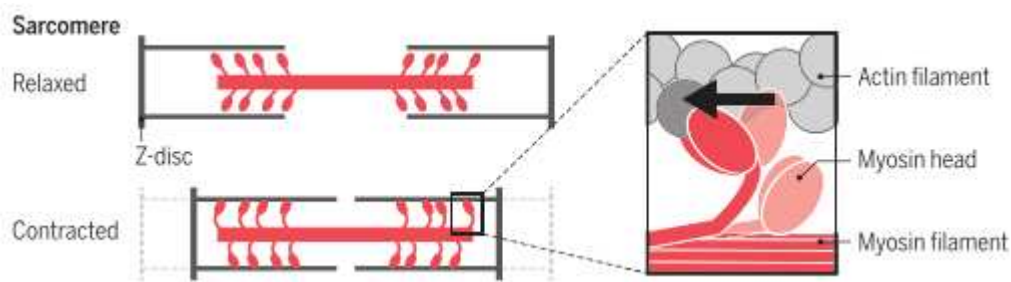


Figure 53 – Filaments formés par la myosine II (Warshaw, 2016).

Les myosines II contiennent une longue région en *coiled-coil* les rendant dimériques mais également responsable de la formation régulée de filaments. Plusieurs centaines de dimères sont ainsi assemblés afin de former de longs filaments responsables, entre autres, de la contraction musculaire (**figure 53**). Pour son étude, les myosines II peuvent être fragmentées par digestion enzymatique. Ainsi, plusieurs fragments peuvent être générés (**figure 54**) : le fragment S1 (contenant le domaine moteur et les chaînes légères, l'essentielle ou ELC, et la régulatrice ou RLC), le fragment S2 (première partie de la région en *coiled-coil*), le fragment HMM (« *Heavy meromyosin* », formé par les fragments S1 et S2) et le fragment LMM (« *Light meromyosin* »). L'activité ATPase ainsi que le site de liaison à l'actine sont présents sur le domaine moteur, et donc sur le fragment S1. Les chaînes légères sont responsables de la régulation de l'activité des myosines (Houdusse et al., 1996).

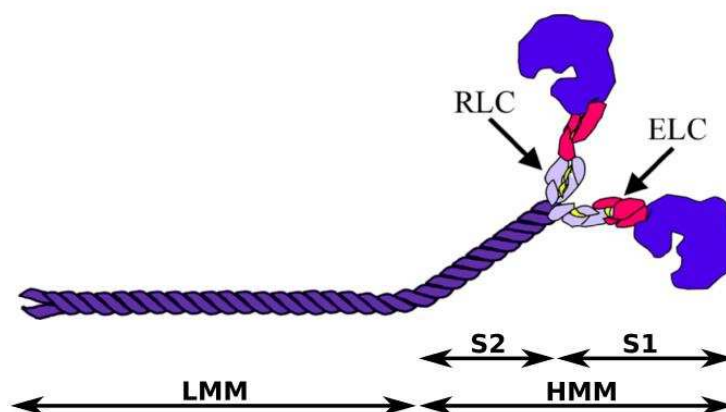


Figure 54 - Fragments utilisés pour l'étude des myosines II (Modifié à partir de (Tajsharghi, 2008)).

Plusieurs isoformes sont présentes dans les muscles. Le génome des cellules de mammifères contient plus de dix isoformes différentes de myosine II (Walklate et al., 2016). L'expression de ces isoformes varie au cours du développement (par exemple, avec des isoformes fœtales et adultes) et en fonction du type cellulaire. La nomenclature utilisée pour désigner ces isoformes peut être source de confusion. En effet, historiquement elles furent nommées selon le type de fibre musculaire associé à l'isoforme. Plus récemment, elles sont nommées par le gène codant la protéine. Ainsi, on parle de myosine α -cardiaque (*MYH6*), β -cardiaque (*MYH7*), de muscle lisse (*MYH11*) ou de muscle squelettique (*MYH4* et *MYH13*), entre autres. Elles sont 40-93% identiques et 61-96% similaires (50-91% et 70-93% si uniquement le domaine moteur est pris en compte). De plus, trois isoformes sont retrouvées dans des cellules non musculaires : la myosine II non musculaire 2a (« *Non Muscle Myosin IIa* » ou NMM2a, *MYH9*), 2b (NMM2b, *MYH10*) et 2c (NMM2c, *MYH14*). Les isoformes non-musculaires sont 62-76% identiques et 80-89% similaires aux isoformes musculaires (71-83% et 86-92% si uniquement le domaine moteur est pris en compte).

3.1.1.1 - Le cycle de production de la force

Comme les autres classes de myosines, les myosines de classe II sont constituées par un domaine moteur, un bras de levier et une queue. La structure du domaine moteur et du bras de levier de la myosine II est connue depuis 1993 (Rayment et al., 1993). Depuis, plusieurs structures à haute résolution du domaine moteur dans différents états ainsi que du bras de levier ont permis de comprendre comment la force est générée dans le muscle (Coureux et al., 2003; Dominguez et al., 1998; Houdusse and Cohen, 1996; Houdusse et al., 1999, 2000)

Comme pour toutes les myosines, le domaine moteur est majoritairement formé d'hélices mais possède également de façon notoire un feuillet β central à sept brins. Il peut être décomposé en quatre sous-domaines (Houdusse et al., 1999) : N-terminal, 50 kDa supérieur (U50), 50 kDa inférieur (L50) et le convertisseur (**figure 55**). Les domaines U50 et L50 forment à leur interface une crevasse proche du site d'interaction avec l'actine. L'affinité de la myosine pour le filament d'actine est régulée par le nucléotide présent dans le domaine moteur (Houdusse and Sweeney, 2016).

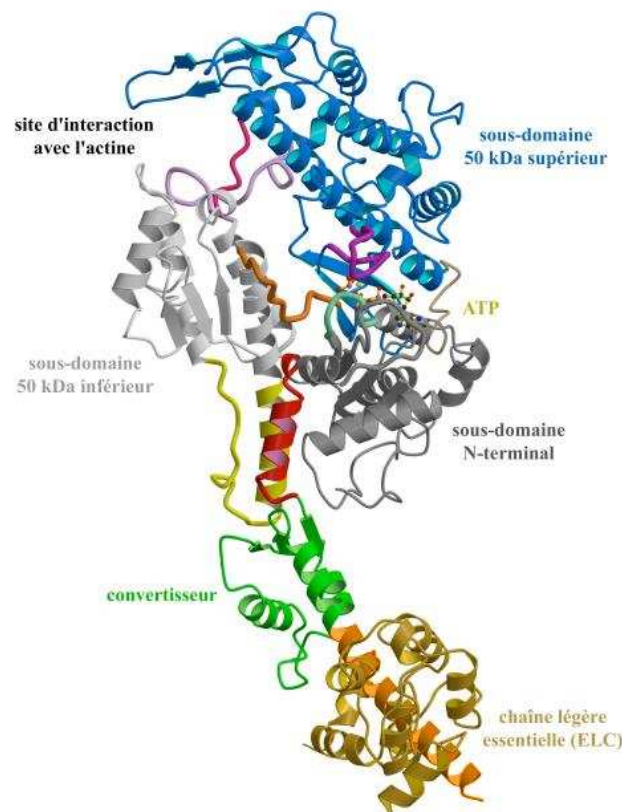


Figure 55 – Structure cristallographique du domaine moteur et du cou d'une myosine II

L'étude du cycle de production de force de la myosine par le biais de la cristallographie aux rayons X et de la microscopie électronique a permis d'isoler plusieurs états structuraux liés au nucléotide, qui ont permis de reconstruire le cycle ATPase (Houdusse and Sweeney, 2016, **figure 56**). Quand la myosine est attachée à l'actine, des changements conformationnels sont couplés au relâchement séquentiel des produits de l'hydrolyse du MgATP (P_i et MgADP). Le basculement du bras de levier est associé à la production de force (« *powerstroke* ») pendant que la myosine se trouve sur l'actine. À la fin de mouvement, la myosine dépourvue de nucléotide est fortement attachée à l'actine (état

rigueur ou *rigor*). La fixation de MgATP dans la poche du nucléotide libère la myosine de l'actine (état post-rigueur, *post-rigor* ou encore PR). Une fois détaché, le domaine moteur subit une série de changements conformationnels qui réamorcent la myosine (« *recovery stroke* »), puis l'hydrolyse du MgATP a lieu dans un état pour lequel le bras de levier est en position amorcée (état pré-powerstroke ou PPS). Stabilisé par les produits d'hydrolyse piégés dans le site actif, cet état est capable de se fixer à nouveau sur l'actine pour effectuer un '*powerstroke*'. L'adoption séquentielle de ces états permet donc de convertir l'énergie chimique de l'hydrolyse de l'ATP (qui a lieu alors que la myosine est dissociée de l'actine) en force motrice unidirectionnelle lorsque la myosine interagit forcément avec l'actine.

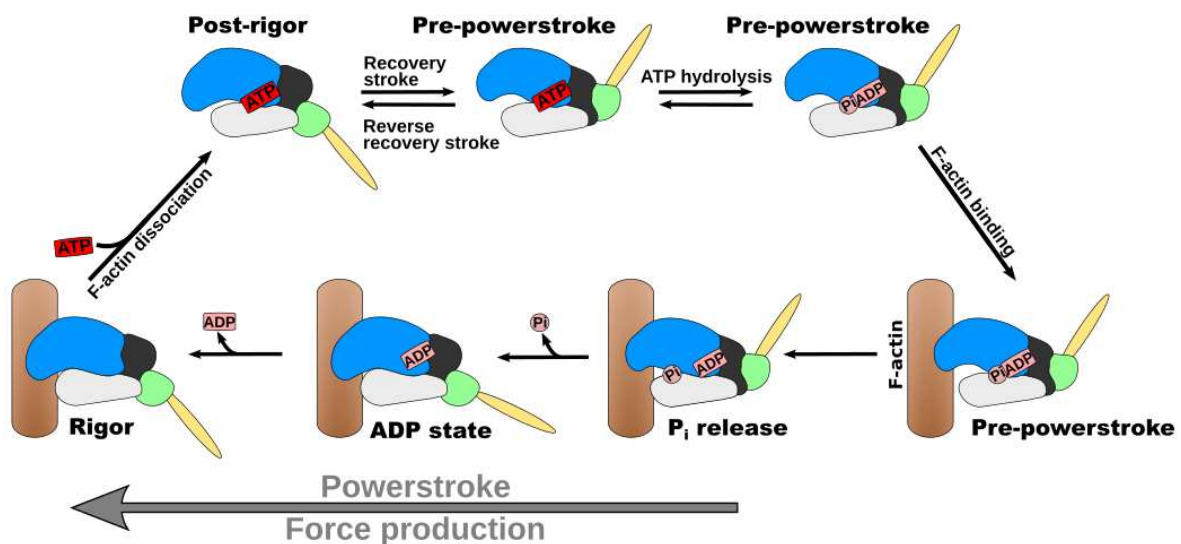


Figure 56 – Cycle de production de force d'une myosine (Planelles-Herrero et al., 2017)

3.1.2 La modulation de l'activité des myosines

Les myosines conventionnelles sont au cœur de la production de force dans les tissus musculaires. De ce fait, leur dysfonctionnement entraîne diverses maladies. Au cours des dix dernières années, les efforts se sont multipliés pour développer des modulateurs de l'activité des myosines, notamment des inhibiteurs. Le développement de petites molécules ciblant les myosines est très important du point de vue clinique, mais elles sont aussi un outil essentiel pour l'étude des fonctions des myosines dans les cellules et les muscles. En effet, les inhibiteurs de l'activité des myosines sont des outils plus souples que la suppression de l'expression par siRNA, par exemple. En effet, l'utilisateur a un contrôle sur

le temps et la dose utilisée. En plus, dans la plupart des cas, l'effet de l'inhibiteur est réversible.

Les enzymes, comme les myosines, peuvent être inhibées suivant deux stratégies différentes : avec des inhibiteurs compétitifs et non compétitifs. Des inhibiteurs compétitifs de l'activité ATPase de la myosine utilisent la poche du nucléotide dans le domaine moteur, empêchant la liaison de l'ATP et son hydrolyse. Or, ces inhibiteurs sont potentiellement peu spécifiques, car le site de liaison du nucléotide est très conservé pour les myosines mais également pour d'autres moteurs moléculaires (comme les kinésines) et aussi les kinases. Ainsi, des inhibiteurs compétitifs ne sont pas très utiles puisqu'ils peuvent inhiber des ATPases autres que les myosines et d'autres protéines fixant de l'ATP.

C'est pour cela que la plupart des modulateurs de l'activité des myosines développés sont des molécules allostériques, utilisant différents sites sur le domaine moteur des myosines pour modifier son activité.

3.1.2.1 - Blebbistatine

La blebbistatine est le plus connu et le plus utilisé des inhibiteurs spécifiques de myosines II (Straight et al., 2003). Il s'agit d'une petite molécule, dérivée du 1-phenyl-2-pyrrolidinone, se fixant sur une poche hydrophobe à l'interface entre les sous-domaines U50 et L50 (Allingham et al., 2005). Pendant le cycle ATPase de la myosine, cette poche se ferme pour former l'état pre-powerstroke nécessaire pour permettre l'hydrolyse de l'ATP. La blebbistatine occupe cette poche et stabilise l'état PPS (**figure 56**). Elle n'empêche pas l'hydrolyse de l'ATP en MgADP+Pi, mais stabilise et bloque le moteur de la myosine dans un état au début du cycle de production de force (Allingham et al., 2005; Kovács et al., 2004; Ramamurthy et al., 2004)

La blebbistatine est très spécifique pour les myosines II. En effet, des concentrations élevées de blebbistatine n'ont pas d'effet sur les myosines I, V et X, par exemple (Limouze et al., 2004). Or, elle n'est pas spécifique parmi les myosines II, et elle inhibe des myosines musculaires (squelettique et cardiaque) ainsi que non-musculaires (NMM2a, NMM2B), avec un IC₅₀ entre 0.5 µM et 5 µM (Limouze et al., 2004; Zhang et al., 2017).

3.1.2.2 - Pentachloropseudilin et pentabromopseudilin

Pentachloropseudilin (PCIP) et pentabromopseudilin (PBP) sont deux petites molécules partageant une structure moléculaire similaire. Elles inhibent la myosine I et la myosine Va, respectivement (Chinthalapudi et al., 2011; Martin et al., 2009; Preller et al., 2011), avec un IC₅₀ entre 1 µM et 5 µM.

Les structures de PCIP et PBP en complexe avec la myosine II montre que la molécule reconnaît une poche de surface sur le sous-domaine U50, proche du site de liaison avec l'actine (Chinthalapudi et al., 2011; Fedorov et al., 2009). La liaison sur cette poche réduit l'activité ATPase des myosines et décroît l'hydrolyse de l'ATP.

3.1.2.3 - Omecamtiv mecarbil

Omecamtiv mecarbil (OM) représente une nouvelle génération de modulateurs de l'activité ATPase des myosines. En effet, et contrairement aux autres inhibiteurs décrits ici, OM est un activateur de la force produite par le muscle cardiaque. Il est actuellement en phase clinique 3 sur ~8000 patients, dans le but de déterminer si le traitement avec OM, en plus des traitements déjà utilisés, réduit le risque de mort cardiovasculaire ou crise cardiaque sur des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique (Malik et al., 2011; Teerlink et al., 2016).

La pathologie la plus fréquente liée aux myosines II est la cardiomyopathie hypertrophique (HCM), liée à la myosine II cardiaque (*MYH7*). La HCM est une des plus fréquentes des maladies génétiques cardiaques. En effet, elle peut affecter 1 individu sur 500 (Maron, 2002). Généralement, la maladie est diagnostiquée chez l'adulte, mais certaines mutations ont été récemment identifiées chez l'enfant. Ces mutations peuvent avoir des effets très divers : elles peuvent être asymptomatiques, mais elles peuvent également entraîner des crises cardiaques soudaines et la mort (Maron and Maron, 2013). Plus de 300 mutations différentes sur la chaîne lourde de la myosine β-cardiaque causent des HCM (Kaski et al., 2009; Morita et al., 2008), mais les effets de ces mutations sur le cycle moteur de la myosine ne sont pas connus. Le manque d'information concernant les conséquences de ces mutations sur la molécule, ainsi que la diversité phénotypique de l'HCM, est un obstacle majeur pour décider du traitement à administrer. Une des hypothèses actuelles pour expliquer le développement de l'HCM propose que les différentes proportions de myosine normale et mutée au sein d'un même muscle provoquent une hétérogénéité fonctionnelle et, après plusieurs années, conduit à la déformation des fibres et à

l'hypertrophie (Brenner et al., 2014; Nag et al., 2015). Les modulateurs de l'activité de la myosine cardiaque sont un des traitements les plus prometteurs de l'HCM.

Les effets sur les propriétés cinétiques et mécaniques d'OM sur le domaine moteur de la myosine II cardiaque ont été très étudiés (Cleland et al., 2011; Liu et al., 2015; Malik et al., 2011; Shen et al., 2010; Swenson et al., 2017; Teerlink et al., 2011; Winkelmann et al., 2015). En bref, OM déplace l'équilibre d'hydrolyse du MgATP vers les produits, MgADP+Pi, augmentant la quantité de têtes de myosine dans l'état PPS (**figure 56**). Quand le moteur est sur l'actine, OM augmente la vitesse et la quantité de Pi relâché mais n'a aucun effet sur la dissociation du MgADP. Or, le mode d'action qu'OM utilise pour produire ces effets n'est pas connu.

3.1.2.4 - 2,4,6-triiodophénol

Le 2,4,6-triiodophénol (TIP) est le premier inhibiteur de l'activité de la myosine VI (Heissler et al., 2012). Des études bio-informatiques et des criblages *in silico* avec la structure du domaine moteur de la myosine VI dans l'état PPS ont permis d'identifier une série de petites molécules halogénées potentiellement capables d'interagir avec le moteur. Parmi elles, des études biochimiques ont confirmé que TIP lie la myosine VI et est capable d'inhiber son activité ATPase. Avec un IC₅₀ de ~ 2 µM, TIP a le même effet dans les cellules que l'utilisation d'un siRNA ciblant la myosine VI. Il inhibe l'activité ATPase de la myosine VI, mais le site de reconnaissance sur le domaine moteur ainsi que son mode d'action restent inconnus. TIP est de plus une petite molécule qui pourrait assez facilement avoir des effets sur d'autres cibles. Mieux comprendre comment il agit sur la myosine VI devrait permettre de concevoir de nouveaux inhibiteurs plus spécifiques.

3.Projet a. Inhibition de la myosine II de muscle lisse par CK-571

3.IIa. Objectifs

L'équipe « Motilité Structurale » travaille en collaboration avec une société pharmaceutique basée en Californie (US), Cytokinetics Inc, engagée dans la découverte et le développement de petites molécules thérapeutiques ciblant les protéines musculaires, notamment les myosines.

La myosine II de muscle lisse (SMM) est impliquée dans plusieurs maladies hypercontractiles, telles que l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (COPD). Intéressés par le développement d'inhibiteurs de cette myosine, Cytokinetics a développé CK-2018571 (CK-571). Cet inhibiteur empêche la liaison du domaine moteur de SMM à l'actine et promeut la relaxation du muscle lisse *in vitro* et *in vivo*. Contrairement à la blebbistatine, CK-571 empêche l'hydrolyse du MgATP, bloquant les changements conformationnels nécessaires pour que le domaine moteur puisse à nouveau interagir avec l'actine (**figure 56**). En plus, il s'agit d'un inhibiteur sélectif, avec un IC_{50} >1000 fois plus élevé pour la myosine squelettique que pour SMM, même si la séquence des deux protéines est proche (50% d'identité et 71% de similarité dans le domaine moteur).

L'objectif pour ce projet a été de cristalliser le domaine moteur de la myosine II de muscle lisse avec l'inhibiteur CK-571. Alors que Serena Sirigu, post-doc dans le laboratoire avait cristallisé le complexe en présence de MgADP, j'ai rejoint ce projet alors qu'elle quittait le laboratoire pour prendre un nouveau poste. J'ai cristallisé ce complexe avec un analogue du MgATP non hydrolysé, le MgADP.BeFx, et réalisé la caractérisation du complexe en solution par SAXS pour étayer les arguments requis pour établir que CK-571 stabilise un intermédiaire du « *recovery stroke* » lié à l'ATP.

3.IIIa. Résultats et discussion

La structure cristallographique du complexe formé entre le domaine moteur de SMM et CK-571 montre que l'inhibiteur utilise une nouvelle poche interne au moteur. Il s'insère entre deux éléments du moteur et empêche les changements nécessaires pour réamorcer la myosine. De façon étonnante, tous les résidus interagissant avec CK-571 sont conservés dans les autres myosines II.

De plus, la structure montre le domaine moteur dans un nouvel état structural jusqu'ici non observé. En effet, l'inhibiteur bloque la myosine dans un état intermédiaire entre le post-rigueur (PR) et PPS (**figure 56**).

Les principaux résultats sont résumés ci-dessous :

5. CK-571 inhibe la myosine II de muscle lisse de façon hautement spécifique. L'addition de CK-571 bloque l'activité ATPase de SMM avec un IC_{50} de ~ 9 nM. Très étonnamment, l' IC_{50} pour les autres myosines II est plus élevé, et ce malgré le haut degré d'homologie entre les domaines moteur de ces protéines : NMM2b, $IC_{50} \sim 76$ nM, 84% d'identité/92% similarité dans le domaine moteur ; myosine cardiaque, $IC_{50} \sim 2\,600$ nM, 52% d'identité/70% similarité ; myosine squelettique, $IC_{50} \sim 11\,300$ nM, 50% d'identité/71% similarité.

6. CK-571 promeut la relaxation du muscle lisse *in vivo* et *in vitro*. Ajouté à des préparations de muscle lisse, CK-571 inhibe leur contraction. Il promeut également la relaxation du muscle pré-contraint. Finalement, il inhibe la bronchoconstriction chez des chiens *in vivo*.

7. CK-571 utilise une poche dans le domaine moteur, qui ne s'ouvre que pendant le « *recovery stroke* ». L'inhibiteur s'insère entre deux éléments clés du moteur responsables des changements nécessaires pour réamorcer la myosine, le *relay* et l'hélice SH1. Ce faisant, il empêche cette transition et bloque la myosine dans un état avec une affinité faible pour l'actine, incapable de s'engager dans le cycle de production de force. CK-571 bloque le domaine moteur de la myosine dans un nouvel état structural intermédiaire entre le post-rigueur (PR) et PPS. C'est uniquement dans cet état intermédiaire que la poche utilisée par CK-571 est formée et peut accueillir l'inhibiteur. L'insertion de CK-571 dans cette poche bloque l'avancée du cycle, empêchant le peuplement de l'état PPS et donc l'hydrolyse du MgATP.

8. Origine de la spécificité de CK-571. Tous les résidus interagissant avec l'inhibiteur sont conservés dans les autres myosines. La spécificité de l'inhibiteur n'est donc pas liée à la séquence de la poche. Cette spécificité est donc liée à la probabilité pour une myosine de peupler des intermédiaires de transition suffisamment distincts.

9. Cette structure nous éclaire sur la nature de la transition du « *recovery stroke* ». Cette structure contredit plusieurs modèles de la transition requise pour réamorcer le bras de levier des myosines. En figeant un intermédiaire de la transition grâce à CK-571, nous avons pu exclure que l'origine de la transition se trouverait par le mouvement de Switch II initiant la fermeture du site actif requis pour l'hydrolyse de l'ATP. Ce mouvement avait été décrit comme imposant une contrainte au sein de la structure qui imposerait de façon mécanique le basculement du bras de levier. Nous proposons qu'après la liaison de l'ATP, le bras de levier explore en fait plusieurs conformations et que ceux-ci sont requis pour que la fermeture du site actif (et donc le clivage de l'ATP par une molécule d'eau) soit possible.

Les résultats ont été publiés en Octobre 2016 (voir **ANNEXE III**):

Sirigu S*, Hartman J*, **Planelles-Herrero VI***, Ropars V, Clancy S, Chuang G, Qian X, Lu P, Barrett E, Rudolph K, Royer C, Morgan B, Stura EA, Malik FI and Houdusse A (2016) Highly selective inhibition of myosin motors provides the basis of potential therapeutic application. *PNAS USA* 113(47): E7448-E7455.

[*co-first authors]

3.Projet b. Activation de la myosine cardiaque par Omecamtiv mecarbil

3.IIb. Objectifs

Comme décrit précédemment (section 1.2.3 de ce chapitre), Omecamtiv mecarbil (OM) est un activateur de la production de force par la myosine cardiaque. Les effets sur les propriétés cinétiques et mécaniques d'OM sur le domaine moteur de la myosine II cardiaque ont été très étudiés, mais son mécanisme d'action reste inconnu.

Récemment, une structure du domaine moteur de la myosine cardiaque en complexe avec OM a été publiée (Winkelmann et al., 2015). Dans cette structure, le domaine moteur se trouve dans l'état post-rigueur (PR), le premier état peuplé par la myosine lorsqu'elle se détache du filament d'actine après avoir lié l'ATP (**figure 56**). Cet activateur n'a pas en fait d'effet détectable sur cette partie du cycle. L'effet principal d'OM est d'augmenter le nombre de têtes dans l'état PPS, au début du cycle de production de force. Cette structure ne peut donc pas expliquer le mécanisme d'action d'OM pour augmenter la force produite dans le muscle cardiaque. De plus, la poche utilisée par OM dans cette structure est proche de celle utilisée par l'inhibiteur CK-571 sur la myosine de muscle lisse. La question se pose de savoir comment deux molécules, utilisant des sites de reconnaissance proches, peuvent avoir des effets opposés sur l'activité des myosines.

En collaboration avec Cytokinetics Inc, l'objectif de ce projet a été de résoudre la structure cristallographique du domaine moteur de la myosine cardiaque dans un état approprié pour comprendre son mécanisme d'action.

3.IIIb. Résultats et discussion

Dans cette étude, j'ai résolu la structure cristallographique du domaine moteur de la myosine cardiaque dans l'état PPS avec et sans OM. Cette poche explique très clairement la spécificité de la drogue pour cette myosine II ainsi que le mécanisme d'action d'OM.

Les principaux résultats et conclusions de l'étude sont :

1. Obtention de la structure du domaine moteur de la myosine cardiaque dans l'état PPS. Il s'agit de l'état adopté par le domaine moteur avant d'interagir avec l'actine. Cet état n'avait jamais été décrit pour cette myosine. Il a servi entre autre à la

construction d'un modèle de l'état inhibé de la myosine cardiaque, qu'il est important de bien décrire pour comprendre en quoi les mutations HCM entraînent l'hypertrophie du cœur (Robert-Paganin *et al*, manuscrit en préparation).

2. OM s'introduit dans une poche à l'interface entre le domaine N-terminal et le convertisseur. La structure de la myosine cardiaque (fragment S1, **figure 54**) dans l'état PPS en complexe avec OM montre que, dans cet état, l'activateur se trouve dans une poche différente de celle caractérisée dans l'étude précédente (Winkelmann et al., 2015). En effet, OM s'introduit dans une poche à l'interface entre le domaine N-terminal et le convertisseur (**figure 55**). Ce faisant, il favorise l'adoption de l'état PPS. La comparaison avec la structure sans OM montre que l'interaction avec l'activateur n'a pas d'effets majeurs sur la structure du domaine moteur.

3. OM favorise l'adoption de l'état PPS en solution. En effet, des études de SAXS ont permis de valider ce modèle, en démontrant qu'OM favorise l'adoption de l'état PPS en solution. En favorisant l'adoption de cet état, OM augmente la quantité de têtes de myosine prêtes à interagir avec l'actine. Dans le tissu musculaire, avec un ensemble de myosines, ceci augmente la quantité de force produite par cycle de contraction cardiaque.

Les résultats ont été publiés en Août 2017 (voir **ANNEXE IV**) :

Planelles-Herrero VI, Hartman J, Robert-Paganin J, Malik FI and Houdusse A. Mechanistic and Structural Basis for Allosteric Tuning of Cardiac Myosin Force Production by Omecamtiv Mecarbil. (2017) *Nature Communications*, **8**:190.

3.IV Discussion et Perspectives

La collaboration entre l'équipe « Motilité Structurale » et Cytokinetics, présenté dans ce chapitre, montre comment des modulateurs spécifiques de l'activité des myosines peuvent être utilisés pour le traitement de maladies humaines. Dans les deux cas, il s'agit de petites molécules ciblant des myosines musculaires. Le dysfonctionnement de ces myosines est à la base de nombreuses maladies, telles que l'insuffisance cardiaque, les cardiomyopathies et l'asthme, ainsi que diverses maladies neuromusculaires. Depuis plus d'un siècle, les scientifiques ont activement cherché à développer des traitements pour moduler l'activité du muscle dans ces maladies.

Les deux modulateurs étudiés ici, CK-571 et OM ont des modes d'action opposés. CK-571 est un inhibiteur très puissant de l'activité de la myosine de muscle lisse. Pour ce faire, il s'introduit dans une poche interne du domaine moteur et bloque les transitions nécessaires pour le réamorçage de cette myosine. Contrairement à un inhibiteur, un activateur comme OM doit interagir avec le moteur sans empêcher son activité. OM s'introduit dans une poche à l'interface entre différents éléments du domaine moteur. Ceci modifie l'équilibre chimique de plusieurs étapes du cycle ATPase, modulant ainsi la force produite dans l'ensemble du muscle, sans changer le mécanisme d'action du moteur. Il est possible également qu'OM ait un effet sur l'état auto-inhibé de la myosine cardiaque. OM pourrait en effet libérer l'état auto-inhibé, activant la myosine. L'équipe « Motilité Structurale » travaille déjà dans cette direction.

Dans les deux cas, il s'agit de petites molécules sélectives et spécifiques. Cependant, la façon dont cette spécificité est acquise diffère pour les deux modulateurs. Dans le cas d'OM, la spécificité est déterminée par les résidus interagissant directement avec la drogue. Cependant, et comme décrit précédemment, CK-571 interagit de façon préférentielle avec la myosine de muscle lisse alors que les résidus participant à l'interaction avec CK-571 sont strictement conservés dans les différentes isoformes de myosine II. De plus, les résidus présents dans le chemin que la drogue doit parcourir pour atteindre la poche où elle s'introduit sont également conservés. Comme décrit précédemment, CK-571 s'introduit dans une poche uniquement formée dans un état intermédiaire entre le PR et le PPS. Autre que la séquence, la différence entre les isoformes de myosine II est leur cinétique. Ainsi, le temps que chaque myosine passe dans chaque étape du cycle diffère selon l'isoforme. Cette caractéristique est exploitée par CK-571. Dans SMM, le temps de vie de cet intermédiaire est probablement plus grand, permettant à l'inhibiteur de s'introduire dans la poche interne.

Dans les autres isoformes, cette transition serait trop rapide et pourrait peupler des états intermédiaires suffisamment différents pour qu'au final la drogue ne puisse pas atteindre son site d'interaction.

Finalement, le mode d'action de CK-571 permet d'envisager de créer des modulateurs très spécifiques ciblant des poches internes et transitoires pour d'autres myosines, telles que la myosine VI. Comme décrit précédemment, TIP est le seul inhibiteur connu de cette myosine. Cependant, il pourrait avoir des effets *off-target* puisqu'il s'agit d'une molécule très petite et potentiellement non sélective. L'inhibition de l'activité de cette myosine est de grand intérêt dans la lutte contre la prolifération et la migration tumorale (voir aussi la section II.3.3.2 du chapitre 1). Le laboratoire « Motilité Structurale » travaille déjà avec Cytokinetics afin de développer et de caractériser des inhibiteurs de la myosine VI plus puissants et sélectifs.

Matériel et méthodes

1. Clonage, expression et purification des protéines

Les construits de myosine VI utilisés, clonés dans des vecteurs basés sur pET14, correspondent à différents fragments du cDNA humain de la myosine VI. Les vecteurs sont produits par PCR en utilisant diverses stratégies. Les protéines sont produites avec une étiquette polyhistidine en N-ter, suivie d'un site de coupure à la protéase TEV. Les partenaires de la myosine VI sont clonés dans le vecteur pNew, compatible pour la co-transformation et la co-expression avec pET14.

Des cellules BL21-Gold (DE3), AI ou Rosetta sont utilisées pour la production des protéines recombinantes. La culture (2L, 4L ou 6L de milieu 2xYT avec ampicilline 100 µg/ml et/ou kanamycine 50 µg/ml selon les protéines produites) est ensemencée à $A_{600} \approx 0.1$ avec une pré-culture saturée, et incubée à 37°C. L'induction est accomplie par ajout d'IPTG 0.2 mM (concentration finale) quand la culture atteint une densité optique $A_{600} \approx 1$. La production se fait pendant toute la nuit à 20°C. Les protéines utilisées pour la RMN sont produites dans un milieu minimum supplémenté avec $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et/ou glucose $^{13}\text{C}_6$.

Les cellules sont collectées à 4 000g durant 20 minutes à 4°C, resuspendues dans 100 mL de tampon de lyse froid (adapté selon la protéine à purifier) et lysées à l'aide d'un sonicateur. Après centrifugation à 20 000g pendant 30 minutes à 4°C et récupération du surnageant, les protéines contenant une étiquette d'histidine sont purifiées grâce à des colonnes de Nickel. Les fractions d'élution sont évaluées par SDS-PAGE, injectées dans un système de chromatographie liquide (ÄKTA purifier ou ÄKTA FPLC) et analysées avec des colonnes de gel filtration. Si nécessaire, des colonnes échangeuses d'ions sont également utilisées. Après vérification par SDS-PAGE, les fractions contenant la protéine d'intérêt sont récupérées et concentrées avec des concentrateurs Vivaspin (Sartorius Stedin biotech) pour obtenir une concentration suffisante pour la cristallisation. Les protéines sont ensuite aliquotées et conservées à -80°C. Les protéines produites dans des cellules d'insecte contiennent une étiquette FLAG en N-ter. Après lyse et ultracentrifugation, le surnageant est ajouté à la résine d'affinité (anti-FLAG) puis incubé toute la nuit. L'élution se fait par ajout de peptides FLAG. L'éluat est ensuite dialysé, concentré et aliquoté.

2. Cristallisation des protéines et résolution de la structure

Les essais de cristallisation sont réalisés selon la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue. Différents *screens* sont effectués avec le robot Mosquito (TPP Labtech). À partir des données obtenues avec ces *screens*, des gouttes suspendues d'1.6 µl (0.8 µl de protéine et 0.8 µl de précipitant) sont mises en place avec des boîtes de 24 puits. Les boîtes sont stockées à 4°C, 17°C et/ou 25°C et examinées régulièrement. S'il y a formation de cristaux, ils sont récupérés soit pour les analyser soit pour créer des *seeds stocks* qui sont ensuite utilisés pour l'ensemencement d'autres gouttes.

Les cristaux sont analysés au Synchrotron SOLEIL (sur les lignes Proxima-1 et Proxima 2A) ou à l'ESRF (lignes ID23a et ID30a-1). Ils sont préalablement traités avec un cryoprotecteur et congelés à l'azote liquide.

Les données sont indexées et mises à l'échelle avec XDS et XSCALE puis converties au format CCP4 avec XDSCONV (Kabsch, 2010). Les phases sont obtenues par remplacement moléculaire avec le logiciel Molrep (Vagin and Teplyakov, 1997). Pour les projets myosine VII (chapitre 2), les phases sont obtenues de façon expérimentale avec des dérivés contenant la sélénométhionine (SeMet) grâce au logiciel autoSHARP (Vonrhein et al., 2007). Enfin, l'affinement est réalisé avec le logiciel BUSTER (Bricogne et al., 2011). Les modifications et reconstructions sont faites avec le logiciel COOT (Emsley and Cowtan, 2004).

3. MST

L'interaction entre les construits de myosine (VI et VII) et leurs partenaires a été évaluée par MST (Jerabek-Willemsen et al., 2011). Cette technique utilise une protéine marquée par un fluorophore, à concentration constante (une concentration entre 50 nM et 200 nM est normalement requise) et une série de dilutions du potentiel partenaire. L'application d'une augmentation localisée de température à l'aide d'un laser permet d'évaluer la diminution de l'intensité de fluorescence dans ce spot. Ce mouvement des particules en solution est directement lié à leurs propriétés thermophorétiques. Cet effet de thermophorèse varie en fonction de la taille de la molécule en solution. Ainsi, il est possible d'estimer la fraction de protéine liée à la molécule marquée, à partir de la série de dilutions de la protéine non-marquée. Ceci permet de mesurer une constante d'affinité (K_d) entre les deux molécules en solution.

Les deux protéines sont dialysées contre un tampon de MST (20 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP et 0.05% Tween-20). Ensuite, 16 dilutions sériées au 50% de la protéine non-fluorescente sont réalisées avec du tampon de MST. La protéine fluorescente est diluée dans du tampon de MST et ajoutée aux dilutions précédentes. La thermophorèse est analysée avec les paramètres suivants : 80% LED bleu, 35s laser ON, 5s laser OFF, puissance du laser à 10%, 15%, 30% et 50%.

4. Analyse par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont été menées sur plusieurs protéines (chapitres 1, 2 et 3), technique permettant de déterminer la dimension et la forme des particules en solution ayant quelques nanomètres de diamètre. Sauf précision contraire, les protéines sont injectées directement dans le système d'analyse (mode BATCH). Trois concentrations de protéine différentes sont normalement injectées, gamme allant de 0.5 mg/mL à 5 mg/mL, ainsi que son tampon, dans un capillaire qui est irradié par les rayons X sur la ligne SWING (synchrotron SOLEIL). Dans certains cas, une colonne de gel filtration est utilisée en amont (SEC-SAXS). Les volumes d'injection sont autour de 40µL, et lors du passage de l'échantillon dans le capillaire le faisceau irradie la cellule pendant 0.5 s (avec un temps mort de 0.5s). Une vingtaine de données d'irradiation sont ainsi enregistrées puis moyennées pour avoir un meilleur rapport signal sur bruit. Les courbes de diffusion du tampon ont été soustraites à celles des construits pour obtenir uniquement l'information liée à la protéine (programme Foxtrot de la ligne SWING).

L'analyse des courbes de diffusion par les logiciels de D. Svergun (ensemble de programmes ATSAS, Petoukhov et al., 2012) permet d'obtenir le rayon de giration (R_g) de la molécule, le diamètre maximum (D_{max}), le poids moléculaire moyen et une enveloppe moyenne. Le poids moléculaire est calculé avec l'intensité à l'origine (I₀) selon la formule suivante, où « N_A » est le nombre d'Avogadro et « c » est la concentration de protéine utilisée (en mg/ml) :

$$MM = \frac{I_0 N_A}{c \cdot 4^{20}}$$

5. Analyse par diffusion de la lumière à plusieurs angles (MALS)

L'état oligomérique des protéines purifiées a été étudié par MALS, technique permettant le calcul de la masse moléculaire absolue et de la taille moyenne des particules présentes en solution. Sauf précision contraire, l'analyse par MALS est couplée à une colonne de gel filtration en amont (SEC-MALS). Après centrifugation de l'échantillon pendant 20 minutes à 20 000g, ~30 µL sont injectés dans une colonne Superose 6 pré-équilibrée avec un tampon compatible. Dans certains cas, la protéine est directement injectée dans la cellule de MALS (Injection directe). Les données ont été traitées à l'aide du logiciel ASTRA 6, Wyatt Technology.

Références

- Akhmanova, A., and Hammer III, J.A. (2010). Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 479–487.
- Akutsu, M., Dikic, I., and Bremm, A. (2016). Ubiquitin chain diversity at a glance. *J. Cell Sci.* **0**, 1–6.
- Alamo, L., Qi, D., Wriggers, W., Pinto, A., Zhu, J., Bilbao, A., Gillilan, R.E., Hu, S., and Padron, R. (2016). Conserved Intramolecular Interactions Maintain Myosin Interacting-Heads Motifs Explaining Tarantula Muscle Super-Relaxed State Structural Basis. *J. Mol. Biol.* **428**, 1142–1164.
- Allingham, J.S., Smith, R., and Rayment, I. (2005). The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 378–379.
- Altman, D., Sweeney, H.L., and Spudich, J.A. (2004). The Mechanism of Myosin VI Translocation and Its Load-Induced Anchoring. *Cell* **116**, 737–749.
- Arden, S.D., Tumbarello, D.A., Butt, T., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2016). Loss of cargo binding in the human myosin VI deafness mutant (R1166X) increases actin filament binding. *Biochem. J.* **473**, 3307–3319.
- Aschenbrenner, L., Lee, T., and Hasson, T. (2003). Myo6 Facilitates the Translocation of Endocytic Vesicles from Cell Peripheries. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2372–2384.
- Aschenbrenner, L., Naccache, S.N., and Hasson, T. (2004). Uncoated Endocytic Vesicles Require the Unconventional Myosin, Myo6, for Rapid Transport through Actin Barriers. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1–13.
- Avraham, K.B., Hasson, T., Steel, K.P., Kingsley, D.M., Russel, L.B., Mooseker, M.S., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat. Genet.* **11**, 369–375.
- Bahloul, A., Chevreux, G., Wells, A.L., Martin, D., Nolt, J., Yang, Z., Chen, L.-Q., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Rosenfeld, S., et al. (2004). The unique insert in myosin VI is a structural calcium-calmodulin binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4787–4792.
- Bahloul, A., Michel, V., Hardelin, J.P., Nouaille, S., Hoos, S., Houdusse, A., England, P., and Petit, C. (2010). Cadherin-23, myosin viia and harmonin, encoded by usher syndrome type I genes, form a ternary complex and interact with membrane phospholipids. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3557–3565.
- Batters, C., Brack, D., Ellrich, H., Averbek, B., and Veigel, C. (2016). Calcium can mobilize and activate myosin-VI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **pnas.1519435113**.
- Begg, D.A., Rodewald, R., and Rebhun, L.I. (1978). The visualization of actin filament polarity in thin

sections. *J. Cell Biol.* 79, 846–852.

Belyantseva, I.A., Boger, E.T., Naz, S., Frolenkov, G.I., Sellers, J.R., Ahmed, Z.M., Griffith, A.J., and Friedman, T.B. (2005). Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat. Cell Biol.* 7, 148–156.

Berg, J.S., and Cheney, R.E. (2002). Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nat. Cell Biol.* 4, 246–250.

Berg, J.S., Derfler, B.H., Pennisi, C.M., Corey, D.P., and Cheney, R.E. (2000). Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *J. Cell Sci.* 113, 3439–3451.

Biemesderfer, D., Mentone, S.A., Mooseker, M., and Hasson, T. (2002). Expression of myosin VI within the early endocytic pathway in adult and developing proximal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282, F785–F794.

Boëda, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., Perfettini, I., Fath, K.R., Shorte, S., Reiners, J., et al. (2002). Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J.* 21, 6689–6699.

Bohil, A.B., Robertson, B.W., and Cheney, R.E. (2006). Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12411–12416.

Bohrmann, J. (1997). *Drosophila* unconventional myosin VI is involved in intra- and intercellular transport during oogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 652–662.

Bond, L.M., Peden, A. a, Kendrick-Jones, J., Sellers, J.R., and Buss, F. (2011). Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 22, 54–65.

Bonnet, M., and Tran Van Nhieu, G. (2016). How *Shigella* Utilizes Ca²⁺ Jagged Edge Signals during Invasion of Epithelial Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 1–8.

Brenner, B., Seeböhm, B., Tripathi, S., Montag, J., and Kraft, T. (2014). Familial hypertrophic cardiomyopathy: functional variance among individual cardiomyocytes as a trigger of FHC-phenotype development. *Front. Physiol.* 5, 1–15.

Breshears, L.M., and Titus, M.A. (2007). Motor Proteins : Tightening Your Belt with Myosin VI. *Curr. Biol.* 17, 915–917.

Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vornrhein, C., et al. (2011). BUSTER version 2.10.2. Cambridge, United Kingdom Glob. Phasing Ltd.

Buss, F., and Kendrick-Jones, J. (2011). Multifunctional myosin VI has a multitude of cargoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 5927–5928.

Buss, F., Arden, S.D., Lindsay, M., Luzio, J.P., and Kendrick-Jones, J. (2001). Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J.* *20*, 3676–3684.

Caldieri, G., Barbieri, E., Nappo, G., Raimondi, A., Bonora, M., Conte, A., Verhoef, L.G.G.C., Confalonieri, S., Malabarba, M.G., Bianchi, F., et al. (2017). Reticulon 3-dependent ER-PM contact sites control EGFR nonclathrin endocytosis. *Science* *356*, 617–624.

Charizopoulou, N., Lelli, A., Schraders, M., Ray, K., Hildebrand, M.S., Ramesh, A., Srisailapathy, C.R.S., Oostrik, J., Admiraal, R.J.C., Neely, H.R., et al. (2011). Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nat. Commun.* *2*, 201.

Chen, Z.-Y., Hasson, T., Zhang, D.-S., Schwender, B.J., Derfler, B.H., Mooseker, M.S., and Corey, D.P. (2001). Myosin-VIIb, a Novel Unconventional Myosin, Is a Constituent of Microvilli in Transporting Epithelia. *Genomics* *72*, 285–296.

Cheng, K.K.Y., Lam, K.S.L., Wu, D., Wang, Y., Sweeney, G., Hoo, R.L.C., Zhang, J., and Xu, A. (2012). From the Cover: APPL1 potentiates insulin secretion in pancreatic cells by enhancing protein kinase Akt-dependent expression of SNARE proteins in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 8919–8924.

Chibalina, M. V, Seaman, M.N.J., Miller, C.C., Kendrick-jones, J., and Buss, F. (2007). Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *J. Cell Sci.* *120*, 4278–4288.

Chibalina, M. V, Roberts, R.C., Arden, S.D., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2008). Rab8-optineurin-myosin VI: analysis of interactions and functions in the secretory pathway. *Methods Enzymol.* *438*, 11–24.

Chibalina, M. V, Puri, C., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2009). Potential roles of myosin VI in cell motility. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 966–970.

Chibalina, M. V, Poliakov, A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2010). Myosin VI and Optineurin Are Required for Polarized EGFR Delivery and Directed Migration. *Traffic* *11*, 1290–1303.

Chinthalapudi, K., Taft, M.H., Martin, R., Heissler, S.M., Preller, M., Hartmann, F.K., Brandstaetter, H., Kendrick-Jones, J., Tsiavaliaris, G., Gutzeit, H.O., et al. (2011). Mechanism and specificity of pentachloropseudilin-mediated inhibition of myosin motor activity. *J. Biol. Chem.* *286*, 29700–29708.

Chittenden, T.W., Pak, J., Rubio, R., Cheng, H., Holton, K., Prendergast, N., Glinskii, V., Cai, Y., Culhane, A., Bentink, S., et al. (2010). Therapeutic implications of GIPC1 silencing in cancer. *PLoS One* *5*.

Choi, J.S., Paek, a R., Kim, S.Y., and You, H.J. (2010). GIPC mediates the generation of reactive oxygen

species and the regulation of cancer cell proliferation by insulin-like growth factor-1/IGF-1R signaling. *Cancer Lett.* 294, 254–263.

Cleland, J.G.F., Teerlink, J.R., Senior, R., Nifontov, E.M., Murray, J.J.V.M., Lang, C.C., Tsyrlin, V.A., Greenberg, B.H., Mayet, J., Francis, D.P., et al. (2011). The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *Lancet* 378, 676–683.

Coureux, P.-D., Wells, A.L., Ménétrey, J., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2003). A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature* 425, 419–423.

Coureux, P.-D., Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2004). Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J.* 23, 4527–4537.

Coutts, A.S., and La Thangue, N.B. (2016). Regulation of actin nucleation and autophagosome formation. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3249–3263.

Crawley, S.W., Shifrin, D.A., Grega-Larson, N.E., McConnell, R.E., Benesh, A.E., Mao, S., Zheng, Y., Zheng, Q.Y., Nam, K.T., Millis, B.A., et al. (2014). Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* 157, 433–446.

Crawley, S.W., Weck, M.L., Grega-larson, N.E., Jr, D.A.S., and Tyska, M.J. (2016). ANKS4B Is Essential for Intermicrovillar Adhesion Complex Formation. *Dev. Cell* 36, 190–200.

Cross, R., and Scholey, J. (1999). Kinesin: the tail unfolds. *Nat Cell Biol* 1, E119-21.

Dance, A.L., Miller, M., Seragaki, S., Aryal, P., White, B., Aschenbrenner, L., and Hasson, T. (2004). Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* 5, 798–813.

Decuypere, J.P., Kindt, D., Luyten, T., Welkenhuyzen, K., Missiaen, L., De Smedt, H., Bultynck, G., and Parys, J.B. (2013). mTOR-Controlled Autophagy Requires Intracellular Ca²⁺ Signaling. *PLoS One* 8.

Deng, W., Leaper, K., and Bownes, M. (1999). A targeted gene silencing technique shows that *Drosophila* myosin VI is required for egg chamber and imaginal disc morphogenesis. *J. Cell Sci.* 112, 3677–3690.

Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K.M., and Cohen, C. (1998). Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell* 94, 559–571.

Dunn, T.A., Chen, S., Faith, D.A., Hicks, J.L., Platz, E.A., Chen, Y., Ewing, C.M., Sauvageot, J., Isaacs, W.B., De Marzo, A.M., et al. (2006). A novel role of myosin VI in human prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 169, 1843–1854.

- El-Amraoui, A., and Petit, C. (2005). Usher I syndrome: unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J. Cell Sci.* *118*, 4593–4603.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* *60*, 2126–2132.
- Erpapazoglou, Z., Walker, O., and Haguenauer-Tsapis, R. (2014). Versatile Roles of K63-Linked Ubiquitin Chains in Trafficking. *Cells* *3*, 1027–1088.
- Favoni, R.E., and Cupis, A. de (2000). The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach. *Pharmacol. Rev.* *52*, 179–206.
- Fedorov, R., Böhl, M., Tsiavaliaris, G., Hartmann, F.K., Taft, M.H., Baruch, P., Brenner, B., Martin, R., Knölker, H.-J., Gutzeit, H.O., et al. (2009). The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 80–88.
- Fili, N., Hari-Gupta, Y., dos Santos, A., Cook, A., Poland, S., Ameer-Beg, S.M., Parsons, M., and Toseland, C.P. (2017). NDP52 activates nuclear myosin VI to enhance RNA polymerase II transcription. *Nat. Commun.* sous presse.
- Fisher, A.J., Smith, C.A., Thoden, J.B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H.M., and Rayment, I. (1995). X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP·BeF(x) and MgADP·AlF₄⁻. *Biochemistry* *34*, 8960–8972.
- Frank, D.J., Noguchi, T., and Miller, K.G. (2004). Myosin VI: A structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 189–194.
- Franke, D., and Svergun, D.I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* *42*, 342–346.
- Geisbrecht, E.R., and Montell, D.J. (2002). Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration. *Nat. Cell Biol.* *4*, 616–620.
- Gillespie, P.G., and Müller, U. (2009). Mechanotransduction by Hair Cells: Models, Molecules, and Mechanisms. *Cell* *139*, 33–44.
- Goodno, C. (1979). Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 2620–2624.
- Grant, R.P., Marshall, N.J., Yang, J.C., Fasken, M.B., Kelly, S.M., Harreman, M.T., Neuhaus, D., Corbett, A.H., and Stewart, M. (2008). Structure of the N-Terminal Mlp1-Binding Domain of the Saccharomyces cerevisiae mRNA-Binding Protein, Nab2. *J. Mol. Biol.* *376*, 1048–1059.

- Gross, S.P., Tuma, M.C., Deacon, S.W., Serpinskaya, A.S., Reilein, A.R., and Gelfand, V.I. (2002). Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus melanophores*. *J. Cell Biol.* *156*, 855–865.
- Hams, N., Padmanarayana, M., Qiu, W., and Johnson, C.P. (2017). Otoferlin is a multivalent calcium-sensitive scaffold linking SNAREs and calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 201703240.
- Hartman, M.A., Finan, D., Sivaramakrishnan, S., and Spudich, J.A. (2011). Principles of unconventional myosin function and targeting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 133–155.
- Hasson, T. (2003). Myosin VI : two distinct roles in endocytosis. *J. Cell Sci.* *1*, 3453–3461.
- Hasson, T., Heintzelman, H.B., Santos-sacchi, J.T., Corey, D.P., and Mooseker, M.S. (1995). Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Cell Biol.* *92*, 9815–9819.
- He, F., Wollscheid, H.P., Nowicka, U., Biancospino, M., Valentini, E., Ehlinger, A., Acconcia, F., Magistrati, E., Polo, S., and Walters, K.J. (2016). Myosin VI Contains a Compact Structural Motif that Binds to Ubiquitin Chains. *Cell Rep.* *14*, 2683–2694.
- Hegan, P.S., Lanahan, A.A., Simons, M., and Mooseker, M.S. (2015). Myosin VI and cardiomyopathy: Left ventricular hypertrophy, fibrosis, and both cardiac and pulmonary vascular endothelial cell defects in the Snell's waltzer mouse. *Cytoskeleton* *72*, 373–387.
- Heidrych, P., Zimmermann, U., Kuhn, S., Franz, C., Engel, J., Duncker, S. V., Hirt, B., Pusch, C.M., Ruth, P., Pfister, M., et al. (2009). Otoferlin interacts with myosin VI: Implications for maintenance of the basolateral synaptic structure of the inner hair cell. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 2779–2790.
- Heissler, S.M., Selvadurai, J., Bond, L.M., Fedorov, R., Kendrick-Jones, J., Buss, F., and Manstein, D.J. (2012). Kinetic properties and small-molecule inhibition of human myosin-6. *FEBS Lett.* *586*, 3208–3214.
- Hertzano, R., Shalit, E., Rzadzinska, A.K., Dror, A. a, Song, L., Ron, U., Tan, J.T., Shitrit, A.S., Fuchs, H., Hasson, T., et al. (2008). A Myo6 mutation destroys coordination between the myosin heads, revealing new functions of myosin VI in the stereocilia of mammalian inner ear hair cells. *PLoS Genet.* *4*, e1000207.
- Hicks, J.L., Deng, W., Rogat, A.D., Miller, K.G., and Bownes, M. (1999). Class VI Unconventional Myosin is Required for Spermatogenesis in. *Mol. Biol. Cell* *10*, 4341–4353.
- Hirano, Y., Hatano, T., Takahashi, A., Toriyama, M., Inagaki, N., and Hakoshima, T. (2011). Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain. *EMBO J.* *30*, 2734–2747.
- Holm, L., and Sander, C. (1995). Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem Sci* *20*, 478–480.

- Holmes, K.C., and Geeves, M.A. (2000). The structural basis of muscle contraction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 419–431.
- Houdusse, A., and Cohen, C. (1996). Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation. *Structure* 4, 21–32.
- Houdusse, A., and Sweeney, H.L. (2016). How Myosin Generates Force on Actin Filaments. *Trends Biochem. Sci.* 41, 989–997.
- Houdusse, A., Silver, M., and Cohen, C. (1996). A model of Ca²⁺-free calmodulin binding to unconventional myosins reveals how calmodulin acts as a regulatory switch. *Structure* 4, 1475–1490.
- Houdusse, A., Kalabokis, V.N., Himmel, D., Szent-Györgyi, A.G., and Cohen, C. (1999). Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: A novel conformation of the myosin head. *Cell* 97, 459–470.
- Houdusse, a, Szent-Gyorgyi, a G., and Cohen, C. (2000). Three conformational states of scallop myosin S1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11238–11243.
- Inoue, T., Kon, T., Ohkura, R., Yamakawa, H., Ohara, O., Yokota, J., and Sutoh, K. (2008). BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking. *Genes to Cells* 13, 483–495.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* 9, 342–353.
- Jin, Y., Richards, N.G., Waltho, J.P., and Blackburn, M.G. (2017). Metal Fluorides as Analogs for Studies on Phosphoryl Transfer Enzymes. *Angew. Chemie Int. Ed.* 56, 4410–4128.
- Johannes, L. (2017). Endocytosis: Remote Control from Deep Inside. *Curr. Biol.* 27, R663–R666.
- Jung, E.J., Liu, G., Zhou, W., and Chen, X. (2006). Myosin VI is a mediator of the p53-dependent cell survival pathway. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2175–2186.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125–132.
- Karolczak, J., Sobczak, M., Majewski, Ł., Yeghiazaryan, M., Jakubiec-Puka, A., Ehler, E., Sławińska, U., Wilczyński, G.M., and Rędownicz, M.J. (2013). Myosin VI in skeletal muscle: Its localization in the sarcoplasmic reticulum, neuromuscular junction and muscle nuclei. *Histochem. Cell Biol.* 139, 873–885.
- Karolczak, J., Weis, S., Ehler, E., Kierdaszuk, B., Berdyński, M., Zekanowski, C., Kamińska, A.M., and Rędownicz, M.J. (2014). Myosin VI localization and expression in striated muscle pathology. *Anat. Rec.* 297, 1706–1713.
- Kaski, J.P., Syrris, P., Teresa, M., Esteban, T., Jenkins, S., Pantazis, A., Deanfield, J.E., McKenna, W.J., and

- Elliott, P.M. (2009). Prevalence of Sarcomere Protein Gene Mutations in Preadolescent Children With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2, 436–441.
- Kast, D.J., and Dominguez, R. (2017). The Cytoskeleton-Autophagy Connection. *Curr. Biol.* 27, 318–326.
- Kato, M. (2013). Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members. *Exp. Mol. Med.* 45, e26.
- Kazmierczak, P., and Müller, U. (2012). Sensing sound: Molecules that orchestrate mechanotransduction by hair cells. *Trends Neurosci.* 35, 220–229.
- Kedlaya, R.H., Bhat, K.M.R., Mitchell, J., Darnell, S.J., and Setaluri, V. (2006). TRP1 interacting PDZ-domain protein GIPC forms oligomers and is localized to intracellular vesicles in human melanocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 454, 160–169.
- Kellerman, K.A., and Miller, K.G. (1992). An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 119, 823–834.
- Kerber, M.L., and Cheney, R.E. (2011). Myosin-X: a MyTH-FERM myosin at the tips of filopodia. *J. Cell Sci.* 124, 3733–3741.
- Kim, B.-W., Hong, S.B., Kim, J.H., Kwon, D.H., and Song, H.K. (2013). Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat. Commun.* 4, 1613.
- Kim, H., Hsin, J., Liu, Y., Selvin, P.R., and Schulten, K. (2010). Formation of Salt Bridges Mediates Internal Dimerization of Myosin VI Medial Tail Domain. *Structure* 18, 1443–1449.
- Kirikoshi, H., and Kato, M. (2002). Expression of human GIPC1 in normal tissues, cancer cell lines, and primary tumors. *Int J Mol Med* 9, 509–513.
- Knudsen, B. (2006). Migrating with myosin VI. *Am. J. Pathol.* 169, 1523–1526.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229.
- Korioth, F., Gieffers, C., Maul, G.G., and Frey, J. (1995). Molecular characterization of NDP52, a novel protein of the nuclear domain 10, which is redistributed upon virus infection and interferon treatment. *J. Cell Biol.* 130, 1–13.
- Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., and Seller, J.R. (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* 279, 35557–35563.
- Kruppa, A.J., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2016). Myosins, actin and autophagy. *Traffic*.

Kwon, M., Bagonis, M., Danuser, G., and Pellman, D. (2015). Direct Microtubule-Binding by Myosin-10 Orients Centrosomes toward Retraction Fibers and Subcortical Actin Clouds. *Dev. Cell* 1–15.

De La Cruz, E.M., Ostap, E.M., and Sweeney, H.L. (2001). Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J. Biol. Chem.* 276, 32373–32381.

Langford, G.M. (1995). Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 82–88.

Lefèvre, G., Michel, V., Weil, D., Lepelletier, L., Bizard, E., Wolfrum, U., Hardelin, J.-P., and Petit, C. (2008). A core cochlear phenotype in USH1 mouse mutants implicates fibrous links of the hair bundle in its cohesion, orientation and differential growth. *Development* 135, 1427–1437.

Li, J., He, Y., Lu, Q., and Zhang, M. (2016). Mechanistic Basis of Organization of the Harmonin/USH1C-Mediated Brush Border Microvilli Tip-Link Complex. *Dev. Cell* 36, 179–189.

Li, J., Chen, Y., Deng, Y., Unarta, I.C., Lu, Q., Huang, X., and Zhang, M. (2017). Ca²⁺-Induced Rigidity Change of the Myosin VIIa IQ Motif-Single α Helix Lever Arm Extension. *Structure* 25, 579–591.e4.

Li, X.-D., Jung, H.S., Wang, Q., Ikebe, R., Craig, R., and Ikebe, M. (2008). The globular tail domain puts on the brake to stop the ATPase cycle of myosin Va. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1140–1145.

Li, X.D., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2005). Activation of myosin Va function by melanophilin, a specific docking partner of myosin Va. *J. Biol. Chem.* 280, 17815–17822.

Liang, Y., Wang, a, Belyantseva, I. a, Anderson, D.W., Probst, F.J., Barber, T.D., Miller, W., Touchman, J.W., Jin, L., Sullivan, S.L., et al. (1999). Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* 61, 243–258.

Limouze, J., Straight, A.F., Mitchison, T., and Sellers, J.R. (2004). Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1, 337–341.

Lister, I., Schmitz, S., Walker, M., Trinick, J., Buss, F., Veigel, C., and Kendrick-Jones, J. (2004). A monomeric myosin VI with a large working stroke. *EMBO J.* 23, 1729–1738.

Liu, J., Taylor, D.W., Krementsova, E.B., Trybus, K.M., and Taylor, K.A. (2006). Three-dimensional structure of the myosin V inhibited state by cryoelectron tomography. *Nature* 442, 208–211.

Liu, K.C., Jacobs, D.T., Dunn, B.D., Fanning, A.S., and Cheney, R.E. (2012). Myosin-X functions in polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 23, 1675–1687.

Liu, R., Woolner, S., Johndrow, J.E., Metzger, D., Flores, A., and Parkhurst, S.M. (2008). Sisyphus, the *Drosophila* myosin XV homolog, traffics within filopodia transporting key sensory and adhesion cargos.

Development 135, 53–63.

Liu, Y., White, H.D., Belknap, B., Winkelmann, D.A., and Forgacs, E. (2015). Omecamtiv Mecarbil Modulates the Kinetic and Motile Properties of Porcine β -Cardiac Myosin. *Biochemistry* 54, 1963–1975.

Liu, Z., Chen, P., Gao, H., Gu, Y., Yang, J., Peng, H., Xu, X., Wang, H., Yang, M., Liu, X., et al. (2014). Ubiquitylation of Autophagy Receptor Optineurin by HACE1 Activates Selective Autophagy for Tumor Suppression. *Cancer Cell* 26, 106–120.

Lohi, O., Poussu, A., Mao, Y., Quijcho, F., and Lehto, V.P. (2002). VHS domain - A longshoreman of vesicle lines. *FEBS Lett.* 513, 19–23.

Loubery, S., Delevoye, C., Louvard, D., Raposo, G., and Coudrier, E. (2012). Myosin VI Regulates Actin Dynamics and Melanosome Biogenesis. *Traffic* 13, 665–680.

Malik, F.I., Hartman, J.J., Elias, K.A., Morgan, B.P., Rodriguez, H., Anderson, R.L., and Morgans, D.J. (2011). Cardiac Myosin Activation: A Potential Therapeutic Approach for Systolic Heart Failure. *Science* 331, 1439–1443.

Maron, B.J. (2002). Hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 106, 2419–2421.

Maron, B.J., and Maron, M.S. (2013). Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 381, 242–55.

Martin, R., Jäger, A., Bohl, M., Richter, S., Fedorov, R., Manstein, D.J., Gutzeit, H.O., and Knölker, H.J. (2009). Total synthesis of pentabromo- and pentachloropseudilin, and synthetic analogues-allosteric inhibitors of myosin ATPase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 48, 8042–8046.

Masters, T.A., Kendrick-jones, J., and Buss, F. (2016). Calcium gets myosin VI ready for work. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 2325–2327.

Masters, T.A., Tumbarello, D.A., Chibalina, M. V., and Buss, F. (2017). MYO6 Regulates Spatial Organization of Signaling Endosomes Driving AKT Activation and Actin Dynamics. *Cell Rep.* 19, 2088–2101.

Mcnamara, J.W., Li, A., Smith, N.J., Lal, S., Graham, R.M., Kooiker, B., Dijk, S.J. Van, Samantha, P.H., Cooke, R., Cooke, R., et al. (2017). Ablation of cardiac myosin binding protein-C disrupts the super-relaxed state of myosin in murine cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 94, 65–71.

Meena, N.P., Zhu, G., Mittelstadt, P.R., Giardino-Torchia, M.L., Pourcelot, M., Arnoult, D., Ashwell, J.D., and Munitic, I. (2016). The TBK1 binding domain of optineurin promotes type I interferon responses. *FEBS Lett.* 590, 1498–1508.

Mehta, A.D., Rock, R.S., Rief, M., Spudich, J.A., Mooseker, M.S., and Cheney, R.E. (1999). Myosin-V is a

processive actin-based motor. *Nature* 400, 590–593.

Ménétrey, J., Bahloul, A., Wells, A.L., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2005). The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal. *Nature* 435, 779–785.

Ménétrey, J., Llinas, P., Mukherjea, M., Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2007). The structural basis for the large powerstroke of myosin VI. *Cell* 131, 300–308.

Ménétrey, J., Isabet, T., Ropars, V., Mukherjea, M., Pylypenko, O., Liu, X., Perez, J., Vachette, P., Sweeney, H.L., and Houdusse, A.M. (2012). Processive steps in the reverse direction require uncoupling of the lead head lever arm of myosin VI. *Mol. Cell* 48, 75–86.

Mermall, V., McNally, J.G., and Miller, K.G. (1994). Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. *Nature* 369, 560–562.

Moen, R.J., Johnsrud, D.O., Thomas, D.D., and Titus, M.A. (2011). Characterization of a Myosin VII MyTH/FERM Domain. *J. Mol. Biol.* 413, 17–23.

Morita, H., Rehm, H.L., Menesses, A., McDonough, B., Roberts, A.E., Kucherlapati, R., Towbin, J.A., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (2008). Shared Genetic Causes of Cardiac Hypertrophy in Children and Adults. *N. Engl. J. Med.* 358, 1899–1908.

Morris, S.M., Arden, S.D., Roberts, R.C., Kendrick-Jones, J., Cooper, J. a, Luzio, J.P., and Buss, F. (2002). Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton. *Traffic* 3, 331–341.

Morrison, J.K., and Miller, K.G. (2008). Genetic characterization of the *drosophila* jaguar322 mutant reveals that complete myosin VI loss of function is not lethal. *Genetics* 179, 711–716.

Morriswood, B., Ryzhakov, G., Puri, C., Arden, S.D., Roberts, R., Dendrou, C., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2007). T6BP and NDP52 are myosin VI binding partners with potential roles in cytokine signalling and cell adhesion. *J. Cell Sci.* 120, 2574–2585.

Muders, M.H., Dutta, S.K., Wang, L., Lau, J.S., Bhattacharya, R., Smyrk, T.C., Chari, S.T., Datta, K., and Mukhopadhyay, D. (2006). Expression and regulatory role of GAIP-interacting protein GIPC in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 66, 10264–10268.

Muders, M.H., Vohra, P.K., Dutta, S.K., Wang, E., Ikeda, Y., Wang, L., Udugamasooriya, D.G., Memic, A., Rupasinghe, C.N., Baretton, G.B., et al. (2009). Targeting GIPC/synectin in pancreatic cancer inhibits tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 15, 4095–4103.

von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B.J., Foeglein, Á., Bloor, S., Rutherford, T.J., Freund, S.M. V,

Komander, D., and Randow, F. (2012). LC3C, Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52, Is Required for Antibacterial Autophagy. *Mol. Cell* 48, 329–342.

Mukherjea, M., Llinas, P., Kim, H., Travaglia, M., Safer, D., Ménétrey, J., Franzini-Armstrong, C., Selvin, P.R., Houdusse, A., and Sweeney, H.L. (2009). Myosin VI dimerization triggers an unfolding of a three-helix bundle in order to extend its reach. *Mol. Cell* 35, 305–315.

Mukherjea, M., Ali, M.Y.Y., Kikuti, C., Safer, D., Yang, Z., Sirkia, H., Ropars, V., Houdusse, A., Warshaw, D.M.M., and Sweeney, H.L.L. (2014). Myosin VI Must Dimerize and Deploy Its Unusual Lever Arm in Order to Perform Its Cellular Roles. *Cell Rep.* 8, 1522–1532.

Naccache, S.N., and Hasson, T. (2006). Myosin VI altered at threonine 406 Stabilizes actin filaments in vivo. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 633–645.

Naccache, S.N., Hasson, T., and Horowitz, A. (2006). Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12735–12740.

Nag, S., Sommesse, R.F., Ujfalusi, Z., Combs, A., Langer, S., Sutton, S., Leinwand, L.A., Geeves, M.A., Ruppel, K.M., and Spudich, J.A. (2015). Contractility parameters of human -cardiac myosin with the hypertrophic cardiomyopathy mutation R403Q show loss of motor function. *Sci. Adv.* 1, 2–16.

Nakazawa, S., Oikawa, D., Ishii, R., Ayaki, T., Takahashi, H., Takeda, H., Ishitani, R., Kamei, K., Takeyoshi, I., Kawakami, H., et al. (2016). Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Commun.* 7, 12547.

Narasimhulu, S.B., and Reddy, A.S. (1998). Characterization of microtubule binding domains in the Arabidopsis kinesin-like calmodulin binding protein. *Plant Cell* 10, 957–965.

Nishikawa, S., Homma, K., Komori, Y., Iwaki, M., Wazawa, T., Hikikoshi Iwone, A., Saito, J., Ikebe, R., Katayama, E., Yanagida, T., et al. (2002). Class VI Myosin Moves Processively along Actin Filaments Backward with Large Steps. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 311–317.

Odronitz, F., and Kollmar, M. (2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol.* 8, R196.

Pal, K., Pletnev, A.A., Dutta, S.K., Wang, E., Zhao, R., Baral, A., Yadav, V.K., Aggarwal, S., Krishnaswamy, S., Alkharfy, K.M., et al. (2014). Inhibition of Endoglin-GIPC Interaction Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth. *Mol. Cancer Ther.* 13, 2264–2275.

Park, H., Ramamurthy, B., Travaglia, M., Safer, D., Chen, L.Q., Franzini-Armstrong, C., Selvin, P.R., and Sweeney, H.L. (2006). Full-length myosin VI dimerizes and moves processively along actin filaments upon monomer clustering. *Mol. Cell* 21, 331–336.

Park, H., Li, A., Chen, L.-Q., Houdusse, A., Selvin, P.R., and Sweeney, H.L. (2007). The unique insert at the end of the myosin VI motor is the sole determinant of directionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 778–783.

Pasha, S.N., Meenakshi, I., and Sowdhamini, R. (2016). Revisiting Myosin Families Through Large-scale Sequence Searches Leads to the Discovery of New Myosins. *Evol. Bioinform. Online* *12*, 201–211.

Patra, C.R., Rupasinghe, C.N., Dutta, S.K., Bhattacharya, S., Wang, E., Spaller, M.R., and Mukhopadhyay, D. (2012). Chemically modified peptides targeting the PDZ domain of GIPC as a therapeutic approach for cancer. *ACS Chem. Biol.* *7*, 770–779.

Peckham, M. (2011). Coiled coils and SAH domains in cytoskeletal molecular motors. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 1142–1148.

Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A.G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Paolo, P., Fiore, D., Polo, S., and Schneider, T.R. (2006). Crystal Structure of the Ubiquitin Binding Domains of Rabex-5 Reveals Two Modes of Interaction with Ubiquitin. *Cell* *124*, 1183–1195.

Petersen, K.J., Goodson, H. V., Arthur, A.L., Luxton, G.W.G., Houdusse, A., and Titus, M.A. (2016). MyTH4-FERM myosins have an ancient and conserved role in filopod formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E8059–E8068.

Petit, C., and Richardson, G.P. (2009). Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function. *Nat. Neurosci.* *12*, 703–710.

Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A.G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H.D.T., Konarev, P. V., and Svergun, D.I. (2012). New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* *45*, 342–350.

Phichith, D., Travaglia, M., Yang, Z., Liu, X., Zong, A.B., Safer, D., and Sweeney, H.L. (2009). Cargo binding induces dimerization of myosin VI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17320–17324.

Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2015). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 1–14.

Planelles-Herrero, V.J., Hartman, J.J., Robert-Paganin, J., Malik, F.I., and Houdusse, A. (2017). Mechanistic and structural basis for activation of cardiac myosin force production by omecamtiv mecarbil. *Nat. Commun.* *8*, 190.

Preller, M., Chinthalapudi, K., Martin, R., Knölker, H.J., and Manstein, D.J. (2011). Inhibition of myosin ATPase activity by halogenated pseudilins: A structure-activity study. *J. Med. Chem.* *54*, 3675–3685.

Puri, C. (2009). Loss of myosin VI no insert isoform (NoI) induces a defect in clathrin-mediated

endocytosis and leads to caveolar endocytosis of transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* **284**, 34998–35014.

Pylypenko, O., Song, L., Squires, G., Liu, X., Zong, A.B., Houdusse, A., and Sweeney, H.L. (2011). Role of insert-1 of myosin VI in modulating nucleotide affinity. *J. Biol. Chem.* **286**, 11716–11723.

Pylypenko, O., Attanda, W., Gauquelin, C., Lahmani, M., and Coulibaly, D. (2013). Structural basis of myosin V Rab GTPase-dependent cargo recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20443–20448.

Ramamurthy, B., Yengo, C.M., Straight, A.F., Mitchison, T.J., and Sweeney, H.L. (2004). Kinetic mechanism of blebbistatin inhibition of nonmuscle myosin IIB. *Biochemistry* **43**, 14832–14839.

Rashid, S., Pilecka, I., Torun, A., Olchowik, M., Bielinska, B., and Miaczynska, M. (2009). Endosomal adaptor proteins APPL1 and APPL2 are novel activators of β -catenin/TCF-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **284**, 18115–18128.

Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., and Holden, H.M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50–58.

Redowicz, M.J. (2007). Unconventional myosins in muscle. *Eur. J. Cell Biol.* **86**, 549–558.

Reed, B.C., Cefalu, C., Bellaire, B.H., Cardelli, J.A., Louis, T., Salamon, J., Bloecher, M.A., and Bunn, R.C. (2005). GLUT1CBP(TIP2/GIPC1) interactions with GLUT1 and myosin VI: evidence supporting an adapter function for GLUT1CBP. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4183–4201.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* **302**, 1704–1709.

Rock, R.S., Rice, S.E., Wells, A.L., Purcell, T.J., Spudich, J.A., and Sweeney, H.L. (2001). Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13655–13659.

Rock, R.S., Ramamurthy, B., Dunn, A.R., Beccafico, S., Rami, B.R., Morris, C., Spink, B.J., Franzini-armstrong, C., Spudich, J.A., and Sweeney, H.L. (2005). A Flexible Domain Is Essential for the Large Step Size and Processivity of Myosin VI. *Mol. Cell* **17**, 603–609.

Rogat, A.D., and Miller, K.G. (2002). A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J. Cell Sci.* **115**, 4855–4865.

Ross, J.L., Ali, M.Y., and Warshaw, D.M. (2008). Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 41–47.

Roux, I., Hosie, S., Johnson, S.L., Bahloul, A., Cayet, N., Nouaille, S., Kros, C.J., Petit, C., and Safieddine, S. (2009). Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses.

Hum. Mol. Genet. 18, 4615–4628.

Sahlender, D. a, Roberts, R.C., Arden, S.D., Spudich, G., Taylor, M.J., Luzio, J.P., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2005). Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J. Cell Biol.* 169, 285–295.

Sakai, T., Umeki, N., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2011). Cargo binding activates myosin VIIA motor function in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7028–7033.

Sakai, T., Jung, H.S., Sato, O., Yamada, M.D., You, D.J., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2015). Structure and regulation of the movement of human myosin VIIA. *J. Biol. Chem.* 290, 17587–17598.

Sato, O., Komatsu, S., Sakai, T., Tsukasaki, Y., Tanaka, R., Mizutani, T., Watanabe, T.M., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2017). Human Myosin VIIa Is a Very Slow Processive Motor Protein on Various Cellular Actin Structures. *J. Biol. Chem.* jbc.M116.765966.

Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., Brand, M., and Zerial, M. (2008). The Endosomal Protein Appl1 Mediates Akt Substrate Specificity and Cell Survival in Vertebrate Development. *Cell* 133, 486–497.

Scheres, S.H.W. (2012). RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 180, 519–530.

Sebé-Pedrós, A., Grau-Bové, X., Richards, T.A., and Ruiz-Trillo, I. (2014). Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach. *Genome Biol. Evol.* 6, 290–305.

Seet, L.F., Liu, N., Hanson, B.J., and Hong, W. (2004). Endofin Recruits TOM1 to Endosomes. *J. Biol. Chem.* 279, 4670–4679.

Sellers, J.R. (2000). Myosins : a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* 1496, 3–33.

Shang, G., Brautigam, C.A., Chen, R., Lu, D., Torres-Vázquez, J., and Zhang, X. (2017). Structure analyses reveal a regulated oligomerization mechanism of the PlexinD1/GIPC/myosin VI complex. *Elife*.

Shen, X., Ying, H., Qiu, Y., Park, J., Shyam, R., Chi, Z., Iwata, T., and Yue, B.Y.J.T. (2011). Processing of Optineurin in Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 3618–3629.

Shen, Y.-T., Malik, F.I., Zhao, X., Depre, C., Dhar, S.K., Abarzúa, P., Morgans, D.J., and Vatner, S.F. (2010). Improvement of cardiac function by a cardiac Myosin activator in conscious dogs with systolic heart failure. *Circ. Heart Fail.* 3, 522–527.

Singer, a., Deuse, Y., Koch, U., Hölscher, T., Pfitzmann, D., Jakob, C., Hehlhans, S., Baretton, G.B., Rentsch, A., Baumann, M., et al. (2012). Impact of the adaptor protein GIPC1/Synectin on radioresistance

and survival after irradiation of prostate cancer. *Strahlentherapie Und Onkol.* **188**, 1125–1132.

Sivaramakrishnan, S., and Spudich, J.A. (2009). Coupled myosin VI motors facilitate unidirectional movement on an F-actin network. *J. Cell Biol.* **187**, 53–60.

Sivaramakrishnan, S., Spink, B.J., Sim, A.Y.L., Doniach, S., and Spudich, J.A. (2008). Dynamic charge interactions create surprising rigidity in the ER/K alpha-helical protein motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13356–13361.

Slowicka, K., Vereecke, L., and Loo, G. Van (2016). Cellular Functions of Optineurin in Health and Disease. *Trends Immunol.* **37**, 621–633.

Smith, C. a, and Rayment, I. (1996). X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 5404–5417.

Smith, C.J., Grigorieff, N., and Pearse, B.M.F. (1998). Clathrin coats at 21Å resolution: A cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. *EMBO J.* **17**, 4943–4953.

Sobczak, M., Chumak, V., Pomorski, P., Wojtera, E., Majewski, ??ukasz, Nowak, J., Yamauchi, J., and Redowicz, M.J. (2016). Interaction of myosin VI and its binding partner DOCK7 plays an important role in NGF-stimulated protrusion formation in PC12 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 1589–1600.

Spink, B.J., Sivaramakrishnan, S., Lipfert, J., Doniach, S., and Spudich, J. a (2008). Long single alpha-helical tail domains bridge the gap between structure and function of myosin VI. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 591–597.

Spudich, J.A. (2001). The myosin swinging cross-bridge model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 387–392.

Spudich, G., Chibalina, M. V, Au, J.S., Arden, S.D., Buss, F., and Kendrick-Jones, J. (2007). Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerisation is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P2. *Nat. Cell Biol.* **9**, 176–183.

Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R., and Mitchison, T.J. (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* **299**, 1743–1747.

Stransky, N., Egloff, A.M., Tward, A.D., Kostic, A.D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Kryukov, G. V, Lawrence, M., Sougnez, C., Mckenna, A., et al. (2011). The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science* **333**, 1157–1160.

Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2007). What can myosin VI do in cells? *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 57–66.

Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2010a). Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* **141**,

573–582.

Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2010b). Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu. Rev. Biophys.* *39*, 539–557.

Swenson, A.M., Tang, W., Blair, C.A., Fetrow, C.M., William, C., Previs, M.J., Campbell, K.S., Yengo, C.M., Unrath, W.C., Previs, M.J., et al. (2017). Omecamtiv Mecarbil Enhances the Duty Ratio of Human Beta Cardiac Myosin Resulting in Increased Calcium Sensitivity and Slowed Force Development in Cardiac Muscle. *J. Biol. Chem.* *292*, 3768–3778.

Szymczynska, B.R., Bowman, J., McCracken, S., Pineda-Lucena, A., Lu, Y., Cox, B., Lambermon, M., Graveley, B.R., Arrowsmith, C.H., and Blencowe, B.J. (2003). Structure and function of the PWI motif: A novel nucleic acid-binding domain that facilitates pre-mRNA processing. *Genes Dev.* *17*, 461–475.

Tabb, J.S., Molyneaux, B.J., Cohen, D.L., Kuznetsov, S.A., and Langford, G.M. (1998). Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J. Cell Sci.* *111*, 3221–3234.

Tajsharghi, H. (2008). Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *9*, 1259–1275.

Teerlink, J.R., Clarke, C.P., Saikali, K.G., Lee, J.H., Chen, M.M., Escandon, R.D., Elliott, L., Bee, R., Habibzadeh, M.R., Goldman, J.H., et al. (2011). Dose-dependent augmentation of cardiac systolic function with the selective cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil: A first-in-man study. *Lancet* *378*, 667–675.

Teerlink, J.R., Felker, G.M., McMurray, J.J. V, Solomon, S.D., Adams, K.F., Cleland, J.G.F., Ezekowitz, J.A., Goudev, A., Macdonald, P., Metra, M., et al. (2016). Chronic Oral Study of Myosin Activation to Increase Contractility in Heart Failure (COSMIC-HF): a phase 2, pharmacokinetic, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* *388*, 2895–2903.

Tomatis, V.M., Papadopoulos, A., Malintan, N.T., Martin, S., Wallis, T., Gormal, R.S., Kendrick-Jones, J., Buss, F., and Meunier, F.A. (2013). Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J. Cell Biol.* *200*, 301–320.

Tumbarello, D.A., Waxse, B.J., Arden, S.D., Bright, N.A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1024–1035.

Tumbarello, D. a, Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2013). Myosin VI and its cargo adaptors - linking endocytosis and autophagy. *J. Cell Sci.* *126*, 2561–2570.

Tuxworth, R.I., Weber, I., Wessels, D., Addicks, G.C., Soll, D.R., Gerisch, G., and Titus, M.A. (2001). A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr. Biol.* *11*, 318–329.

Umeki, N., Jung, H.S., Watanabe, S., Sakai, T., Li, X., Ikebe, R., Craig, R., and Ikebe, M. (2009). The tail binds to the head-neck domain, inhibiting ATPase activity of myosin VIIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8483–8488.

Umeki, N., Jung, H.S., Sakai, T., Sato, O., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2011). Phospholipid-dependent regulation of the motor activity of myosin X. *Nat. Struct. Mol. Biol.*

Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst* *30*, 1022–1025.

Varsano, T., Dong, M.-Q., Niesman, I., Gacula, H., Lou, X., Ma, T., Testa, J.R., Yates, J.R., and Farquhar, M.G. (2006). GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 8942–8952.

Volkov, V. V., and Svergun, D.I. (2003). Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. In *Journal of Applied Crystallography*, pp. 860–864.

Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., and Bricogne, G. (2007). Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol. Biol.* *364*, 215–230.

Vreugde, S., Ferrai, C., Miluzio, A., Hauben, E., Marchisio, P.C., Crippa, M.P., Bussi, M., and Biffo, S. (2006). Nuclear Myosin VI Enhances RNA Polymerase II-Dependent Transcription. *Mol. Cell* *23*, 749–755.

Wagner, S., Carpentier, I., Rogov, V., Kreike, M., Ikeda, F., Löhr, F., Wu, C.-J., Ashwell, J., Dötsch, V., Dikic, I., et al. (2008). Ubiquitin binding mediates the NF- κ B inhibitory potential of ABIN proteins. *Oncogene* *27*, 3739–3745.

Walker, M.L., Burgess, S.A., Sellers, J.R., Wang, F., Hammer, J.A., Trinick, J., and Knight, P.J. (2000). Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature* *405*, 804–807.

Walklate, J., Ujfalusi, Z., and Geeves, M.A. (2016). Myosin isoforms and the mechanochemical cross-bridge cycle. *J. Exp. Biol.* *219*, 168–174.

Wang, H. (2002). A Novel Transmembrane Ser/Thr Kinase Complexes with Protein Phosphatase-1 and Inhibitor-2*. *J. Biol. Chem.* *277*, 49605–49612.

Wang, F., Thirumurugan, K., Stafford, W.F., Hammer, J.A., Knight, P.J., and Sellers, J.R. (2004). Regulated Conformation of Myosin V. *J. Biol. Chem.* *279*, 2333–2336.

Wang, L., Lau, J.S., Patra, C.R., Cao, Y., Bhattacharya, S., Dutta, S., Nandy, D., Wang, E., Rupasinghe, C.N., Vohra, P., et al. (2010). RGS-GAIP-interacting protein controls breast cancer progression. *Mol. Cancer Res.* *8*, 1591–1600.

- Warshaw, D.M. (2016). Throttling back the heart's molecular motor. *Science* *351*, 556–557.
- Weber, K.L., Sokac, A.M., Berg, J.S., Cheney, R.E., and Bement, W.M. (2004). A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature* *431*, 325–329.
- Weck, M.L., Grega-Larson, N.E., and Tyska, M.J. (2017). MyTH4-FERM myosins in the assembly and maintenance of actin-based protrusions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *44*, 68–78.
- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.-S., and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature* *457*, 901–905.
- Wei, Z., Yan, J., Lu, Q., Pan, L., and Zhang, M. (2011). Cargo recognition mechanism of myosin X revealed by the structure of its tail MyTH4-FERM tandem in complex with the DCC P3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 5372–5377.
- Wells, A.L., Lin, A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain, S.M., Hasson, T., Carragher, B.O., Milligan, R.A., and Sweeney, H.L. (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* *401*, 505–508.
- Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K.M., and Taylor, K. (2001). Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4361–4366.
- Westbrook, J.A., Cairns, D.A., Peng, J., Speirs, V., Hanby, A.M., Holen, I., Wood, S.L., Ottewill, P.D., Marshall, H., Banks, R.E., et al. (2016). CAPG and Gipc1: Breast cancer biomarkers for bone metastasis development and treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* *108*, djv360.
- White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* *125*, 42–46.
- Winkelmann, D.A., Forgacs, E., Miller, M.T., and Stock, A.M. (2015). Structural basis for drug-induced allosteric changes to human β -cardiac myosin motor activity. *Nat. Commun.* *6*.
- Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular Mechanism of Multivesicular Body Biogenesis by ESCRT Complexes. *Nature* *464*, 864–869.
- Wollscheid, H., Biancospino, M., He, F., Magistrati, E., Molteni, E., Lupia, M., Soffientini, P., Rottner, K., Cavallaro, U., Pozzoli, U., et al. (2016). Diverse functions of myosin VI elucidated by an isoform-specific α -helix domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 300–308.
- Wolny, M., Batchelor, M., Bartlett, G.J., Baker, E.G., Kurzawa, M., Knight, P.J., Dougan, L., Woolfson, D.N., Paci, E., and Peckham, M. (2017). Characterization of long and stable de novo single α -helix domains provides novel insight into their stability. *Sci. Rep.* *7*, 44341.
- Woodhead, J.L., Zhao, F., Craig, R., Egelman, E.H., Alamo, L., and Padrón, R. (2005). Atomic model of a

myosin filament in the relaxed state. *Nature* **436**, 1195–1199.

Woolner, S., and Bement, W.M. (2009). Unconventional myosins acting unconventionally. *Trends Cell Biol.* **19**, 245–252.

Woolner, S., O'Brien, L.L., Wiese, C., and Bement, W.M. (2008). Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* **182**, 77–88.

Wright, J.D., Mace, P.D., and Day, C.L. (2016). Noncovalent Ubiquitin Interactions Regulate the Catalytic Activity of Ubiquitin Writers. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 924–937.

Wu, L., Pan, L., Wei, Z., and Zhang, M. (2011). Structure of MyTH4-FERM domains in myosin VIIa tail bound to cargo. *Science* **331**, 757–760.

Xie, X., Li, F., Wang, Y., Wang, Y., Lin, Z., Cheng, X., Liu, J., Chen, C., Pan, L., Chemistry, N.P., et al. (2015). Molecular Basis of Ubiquitin Recognition by the Autophagy Receptor CALCOCO2. *Autophagy* **11**, 1775–17789.

Yamakami, M., Yoshimori, T., and Yokosawa, H. (2003). Tom1, a VHS Domain-containing Protein, Interacts with Tollip, Ubiquitin, and Clathrin. *J. Biol. Chem.* **278**, 52865–52872.

Yang, Y., Baboolal, T.G., Siththanandan, V., Chen, M., Walker, M.L., Knight, P.J., Peckham, M., and Sellers, J.R. (2009). A FERM domain autoregulates *Drosophila* myosin 7a activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4189–4194.

Yavelsky, V., Rohkin, S., Shaco-Levy, R., Tzikinovsky, A., Amir, T., Kohn, H., Delgado, B., Rabinovich, A., Piura, B., Chan, G., et al. (2008). Native human autoantibodies targeting GIPC1 identify differential expression in malignant tumors of the breast and ovary. *BMC Cancer* **8**, 247.

Ying, H., and Yue, B.Y.J.T. (2016). Optineurin: The autophagy connection. *Exp. Eye Res.* **144**, 73–80.

Yoshida, H., Cheng, W., Hung, J., Montell, D., Geisbrecht, E., Rosen, D., Liu, J., and Naora, H. (2004). Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8144–8149.

Yu, C., Feng, W., Wei, Z., Miyanoiri, Y., Wen, W., Zhao, Y., and Zhang, M. (2009). Myosin VI undergoes cargo-mediated dimerization. *Cell* **138**, 537–548.

Yu, I., Planelles-herrero, V.J., Sourigues, Y., Moussaoui, D., Sirkia, H., Kikuti, C., Stroebel, D., Titus, M.A., and Houdusse, A. (2017). Myosin 7 and its adaptors link cadherins to actin. *Nat. Commun.* **8**, 15864.

Zhang, X., and Simons, M. (2014). Receptor tyrosine kinase endocytosis in endothelium: Biology and signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1831–1837**.

Zhang, G., Chen, L., Sun, K., Khan, A.A., Yan, J., Liu, H., Lu, A., and Gu, N. (2016). Neuropilin-1 (NRP-1)/GIPC1 pathway mediates glioma progression. *Tumor Biol.* 37, 1019–1031.

Zhang, H., Berg, J.S., Li, Z., Wang, Y., Lång, P., Sousa, A.D., Bhaskar, A., Cheney, R.E., and Strömblad, S. (2004). Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 6, 523–531.

Zhang, H.-M., Ji, H.-H., Ni, T., Ma, R.-N., Wang, A., and Li, X. (2017). Characterization of Blebbistatin Inhibition of Smooth Muscle Myosin and Nonmuscle Myosin-2. *Biochemistry*.

Zorca, C.E., Kim, L.K., Kim, Y.J., Krause, M.R., Zenklusen, D., Spilianakis, C.G., and Flavell, R. a. (2015). Myosin VI regulates gene pairing and transcriptional pause release in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1587-93.

Résumé

Les moteurs moléculaires sont des protéines capables de produire une force : elles transforment l'énergie chimique de l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique. Cette thèse se focalise sur l'étude d'une famille de moteurs moléculaires, les myosines, qui se déplacent le long des filaments d'actine et assurent d'importantes fonctions cellulaires.

Mon projet principal porte sur la myosine VI, une myosine très particulière car elle est la seule à se déplacer vers l'extrémité négative des filaments d'actine. La myosine VI est produite dans la cellule sous forme auto-inhibée, inactive. Dans la cellule, son activité est également régulée par plusieurs protéines interagissant avec la queue C-terminale de la myosine VI. Ces protéines, présentes à des endroits précis de la cellule, recrutent la myosine VI et dictent l'action qu'elle doit effectuer. Dans le premier chapitre de ma thèse, des analyses de SAXS, de dispersion de la lumière, de microscopie, d'interaction et de mutagenèse ont permis de mieux comprendre le mécanisme régulant l'adoption de l'état auto-inhibé, ainsi que son activation par le calcium. L'interaction avec différents partenaires a été caractérisée. GIPC1, le partenaire le plus étudié, promeut de façon indirecte la dimérisation et l'activation de la myosine VI.

Pendant ma thèse, j'ai également été impliqué dans deux autres projets qui s'inscrivent dans la logique de mon projet de thèse et qui ont mené à la publication de quatre articles. Deux chapitres, plus brefs, sont donc dédiés à ces projets. Le deuxième chapitre porte sur la régulation de l'activité de la myosine VII par ses partenaires cellulaires. Finalement, le troisième chapitre est dédié à l'étude de la modification allostérique de l'activité des myosines par des petites molécules.

Annexes

Myosin MyTH4-FERM structures highlight important principles of convergent evolution

Vicente José Planelles-Herrero^{a,b}, Florian Blanc^{a,c}, Serena Sirigu^a, Helena Sirkia^a, Jeffrey Clause^a, Yannick Sourigues^a, Daniel O. Johnsrud^d, Beatrice Amigues^a, Marco Cecchini^c, Susan P. Gilbert^e, Anne Houdusse^{a,1,2}, and Margaret A. Titus^{d,1,2}

^aStructural Motility, Institut Curie, CNRS, UMR 144, PSL Research University, F-75005 Paris, France; ^bUPMC Université de Paris 6, Institut de Formation Doctorale, Sorbonne Universités, 75252 Paris Cedex 05, France; ^cLaboratoire d'Ingénierie des Fonctions Moléculaires, Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, UMR 7006 CNRS, Université de Strasbourg, F-67083 Strasbourg Cedex, France; ^dDepartment of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455; and ^eDepartment of Biological Sciences, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY 12180

Edited by James A. Spudich, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, and approved March 31, 2016 (received for review January 15, 2016)

Myosins containing MyTH4-FERM (myosin tail homology 4-band 4.1, ezrin, radixin, moesin, or MF) domains in their tails are found in a wide range of phylogenetically divergent organisms, such as humans and the social amoeba *Dictyostelium* (Dd). Interestingly, evolutionarily distant MF myosins have similar roles in the extension of actin-filled membrane protrusions such as filopodia and bind to microtubules (MT), suggesting that the core functions of these MF myosins have been highly conserved over evolution. The structures of two DdMyo7 signature MF domains have been determined and comparison with mammalian MF structures reveals that characteristic features of MF domains are conserved. However, across millions of years of evolution conserved class-specific insertions are seen to alter the surfaces and the orientation of subdomains with respect to each other, likely resulting in new sites for binding partners. The MyTH4 domains of Myo10 and DdMyo7 bind to MT with micromolar affinity but, surprisingly, their MT binding sites are on opposite surfaces of the MyTH4 domain. The structural analysis in combination with comparison of diverse MF myosin sequences provides evidence that myosin tail domain features can be maintained without strict conservation of motifs. The results illustrate how tuning of existing features can give rise to new structures while preserving the general properties necessary for myosin tails. Thus, tinkering with the MF domain enables it to serve as a multifunctional platform for cooperative recruitment of various partners, allowing common properties such as autoinhibition of the motor and microtubule binding to arise through convergent evolution.

protein evolution | molecular tinkering | microtubules | filopodia

The evolution of new functions is often driven by the reuse of existing structures, a process François Jacob called “molecular tinkering” (1). Conservation of critical residues is often necessary for enzymatic activities, whereas structural motifs mostly involved in protein recognition present more opportunities for molecular tinkering. Molecular motors such as myosins are of particular interest for exploring protein evolution because they contain both a rather conserved motor domain and a more diverse C-terminal tail region. These multifunctional motors have central roles in a wide range of cellular activities, which require precise coupling of their motor function to specific partners. Myosins use a highly conserved mechanism of force production that involves rearrangement of the motor domain leading to lever arm swing (2), and members of the superfamily seem to have acquired new cellular functions by modification of key regions controlling recruitment of partners and regulating motor functions (3). This is in large part achieved by the gain of structural domains in the C-terminal cargo binding region and the evolution of their sequence by molecular tinkering (e.g., ref. 4). A particularly interesting subgroup of myosins includes those that have either one or two MyTH4-FERM domains (MF; myosin tail homology 4-band 4.1, ezrin, radixin, moesin) in their C-terminal tail region

(Fig. 1). These MF myosins are widespread and likely quite ancient because they are found in many different branches of the phylogenetic tree (5, 6), including Opisthokonts (which includes Metazoa, unicellular Holozoa, and Fungi), Amoebozoa, and the SAR (Stramenopiles, Alveolates, and Rhizaria) (Fig. 1*A* and *B*). Over the course of hundreds of millions of years of parallel evolution the MF myosins have acquired or maintained roles in the formation of specialized actin-based structures such as filopodia (7, 8) and/or cross-linking microtubules (MT) to actin filaments (9–11).

The Metazoan Myo10 and Amoebozoan *Dictyostelium discoideum* Myo7 (DdMyo7) myosins are both essential for the extension of filopodia, plasma membrane protrusions filled with parallel bundles of F-actin (7, 8, 12), suggesting a high degree of functional conservation throughout evolution. Strikingly, both mammalian Myo10 and DdMyo7 are localized at the tips of filopodia (7, 8) and are thought to play roles in mediating extension of actin filaments against the membrane as well as transporting receptors and regulators along filopodia as they extend (13). Other mammalian MF myosins such as Myo15 and Myo7a and Myo7b have roles in the extension or organization of

Significance

Myosins containing MyTH4-FERM (myosin tail homology 4-band 4.1, ezrin, radixin, moesin, or MF) domains in their tails are found in wide range of phylogenetically divergent organisms. Interestingly, evolutionarily distant MF myosins have similar roles in the extension of actin-filled membrane protrusions, such as filopodia, and microtubule binding, suggesting that their core functions have been highly conserved over evolution. A structural analysis of mammalian and Dd myosin MF domains in combination with comparison of diverse MF myosin sequences illustrate how tuning of existing features can give rise to new structures while preserving the general properties of myosin tails. Thus, tinkering with the MF domain enables it to serve as a multifunctional platform for cooperative recruitment of various partners, allowing common properties to arise through convergent evolution.

Author contributions: S.P.G., A.H., and M.A.T. designed research; V.J.P.-H., S.S., H.S., J.C., Y.S., D.O.J., B.A., and M.A.T. performed research; H.S. and M.A.T. contributed new reagents/analytic tools; V.J.P.-H., F.B., S.S., M.C., S.P.G., A.H., and M.A.T. analyzed data; and A.H. and M.A.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: Crystallography, atomic coordinates, and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb/home/home.do [PDB ID codes 5EJY (DdMF1), 5EJR (DdMF2), 5EQJ (DdMF1 mutant 2, K1157E, H1159E, K1161E, and K1174E), and 5EJS (DdMF2 mutant 2, K1881E, R1882E, K1909E, K1912E, and K1913E)].

¹A.H. and M.A.T. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: anne.houdusse@curie.fr or titus004@umn.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1600736113/-DCSupplemental.

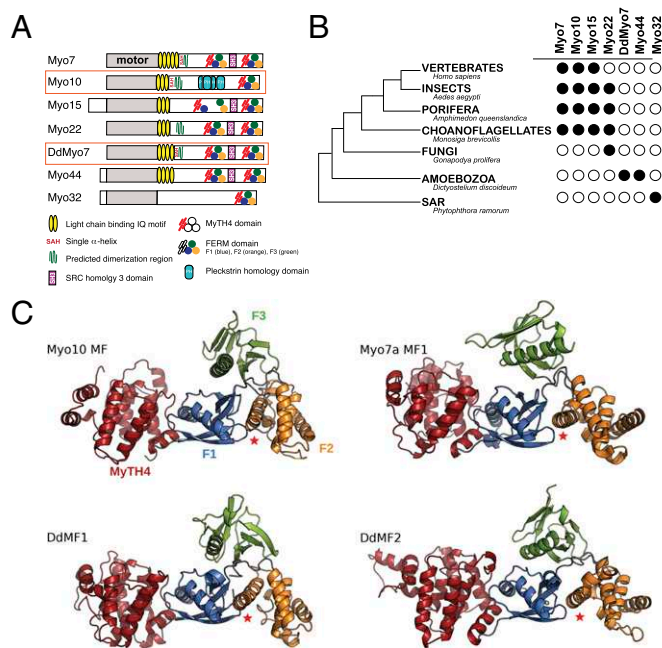


Fig. 1. Evolutionarily distant myosins with a shared conserved MF. (A) Schematic illustration of the MF myosin family showing the tail domain organization. (B) Distribution of MF myosins through phylogeny. A schematized phylogenetic tree (Left) illustrating the relative positions of major phyla and the MF myosins found in representative species (Right) (5). ●, myosin present; ○, myosin not found in this branch of the tree. (C) Ribbon representation illustrating the X-ray structures of HsMyo10MF (27), MmMyo7aMF1 (30), DdMF1, and DdMF2. The structures are all presented with their F1 lobe in a similar orientation. Note the variation in how the F2 and F3 lobes are positioned compared with the F1 lobe in each FERM domain. The F2-H1 helix (red star) orientation is, however, similar in all structures because it participates in strong interactions that maintain the cloverleaf configuration (see also Fig. 6).

actin-filled protrusions such as stereocilia and microvilli (14–17). Mammalian Myo10 and DdMyo7 are also required for cell–substrate adhesion (8, 18), and mammalian Myo10 and *Drosophila* Myo15 have roles in mediating cadherin-dependent cell–cell adhesion in epithelial cells (19, 20). Thus, across a remarkable range of cell types and evolutionarily diverse organisms, the MF family of myosin motors has maintained a core set of shared functions.

The defining feature of the MF myosins is the bipartite structural domain consisting of an N-terminal MyTH4 followed by a FERM domain. The FERM domain serves as a protein interaction module, and in different myosins this domain has been shown to bind to adhesion and signaling receptors as well as actin binding proteins (18, 20–22). The FERM domain has also been implicated in autoinhibition of mammalian Myo7a and Myo10 and *Drosophila* Myo7a (23–26). Less is known about the partners that bind to the MyTH4 domain, and the main role identified so far is MT binding (10, 27, 28). Indeed, it has been shown that both the mammalian Myo10 and the DdMyo7 MyTH4 domains bind to MTs (9, 10, 27), which has important implications for the role of these motors in the generation of force between or cross-linking of the two main cellular cytoskeleton networks.

A combination of structural and functional studies of evolutionarily distant myosin MF domains can provide insight into how molecular tinkering has guided the appearance of conserved and potentially novel functions of this widespread group of motors. The structures of the MF domains from both mammalian Myo7a and 10 have been solved recently, revealing that the MyTH4 domain is a compact helical bundle closely apposed to the FERM domain. The large interaction surface between the MyTH4 and FERM domains results in a supramodular

organization (29, 30), which restricts the relative orientation of these domains (Fig. 1C). However, it is not known whether the supramodular feature is a conserved property of MF domains across many phyla and whether it has mostly a structural or a functional role. Studies of MF domains from phylogenetically distant organisms are necessary to reveal how evolution of a shared domain can diversify myosin function or result in the emergence of conserved functions. A detailed analysis of the MF domains of amoeboid DdMyo7 and comparison with the MF domains of mammalian Myo7a and Myo10 offers a unique opportunity to address the question of structural and functional conservation of the MF domain across over 600 million years of independent evolution.

Results and Discussion

Overall Description of the MyTH4-FERM Structures. Four high-resolution structures describing WT and MT binding loss of function mutant forms (discussed below) of the N-terminal MF (MF1) and C-terminal MF (MF2) domains of the amoeboid DdMyo7 have been solved (Fig. 1C, Materials and Methods, and Table S1). Each of these MF domains has been described from crystal structures that correspond to distinct crystal packing environments (Fig. S1 A–C). Interestingly, the rmsd between the mutant and WT structures for each of the MF domains are low. Comparison of the WT and mutant MF1 structures shows that the rmsd is 0.498 Å (for 392 atoms) and, similarly, comparison of the WT and mutant MF2 domains yields an rmsd of 0.829 Å (for 411 atoms), despite these structures being composed of four subdomains (one MyTH4 domain and three FERM lobes (F1, F2, and F3 lobes) and relatively low sequence identity (Fig. S1A and Table S2). The similarity in the two structures for each MF indicates that the relative orientation of the four subdomains does not exhibit large variations. In contrast, drastic differences in the relative orientation of the MyTH4 and FERM subdomains are observed when the DdMF1 and DdMF2 are compared, as indicated by the large rmsd between the whole MyTH4-FERM domains (5.199 Å, for 373 atoms). Similarly, the rmsd between the MF domains of DdMF1 and DdMF2 are also large when each is compared with the Myo10 MF (2.475 Å, for 320 common atoms and 5.021 Å, for 342 common atoms, respectively).

The MyTH4 and FERM domains of both DdMF1 and DdMF2 are tightly coupled together to form a supramodule (Fig. 1C), similar to the mammalian Myo7a and Myo10 MyTH4-FERM domains (29). The association is mediated by conserved residues at the end of all MyTH4 domains (the last helix of the domain, H7, and the H6.H7 linker that precedes it) and the F1 lobe of the FERM domain (Fig. 2 and Fig. S2 C and D). Electrostatic and hydrophobic interactions link both subdomains together, characterized by a conserved Pro Arg Glu motif (Pro1686 and the salt bridge forming residues Arg1682 and Glu1690 in the Myo10 sequence) that are strictly conserved in DdMyo7 MF1 and MF2 as well as in other distant MyTH4-FERM domains (Fig. 2B and Fig. S2C). The H6.H7 linker and the H7 helix adopt a conformation in the DdMF1 and DdMF2 structures similar to that found in Myo10 MF and Myo7a MF1. Unexpected differences at the end of the MyTH4 of DdMF2, however, result in a supramodule with significantly distinct relative positions between the MyTH4 and FERM (Fig. S2 D and E). There is a large (~23°) difference in the orientation of the core MyTH4 bundle and the linker-region/F1 module when DdMF2 is compared with other MF structures (Fig. S2E). The H6 of the DdMF2 MyTH4 core is shorter by four residues and the linker region that follows contains two prolines that modify the orientation of the linker, whereas helix H7 is extended on its C terminus by three residues. This leads to different interactions of the linker/H7 helix with the surrounding elements in DdMF2 (Fig. S2 D and E) compared with Myo7a MF1, Myo10 MF, and DdMF1, which are quite similar to each other. Interestingly, strong but distinct hydrophobic interactions maintain the linker in tight contact with the MyTH4 core, establishing a new way to form the supramodule with drastically different relative positions for the MyTH4 and

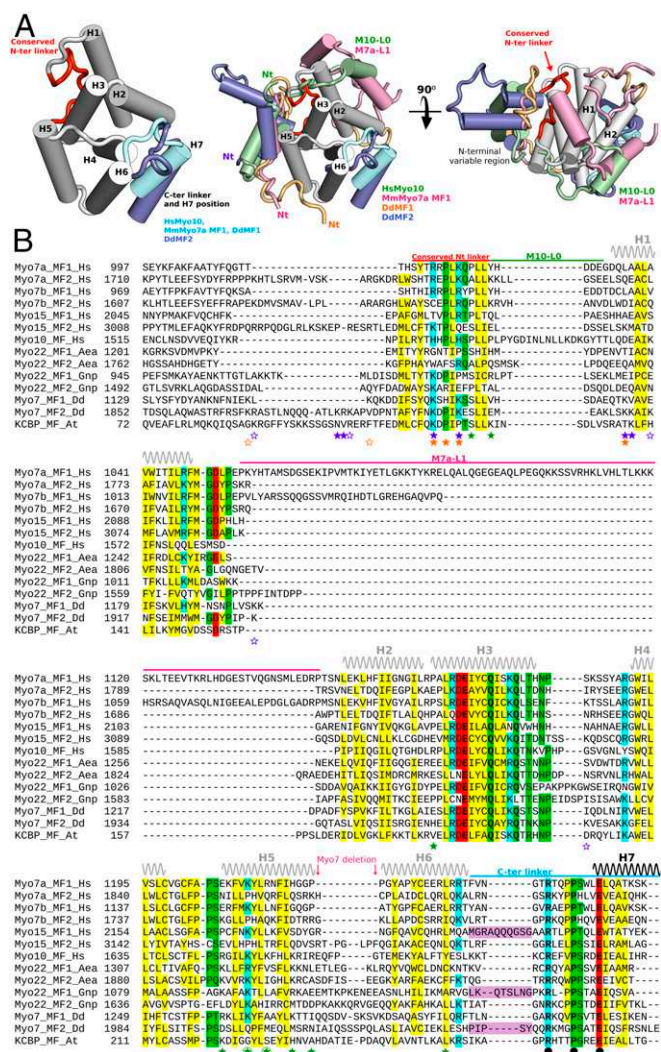


Fig. 2. Conservation of the MyTH4 domain and the MyTH4-FERM interface. (A) Ribbon representation of the MyTH4 domain from the crystallized MF domains. (Left) The core of the MyTH4 domain formed by a bundle of six helices (represented by the gray cylinders, from H1 to H6), which interacts with a conserved N-terminal linker (red) on one surface and with a C-terminal linker and helix H7 (cyan or blue) on the opposite surface. (Middle and Right) The nonconserved long inserts of different MyTH4 domains as well as the N-terminal regions (Nt) are represented using the indicated color code. See also Fig. S2A. The large insertions that are characteristic of the Myo10 and Myo7a classes, respectively, are displayed as M10-L0 (Myo10) and M7a-L1 (Myo7a) and cover the surface of the H1 and H2 helices. (B) Structure-based sequence alignment analysis of representative MyTH4 domains. Residues that are absolutely conserved are indicated in bold. Residues that are highly conserved are highlighted in yellow (hydrophobic residues), blue (positively charged), red (negatively charged), and green (other residues). The Cen2 binding pocket formed in part by the shorter H5 and H6 helices in mammalian Myo7a is indicated as Myo7 deletion (pink arrows). The last helix of the domain that serves as a linker and participates in the interface with the F1 lobe is indicated in black (H7). The conserved residues participating in this interface [Arg, Pro, and Glu (29)] are indicated with black circles. Note the longer linker before the H7 helix in DdMF2 (highlighted in violet) that modifies the orientation of this helix and the supramodule overall shape. Other myosin MyTH4 domains also have longer linkers that may affect the supramodule (Dataset S1). Residues shown to participate (solid stars) or are part of the MT binding surface (open stars) are indicated using the color code defined in A. The MF1, MF2, Hs, Aea, Gnp, Dd, and At abbreviations stand for N-terminal MyTH4-FERM domain, C-terminal MyTH4-FERM domain, *Homo sapiens*, *Aedes aegypti*, *Gonapodya proliferata*, *Dictyostelium discoideum*, and *Arabidopsis thaliana*, respectively.

FERM domains. Thus, whereas the tight linkage between the two domains is maintained for evolutionarily distant MF domains, variations can exist in the overall shape of the supramodule.

Differences in the MyTH4 and FERM domain coupling due to sequence insertions or variation have the potential to lead to significant functional consequences. A particular orientation of these two domains is likely to be optimized for binding to a specific partner, especially if the recognition involves more than one subdomain. For example, a significant change in the overall disposition of myosin subdomains can also be seen for the vertebrate and yeast Myo5 cargo binding domains (4). The drastic difference seen in the disposition of the myosin tail MyTH4 and FERM domains suggests new possibilities for negative or positive cooperativity in partner binding, and the likely emergence of new functions for the myosin from one class to another.

Conservation and Divergence in the MyTH4 Domain of Evolutionarily Distant MF Myosins. Myosins with common functions might be expected to have conserved features necessary for their regulation or their specific cellular roles whereas class-specific variations could be the signature of acquisition of new functions. Comparison of the MyTH4 domains for which a structure is available and sequence analysis of phylogenetically diverse MF proteins revealed the defining, conserved features of the MyTH4 domain. The core of the MyTH4 domain is formed by a conserved six-helix bundle, in which all of the helices are nearly parallel or antiparallel and with a conserved Nter linker preceding the first helix (Fig. 2A and Fig. S2A). The connections between the second, third, fourth, and fifth helices are short and conserved among the different MyTH4 domains. Despite this overall conservation, structural comparison highlights how class-specific inserted variable sequences (analysis summarized in Table S3 and Dataset S1) drastically change the interfaces available for binding to the MyTH4 domain and have the potential to provide binding partner specificity to each myosin class.

First, major variability is observed among MyTH4 domains in the N-terminal variable region before the conserved Nter linker (Fig. 2A; see alignment in Fig. 2B), making it difficult to define the start of the MyTH4 domain. Distinct differences are seen in how this Nter sequence covers the surface of helices H3, H5, and H6 (Fig. 2A, Middle and Right). The structure of the Nter variable region is, however, strikingly similar in the MF1 domains from two distant Myo7 myosins (mammalian and Dd) (Fig. S2A). Interestingly, in DdMyo7 MF2, different basic residues of this Nter variable region cluster are part of the MT binding site (discussed below).

Second, the connection between the first and second helices is highly variable among MyTH4 domains and is particularly long in mammalian Myo7a (M7a-L1, residues 1055–1147) and Myo7b (residues 1027–1086) (Fig. 2A, Middle and Right and 2B). This insertion in Myo7a covers the surface of the H1 and H2 helices that are otherwise exposed in the other MyTH4 domains. This surface is also covered in Myo10, in part, by a long inserted sequence (M10-L0) that forms a loop between the conserved Nter linker and the first helix, H1 (Fig. 2A).

A third variable characteristic of Myo7 MF1s is found at the end of the H5 helix and its connection with the H6 helix (residues 1219–1222 of Myo7a). The shorter H5 and H6 helices in the Myo7a MF1 domain allow the formation of a pocket (not found in other MyTH4 domains) that is exploited for recognizing the Cen2 motif of its cellular partner SANS (30) (Fig. S2B).

The comparison of four different MyTH4 domains reveals that molecular tinkering by insertion and deletion of sequences at specific locations results in drastic changes of the surface of the MyTH4 domain while conserving the overall domain integrity and supramodule organization provided by the six core helices (Table S3). Interestingly, these modifications are largely conserved in sequence within each distinct myosin class. Overall, these inserted sequences have the potential to play an important role in defining new functions of the MyTH4 domain for different myosin classes during evolution either by hiding previously

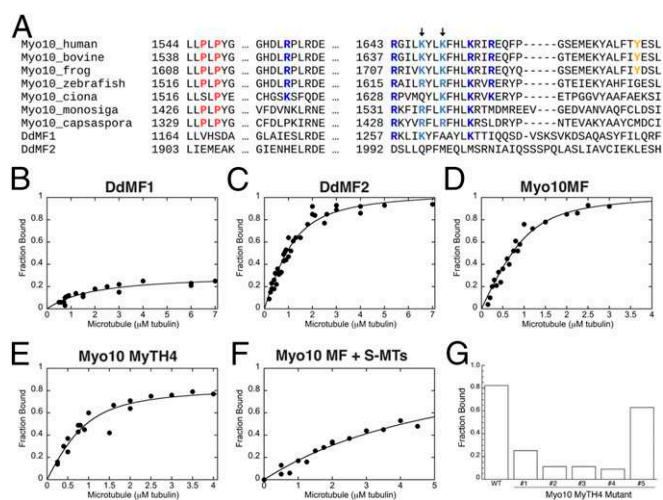


Fig. 3. MF domain binding to MTs. (A) Conservation of the Myo10 MT binding motif. The residues previously implicated in MT binding in the Myo10 MyTH4 domain (27) are shown in light blue. The additionally identified residues participating in the interaction of the Myo10 MyTH4 domain are shown in dark blue (positively charged), yellow (tyrosine), and red (prolines). The organisms for this alignment are *Homo sapiens* (human), *Bos taurus* (bovine), *Xenopus tropicalis* (frog), *Danio rerio* (zebrafish), *Ciona intestinalis* (ciona), *Monosiga brevicollis* (monosiga), *Capsaspora owczarzaki* (capsaspora), and *Dictyostelium discoideum* (DdMF1 and DdMF2). (B and C) Equilibrium MT binding assays to measure the apparent binding affinity of the MF domains of DdMyo7 MF1 and MF2. (D–F) Equilibrium MT binding assays to measure the apparent binding affinity of the MF domains of HsMyo10 [whole MF domain, MyTH4 alone, Myo10 binding to subtilisin-treated MTs (S-MTs)]. (G) Fractional binding of Myo10 MF with different MyTH4 mutants (see Table 1) at 2 μM tubulin polymer.

existing binding sites or by creating new opportunities for the recruitment of partners.

Is the MT Binding Site Conserved Among MF Myosins? A shared property of MyTH4 domains is their ability to interact with MTs, suggesting that they bind via a highly conserved MT binding site. DdMyo7 has two MF domains and the N-terminal MF domain (DdMF1) has been shown to bind MTs (9). Sequence alignments show that the DdMF1 MyTH4 harbors a positively charged sequence similar to that of the MT binding site of Myo10 (27), suggesting that this might be a signature motif for MF domain binding to MTs (Fig. 3A). However, this motif is absent in the DdMF2 MyTH4 sequence, suggesting that this domain would not bind to MTs. The MT binding of DdMF1, DdMF2, and mammalian Myo10 MF domains purified from bacteria was compared directly to test this possibility. Equilibrium MT cosedimentation binding assays were performed for each MF domain (see Table 1 for summary). Similar to what had been found for DdMF1 purified from *Dictyostelium* cells (9), the bacterially expressed domain also bound MTs with a moderate apparent K_d ($1.7 \pm 0.48 \mu\text{M}$, $n = 3$) (Fig. 3B) that is weaker than that of the mammalian Myo10 MF domain and exhibits a lower fractional binding (0.24 vs. 0.91; Table 1). Unexpectedly, DdMF2 also bound MTs with a higher affinity (apparent $K_d = 0.47 \pm 0.09 \mu\text{M}$, $n = 4$, fractional binding 0.9; Table 1) than DdMF1 (Fig. 3C). The apparent affinity of DdMF2 is only slightly weaker than that of the mammalian Myo10 MF domain (apparent $K_d = 0.14 \pm 0.08 \mu\text{M}$, $n = 4$) (Fig. 3D), and MT binding by DdMyo7 is significant overall when one considers that the DdMyo7 tail has two tandem MF domains that can each bind to MTs and this myosin is likely able to dimerize, as are mammalian Myo10 and Myo7a (23, 25). These results are consistent with MT binding being a core, conserved property of all MyTH4 domains but reveals that this interaction can be mediated by distinct binding sites.

Characterization of the Myo10 MT Binding Site. The mammalian Myo10 MF domain binds to MTs via charged interactions with the C-terminal tails of tubulin (27). The tubulin C-terminal tail is an unstructured region of ~20 aa residues that points away from the MT lattice and is the most variable among tubulin isoforms due to both sequence variation and posttranslational modifications (31). Additionally, binding of the FERM domain of Myo10 to the cytoplasmic tail of the netrin receptor DCC was found to inhibit MT binding (27), suggesting that both the MyTH4 and FERM domain contribute to MT binding. However, the affinity of the MyTH4 domain alone for MTs is quite similar to that of the full MF domain (apparent $K_d = 0.24 \pm 0.09 \mu\text{M}$, $n = 3$) (Fig. 3E), indicating that MT binding is almost exclusively occurring via the MyTH4 domain in mammalian Myo10. To assess whether the main interaction of the Myo10 MF with MT requires the C-terminal tail of MTs, as previously proposed (27), cosedimentation experiments with subtilisin-treated MTs that lack the acidic C-terminal tubulin tails were carried out. Interestingly, although removal of the C-terminal tubulin tails did result in a reduction in MF binding (apparent $K_d = 4.98 \pm 1.13 \mu\text{M}$, $n = 2$) (Fig. 3F), their loss did not abolish MF binding completely, establishing that MT binding involves more than an interaction with the C-terminal tubulin tails. Similarly, mutation of two positive residues previously implicated in MT binding [K1647 and K1650 (27)] as well as the nearby R1643 substantially reduced but did not eliminate MT binding (mut#1; apparent $K_d = 6.35 \pm 3.53 \mu\text{M}$, $n = 3$) (Fig. 3G and Fig. S3A). Thus, additional residues of the Myo10 MyTH4 domain contribute to the interaction with MTs, binding to both the MT lattice and the exposed Cter tails.

Careful study of the surface of the Myo10 MyTH4 domain revealed additional positively charged and hydrophobic residues that could contribute to MT binding. A set of six mutants were generated and tested for MT binding (*Materials and Methods*), establishing that, besides the previously implicated residues (R1643, K1647, and K1650), three additional charged residues contribute to MT binding: K1654, R1657, and R1600 (Table 1 and Fig. S3B–E). The binding surface (MTB) is found to be extended and includes two regions with basic and hydrophobic residues (Fig. 4A): The first part corresponds to the originally described site (27) that includes several basic residues and a nonstrictly conserved tyrosine (Y1673) and the second part of the site involves R1600 and two nearby Pro residues. In fact, MT binding activity is drastically reduced only when both sites on this surface are mutated (see M10-mut #3 and #4; Fig. 3G and Fig. S3C and D). Interestingly, conservation of these surface residues among different Myo10 sequences, from the evolutionarily distant Choanoflagellate *Monosiga brevicollis* to human (Fig. 3A), suggests that the interaction with MTs [which is crucial in vertebrates for orienting the mitotic spindle by anchoring it to the cortex (11, 32)] is likely to be an ancient property of Myo10 myosins.

Characterization of the DdMyo7 MT Binding Sites. Candidate MT binding sites for both DdMF1 and DdMF2 were identified using a similar approach. First, the equivalent residues implicated in MT binding by Myo10 that are conserved in DdMF1, R1257, and K1261 (Fig. 3A) were mutated and assayed. Charge reversal of both residues did not affect binding of DdMF1 to MTs (mut#1; apparent $K_d = 1.96 \pm 0.31 \mu\text{M}$, $n = 3$) (Table 1), revealing that despite sequence conservation these basic residues of DdMF1 are not part of the MT binding site. In fact, these residues are not free to participate in MT binding in DdMF1, because they are involved in stabilization of the N-terminal extension, which differs greatly between the Myo10 and DdMF1 MyTH4 domains (Fig. S2A). The overall surface of the MT is negatively charged (Fig. S4A), although recognition via hydrophobic residues is also likely necessary for specificity. Analysis of the surface of the MyTH4 domain on the opposite side from the Myo10 MTB (Fig. 4A) revealed the presence of a cluster of exposed, positively charged, and hydrophobic residues that seemed to be good candidates to serve as an MT binding site. Mutation of four charged residues on this surface, K1157E, H1159E, K1161E, and

Table 1. MT binding affinities for Myo10 MF, DdMF1, and DdMF2

MF protein	Apparent K_d , μ M	SD	Frac bind*	n
HsMyo10				
MF	0.14	0.08	0.91	4
MyTH4	0.24	0.09	0.68	3
MF [†]	4.98	1.13	0.51	2
MF mut#1 R1643A, K1647A, K1650E	6.35	3.53	0.24	3
MF mut#5 P1546E, P1548E, R1600E	0.37	0.16	0.77	3
MF K1647D	0.66	0.16	0.71	2
MF mut#2 R1643A, K1647A, K1650E, K1654E, R1657E	16% of WT			4
MF mut#3 R1643A, K1647A, K1650E, P1546E, P1548E, R1600E	10% of WT			3
MF mut#4 R1643A, K1647A, K1650E, K1654E, R1657E, Y1673A	13% of WT			3
DdMyo7				
DdMF1 [‡]	1.70	0.05	0.25	1
DdMF1	1.76	0.48	0.24	3
DdMF1 mut#1 K1257E–K1261E	1.96	0.31	0.19	3
DdMF1 mut#2 K1157E, H1159E, K1161E, K1174E	15% of WT			2
DdMF2	0.47	0.09	0.9	4
DdMF2 [‡]	0.83	0.39	0.64	5
DdMF2 mut#1 K1896E, K1900E, K1909E, K1921E	4% of WT			2
DdMF2 mut#2 K1881E, R1882E, K1909E, K1912E, K1913E	No binding detected			3

*Frac bind is fractional binding at saturating concentrations of tubulin polymer; percent of binding is fraction bound at saturating tubulin (2 μ M for Myo10 MF and DdMF2 and 7 μ M for DdMF1) compared with the WT MF.

[†]Subtilisin-treated MT.

[‡]Purified from *Dictyostelium* cells (9).

K1174E, abolished almost all MT binding (Fig. 4B and Fig. S3F). The structure of this MF1 mutant #2 shows that the mutations do not affect the protein structure and only influence the MT binding surface (Fig. S1C), which might in fact be extended by three other basic residues found nearby K1145, K1147, and K1149 (Fig. 4B). These results reveal that the MyTH4 MT binding site is not generally conserved but that positively charged motifs with surface-exposed hydrophobic side chains found elsewhere in the myosin MyTH4 domain can serve as an MT binding site.

The DdMF2 MT binding interaction was characterized by first assessing its binding to subtilisin-treated MTs. In contrast to the substantial drop in binding that was observed with the Myo10 MF, DdMF2 binding to subtilisin-MTs was only modestly decreased (apparent $K_d = 0.84 \pm 0.39 \mu$ M, $n = 5$) (Table 1). Similar to DdMF1, the structure of DdMF2 allowed for the identification of surface-exposed charged residues that could serve as the MT binding site (Fig. 4C). A positively charged surface was found on the same face of the MyTH4 domain compared with the identified MT binding site of DdMF1 (Fig. S3I), opposite to that of Myo10. Two DdMF2 charge reversal mutants were tested for MT binding (mutant #1: K1896E, K1900E, K1909E, and K1912E; mutant #2: K1881E, R1882E, K1909E, K1912E, and K1913E). Both of these exhibited little or no binding to MTs (Fig. S3G and H). The structure of the MF2 mutant #2 shows that the mutations do not affect the protein structure and only influence the MT binding surface (Fig. S1D and Table S1). The central basic residues of these mutants, K1896, K1900, and K1912 (which are equivalent to the K1157, K1161, and K1174 residues important for MT binding in MF1) are likely important for mediating the MT binding of DdMF2. Note, however, that significant differences exist on this surface between DdMF1 and DdMF2 due to the variation in the Nter sequence as well as in the loops prior and after helix 1 (Fig. S3J). Because the contribution from the C-terminal tail of tubulin is not a major part of the interaction with DdMF2, it is likely that the interaction surface with the MT is extended and involves other residues of this MyTH4 surface composed of basic residues and few hydrophobic residues such as P1898, I1915, Y1928, and P1929 (Fig. 4C).

Conservation of the MT Binding Motifs Among Evolutionarily Distant MF Myosins. The MyTH4 domains thus bind to MTs using largely electrostatic interactions, although the exact interaction site

differs greatly in the surface involved and its topography and composition. It is of interest to note that whereas the surface of the MT is found to contribute to the binding for both Myo10 and DdMF2, interaction with the tubulin C-tail contribution is mostly important for Myo10 binding. This recognition could differentially target Myo10 to specific populations of MTs depending on

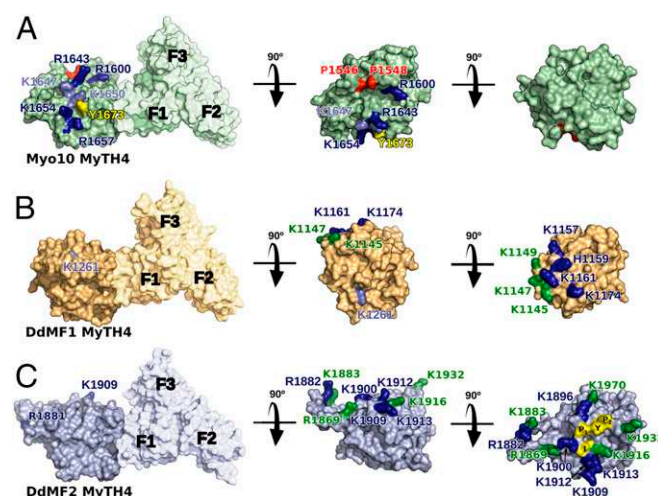


Fig. 4. The MT binding surfaces of distant MF myosins are distinct. (A) Surface representation of the MyTH4-FERM domain from human Myo10. The MT binding residues in the MyTH4 domains are highlighted using the same color code as in Fig. 3A. The central and right figures show the MyTH4 domain only. (B and C) Surface of the MyTH4 domain from DdMF1 (B) and DdMF2 (C). The sequence-predicted MT binding site (equivalent to that of Myo10) is shown in light blue with K1261. The MT binding residues identified by mutagenesis are shown in dark blue and the residues on this surface that likely participate in MT binding are in green (charged residues) and yellow (hydrophobic residues noted as P1 for P1898; I for I1915, Y for 1928, and P2 for P1929). Note that the MT binding site of the DdMF1 and DdMF2 are on the opposite surface compared with that of Myo10MF (light blue predicted residue).

the posttranslational modifications on their C-tail. The differences in the MT binding sequence between the three MyTH4 domains raises the question of how conserved these sequences are within a MF myosin class and when they emerged during evolution. Alignment of the MyTH4 domains of various myosins reveals that the Myo10 MT binding surface is well conserved in this myosin class from *Capsaspora*, a distant unicellular relative of Metazoa, to humans (Fig. 3A). Note that although the *Ciona* Myo10 MyTH4 has a Gln in place of the second Lys in the MT binding region this residue is not critical for MT binding based on the finding that mutation of this residue in Myo10 (K1647D) does not significantly affect MT binding (Table 1). Examination of the same region of other metazoan and fungal myosin MyTH4 domains reveals poorer conservation, consistent with the identified MT-binding site being specific for Myo10. Similarly, the MT-binding sequences for both DdMF1 and DdMF2 are highly conserved among the different social amoeba groups that are believed to have been evolving independently of Metazoa for over 600 million years (33). Thus, the MT binding properties of MyTH4 domains are a good example of convergent evolution.

Variability and Characteristic Features of the FERM Domains from Evolutionarily Distant Myosins. The FERM domains of MF myosin tails are a tripartite protein interaction module composed of the F1, F2, and F3 lobes, the same as the ERM and talin proteins. They mediate binding to a number of different partner proteins, including membrane receptors, and they are implicated in autoinhibition of motor activity (18, 20, 26, 34). Little is known about the features of the FERM domain that determine myosin autoinhibition, specificity of the interaction with several partners, and ability for these partners to bind cooperatively or to exclude each other on a particular myosin. A structure-based comparison of FERM sequences was carried out to reveal the characteristic properties of this domain that contribute to its function in myosin motors. Comparison of the structures of the four MF myosin FERM domains reveals conservation in the fold of the individual lobes of the myosin FERM domains as well as with other FERM domains (Fig. 1C). However, there is notable variability in the loops that connect the structural elements of each lobe (Fig. 5A and Fig. S5A). In addition, the lobes are arranged together to form the canonical cloverleaf configuration, in contrast to the elongated conformation found in talin (35) (Fig. 6). This analysis shows that several of the structural features that determine the formation of the cloverleaf are variable. Insertions are found on two different surfaces: On one side, important variations in the loops of all three lobes are found on the same surface as that where large insertions exist for the MyTH4 domains of Myo7a MF1 and Myo10 (Tables S3 and S4 and Fig. 5). Insertions are also found on the opposite side of the FERM domain, arising from variations in loops of the F1 and F2 subdomains as well as the F1-F2 linker. Structural differences are likely to correlate with diversification and specificity for partner binding and thus the special cellular functions of these myosins. We have thus analyzed whether functional roles, such as auto-regulation or binding to specific partners, can be associated with these differences.

Myosin activity must be tightly regulated in cells so that the motor is only active at the right place and at the right time. This control is especially crucial because a number of myosins are multifunctional and can bind to a variety of cargos (3). A prevalent mode of myosin regulation is via head–tail autoinhibition, although the exact molecular mechanism for this control is not well understood for many myosins. Because this is a commonly used mode of regulation it might be anticipated that the MF myosin FERM domains would have a conserved structural feature that plays a role in this regulation. Residues in the F3 S6.S7 loop of the fly Myo7a C-terminal FERM domain have been implicated in mediating head–tail autoinhibition of this myosin (26). Interestingly, sequence alignments reveal that these basic residues are in a conserved loop in several C-terminal MF2s (e.g., mammalian Myo7a and Myo7b, *Drosophila* Myo7a, as well

as representatives of both amoeboid Myo7 and Myo22 classes). Notably, this loop is longer in the mammalian Myo7 and DdMyo7 MF2s than in MF1s such as Myo7a MF1 or DdMF1 (Figs. S5A and S6 and Dataset S1). However, this region is not highly conserved in all C-terminal MF domains—the loop is missing in Myo10 MF and the Myo15 MF2 sequence is quite different and lacks the critical charged amino acids. The high degree of sequence conservation in this regulatory loop raises the question of whether this is an ancient feature of MF myosins. Alternatively, convergent evolution may have guided the ability to conserve motor/cargo interactions in these distant MF classes for a similar inhibitory autoregulation mechanism in the Myo7/Myo22 class, whereas different mechanisms of motor autoregulation might have developed for other classes in which inserts or deletions would not favor intramolecular interactions to occur via the F3-S6.S7 loop, as seems to be the case for Myo10 (Fig. S6). Further combined structural and functional studies of the MF myosin FERM domain and its role in regulation are needed to gain a full understanding of the underlying molecular mechanism of the intramolecular control of myosin function.

FERM domains bind to different partners and there are several distinct modes of FERM binding by partners mediated by the three-lobed cloverleaf structure (Fig. 5B and C and Table S5). Comparison of the binding between several different FERM domains and their partners, for which an atomic structure has been solved, reveals four major sites of interaction (Fig. 5). A well-characterized binding site is located in the groove between the S5 strand and H1 helix of the F3 lobe that is tuned for binding to partners such as the cytoplasmic tails of β -integrin and DCC (18, 34) (Fig. 5B, mode ①). The cytoplasmic tails of β -integrin also bind to the same site on the F3 lobe of talin (36). Interestingly, an insertion in the DdMF1 sequence changes the surface of F3, and recognition via this F3 lobe cannot occur as found for other MF lobes. This illustrates again how insertions in the MF sequence can lead to a loss of function. Another main binding site of interest is the central cavity between the three lobes of the FERM where Cen1 interacts with Myo7a MF1 and Heg1 with the KRIT FERM domain (Fig. 5B, mode ④). This binding site is more buried and its accessibility in each FERM is modulated by class-specific variations in all three lobes. Note in particular how differences in Myo10 (in the F3-H1 helix, the variable loops F1-S3, S4 and F1-H2.S5) as well as the presence of inserts in the F2-H2.H3 loop remodel the central peptide binding site (Fig. 5D).

Analysis and comparison of FERM domains highlights how the inserts and variable regions in the MF domains are crucial to the interaction with different partners. In addition to fine-tuning of the sequence in conserved binding sites for specific partner recognition, inserts introduced during evolution likely contribute to emergence of function by restricting or modulating the accessibility of certain binding modes. It remains to be seen whether such inserted sequences also represent new binding modes highly specific to a particular myosin class; their sequence conservation within a particular class would favor such a hypothesis (Tables S3 and S4).

Maintenance of the Cloverleaf Configuration over a Billion Years of Evolution. The myosin FERM domains have a cloverleaf organization typical of ERM proteins and several of the binding modes involve more than one lobe (Figs. 5 and 6). Maintenance of the overall orientation and organization of the three lobes into the cloverleaf is thus critical for these interactions. Comparison of the structures and sequences of different myosin FERM domains shows that the relative orientation of the lobes for each FERM domain is distinct, although general features are conserved between the different myosins and the ERM family member FERM domains (Fig. 1C and Fig. S5A). The amino acids that participate in maintaining the cloverleaf are not highly conserved, although they are similar in nature. In addition, connecting loops fine-tune the position and, likely, the dynamics of each subdomain. Controlled flexibility within the FERM lobes is critical to favor selective binding in the central region (Fig. 5B, mode ④)

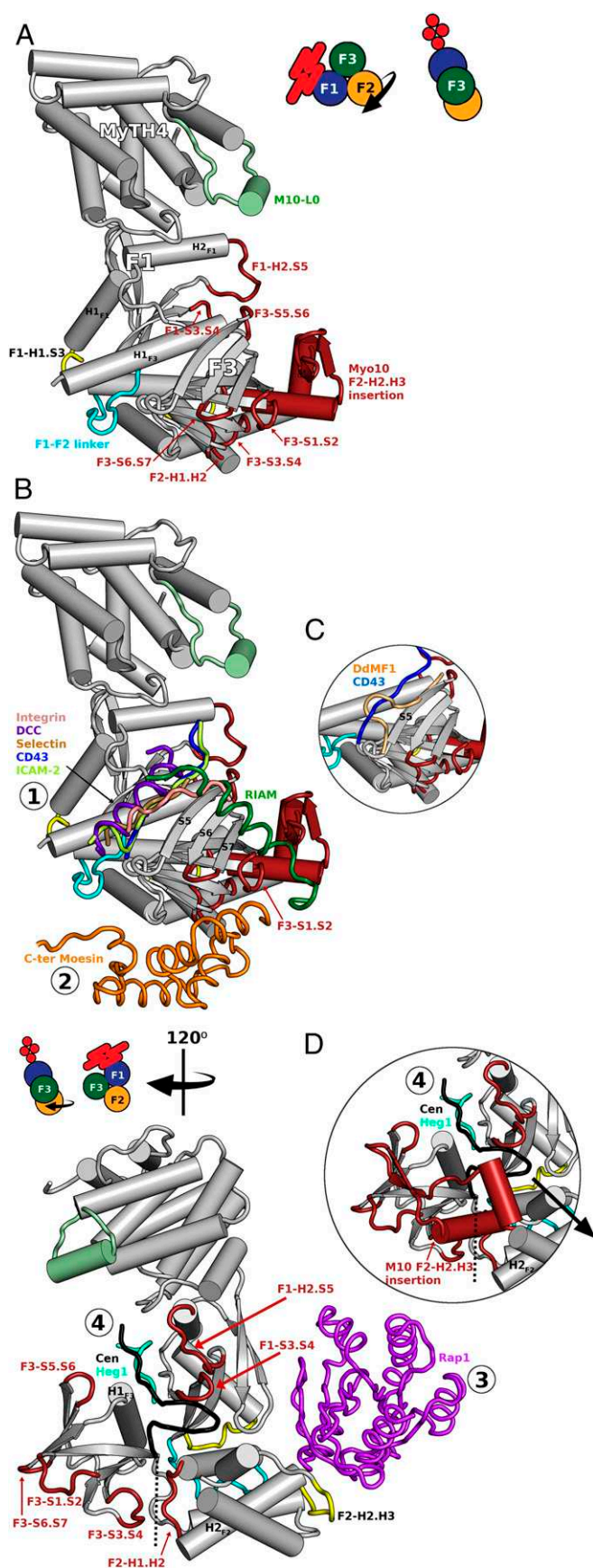


Fig. 5. Variability of the FERM domain. (A) Structural representation of the Myo10 MF domain with the conserved core of the MyTH4 and FERM lobes

or to binding sites that extend over two lobes such as that of Rap1 and the Cter of Moesin (37, 38) (Fig. 5B, modes ② and ③).

The cloverleaf configuration of the myosin FERM domains and ERM proteins contrasts with the distinct open conformation of the talin FERM domain (35) (Fig. 6). A change in the linker between the F1 and F2 lobes has a dramatic effect on the orientation of the two domains. In the case of talin, the linker adopts a different, hairpin-like, conformation and strongly interacts with the F2 subdomain, but it does not interact with the F1 lobe (compare Fig. 6B and C). Molecular dynamics simulations indicate that the talin FERM domain exhibits an increased flexibility, which results from enhanced interlobe rigid-body movements (Fig. 6D and Fig. S5B). In sharp contrast, the cloverleaf configuration of the myosin FERM domains (DdMF1 and DdMF2) seems to be stable on the simulation timescale. The reduced flexibility of the myosin FERM cloverleaf would favor the emergence of cooperative binding sites, promoting efficient recognition by binding partners. Thus, it seems that the lobes of myosin FERM domains have evolved to maintain their cloverleaf interactions, remarkably, even though rather large sequence variation is observed for the residues that mediate these interlobe interactions (Fig. S5A).

MF Domain Organization Is Critical for Selective and Simultaneous Binding of Partners for Each Cellular Role of a Myosin.

Dynamics of the FERM lobes is important for binding of peptides in the central cleft but the mobility must be restricted to favor efficient recognition of the binding sites by the partners, in particular when binding requires more than one lobe/domain. Although the MF myosins are multifunctional motors, restriction in the MF supramodule mobility could also favor selectivity in the assembly of several partners to the tail of these myosins. It can favor simultaneous binding of cargos for cotransport in cells while preventing other associations, such as binding to MTs, from occurring if partners are bound elsewhere. This concept of negative or positive cooperativity is illustrated in Fig. S4B and C. Although simultaneous MT and DCC binding is not possible for Myo10 (27), it is interesting to note that the DdMF2 MT binding site could be compatible with partner binding to the F3 lobe (mode ①). Note also that the orientation of the FERM domain upon recruitment by membrane-bound partners could restrict the availability of the surface that binds to MTs, and that these restrictions would be quite different in DdMyo7 compared with Myo10, which have their MT binding sites defined on opposite surfaces. Without strict orientation of the domain by the supramodule or restriction in lobe dynamics via the cloverleaf, such cooperation between binding sites would be lost. Interestingly, MF myosin tail evolution has kept these general features among

(gray) and the variable regions among FERM domains (in red, yellow, and cyan). Shown also is the Myo10 insert in the MyTH4 domain (green cylinder). The orientation (indicated schematically with cartoons on the right) was chosen to visualize the two opposite surfaces that show variability (red features on the same side as that of the M10-L0 MyTH4 insert, and yellow and blue on the opposite surface). A 120° view of this surface is shown in B (lower panel) to better visualize the opposite surface. (B) Representation of the MF domain (gray) in which the position of partners that have been cocrystallized with a FERM domain are shown (see Table S5). The four modes of binding to the FERM domain previously identified are indicated by ① through ④. Several partners have been shown to bind the C-terminal F3 lobe, most of them by extending the beta sheet near the S5 strand (mode ①). The interface between the three lobes (binding mode ④) is exploited by some partners, such as Cen1 and Heg1. The dashed line represents the rest of the CEN structure that is not modeled in the X-ray structure. (C) Note that the DdMF1 F3 structure is not compatible with the binding in mode ① due to a deformation of the S5 strand. (D) The extended cleft buried in between the three FERM lobes is drastically shortened at the interface between the F2-F3 lobes in Myo10 due to the specific F2-H2.H3 insertion (red). Note that steric hindrance would occur between this insertion and a peptide bound in the cleft, thus peptide binding in the cleft would require following a different path (black arrow).

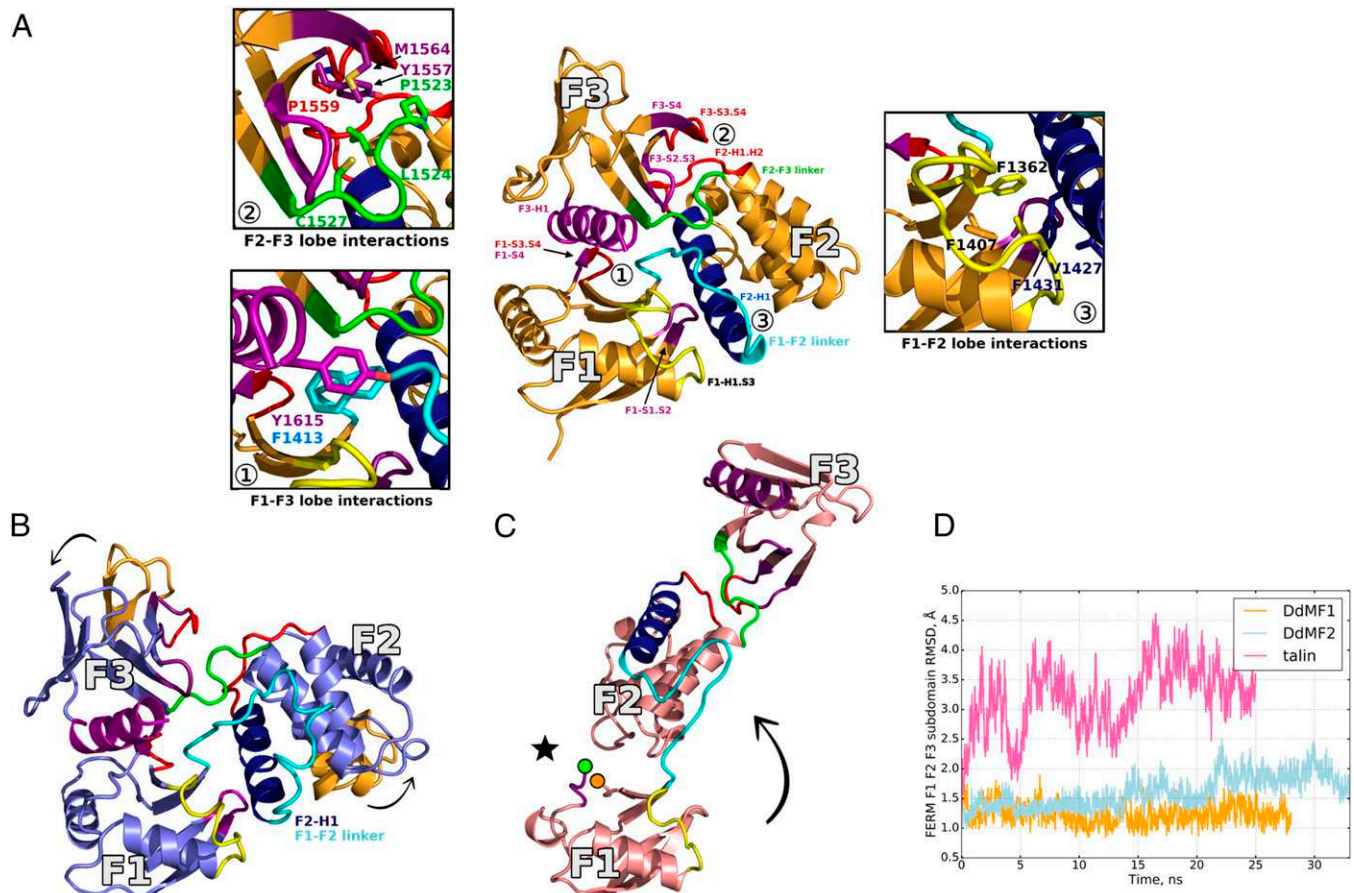


Fig. 6. Conservation of the FERM cloverleaf structure. (A) Major contacts between the lobes of the FERM domain. The cloverleaf configuration is stabilized by interlobe interactions as illustrated here on the DdMF1 structure (orange). The variable regions involved in these interactions are shown in red and yellow, except for the interlobe linkers shown in cyan (F1-F2) and green (F2-F3). Other less variable regions at the interface of the three lobes are shown in purple and blue (F2-H1 helix). The three major surfaces participating in the maintenance of the trilobe structure are shown in detail: The F1-F3 surface (①) is mainly maintained by hydrophobic interactions between the F1-S3-S4 loop, the F1-S4 strand and hydrophobic residues present in the F3-H1 surface; the F2-F3 surface (②) is formed by the F2-H1-H2 loop, the F2-F3 linker, and the F3-S2-S3 and F3-S3-S4 loops; and the F1-F2 interface (③) includes the F1-S1-S2 and F1-H1-S3 loops of the F1 lobe and the highly variable F1-F2 linker between these two lobes as well as the first helix (F2-H1) of the F2 lobe. (B) The DdMF2 structure is shown in purple, with the elements participating on the maintenance of the FERM structure highlighted using the same color code as in A. The F1 lobe is kept in the same position as in A, but note that the F2 and F3 lobes are displaced (black arrows, part of the DdMF1 lobes are shown in orange as a reference). The F1-F2 linker (cyan) is bigger in DdMF2, forcing the F2 lobe to rotate by $\sim 30^\circ$ (black arrows), and this also changes the position of the F3 lobe. (C) Structure of the Talin FERM domain (35). Note how talin adopts an extended conformation, rather than the canonical trilobe FERM structure. The F1 lobe is represented in the same orientation as in A and B, but the F2 lobe position differ (black arrow). Note the difference in the F1-F2 linker (blue) that interacts with the F2 lobe. The position of a large (31 residues) and flexible F1-S3-S4 linker (see Fig. S5) not modeled in the crystal structure is indicated with a black star (the beginning and the end of the linker is indicated with a green and an orange dot, respectively). (D) Conformational dynamics of the FERM domain from molecular dynamics simulations. The plot shows the rmsd from the crystal structure of the backbone atoms of FERM lobes F1, F2, and F3 for DdMF1 (orange), DdMF2 (light blue), and talin (pink). The rmsd time series show that the cloverleaf organization of the myosin FERM is stable, whereas the talin FERM domain undergoes significantly higher fluctuations.

classes without strict conservation of the sequences involved, allowing not only the conservation of the general dynamic properties of the MF supramodule but also its adaptation to increase emergence of new functions. This indeed illustrates how, upon gene duplication and evolution, distinct MF classes can acquire new functionalities. The restriction in the dynamics of the supramodule along with the variability on the surface of the MF domain can lead to drastic change in the location of the surface involved in a functionality, and this can lead to new combinations/restrictions for simultaneous partner binding and thus new cellular roles for these myosins.

Conclusion

The myosin MF domain has maintained a high degree of structural similarity over the 600 million years of independent evolution between Metazoa and Amoebozoa. Structural analysis reveals that for both human and Dicty myosin MF domains the

MyTH4 and FERM domains form a supramodule and their FERM subdomains are organized in a cloverleaf configuration. Class-specific sequence variations allow for both changes in the accessible surface and modification of the dynamics between different subdomains that, in concert, determine the specificity for binding partners. Contrary to what one might have expected, the results presented here highlight how conservation of function may not require a strict conservation of a sequence motif involved in protein recognition. Interactions of similar nature between the myosin MyTH4 domains and the MT can be established with different surfaces of the same domain in evolutionarily distant MF myosins. In the case of MyTH4 binding to MTs, keeping a generally basic surface with some hydrophobic residues that can interact with the acidic C-terminal tail as well as with the surface of the MT is an important general feature. This corresponds to a mechanism of gain/loss of function via sequence motifs on different surfaces that have conserved features/properties. Furthermore, conserved residues that are part of a motif that can be

identified in a sequence alignment may, in fact, not be able to play their role in the context of different MyTH4 domains due to inserted sequences that result in major surface remodeling (Fig. 2 and Fig. S24). The high degree of conservation of this activity throughout evolution suggests that it is an important feature of MyTH4 proteins in general and, in particular, MF myosin functions. Much remains to be discovered about the different modes of interaction between MyTH4-MTs and the functional importance of this interaction that potentially cross-links and allows force production between the two main cytoskeleton tracks in eukaryotic cells.

One of the most intriguing aspects of MF domains is the high degree of conservation of the supramodule and the cloverleaf configuration that controls the rotational freedom of the MyTH4 and the three lobes of the FERM domain. The MyTH4 and FERM domains can exist stably apart from each other, suggesting that the supramodule does not simply have a structural role but rather a functional role in restraining the movement between the subdomains. The control and tuning of the dynamics of the MF supramodule ensures efficient cooperative or exclusive binding of partners on different sites of this supramodule. This likely determines the assembly of an MF-partner complex that together defines a particular role for this group of multifunctional motors. Structural studies of myosin MF domains in combination with functional data are needed to uncover the principles encoded in a sequence that allow a particular myosin to play similar roles in different organisms.

The multifunctional myosin tails are particularly interesting because they interact with different partners as well as having critical roles in regulating myosin activity. MF domains bind to the cytoplasmic tails of signaling receptors and adhesion receptors and interact with adapter proteins (18, 20, 21, 34) and contribute to autoinhibition (26). Maintaining the motor in an off-state is crucial for all myosins, preventing the needless hydrolysis of ATP and keeping a pool of the motor protein readily available for cargo binding. Activation occurs by binding of specific partners that may be localized or made available in response to cellular signals. The MF myosin tails exemplify these features of myosin function. Interactions with new partners that could change myosin function undoubtedly arose through the evolution of the MF domain. In contrast, other features have been maintained because they provide a core function for an entire group of myosins, as is exemplified by the maintenance of the highly conserved autoinhibition loop in the F3 lobe of the FERM domain seen in the Myo7, Myo22, and amoeboid Myo7 MF2 domains. In the case of the MF myosins, one particular mechanism emerged early on and has been maintained throughout evolution.

Materials and Methods

Construct Design. Bacterial expression clones for WT and mutant C-terminally His-tagged DdMF1 (residues 1119–1620), DdMF2 (residues 1835–2357), the MyTH4-FERM cassette (residues 1501–2058), or MyTH4 domain alone (of human Myo10 gene, residues 1871–1906) were generated as described in *SI Materials and Methods*. The previously described pDTi225 plasmid (9) was used to express DdMF1 in *Dictyostelium*.

Protein Expression, Purification, and Crystallization. His-tagged proteins were purified using His-trap columns followed by gel filtration on a Sephadex 200-16/60 column. Crystals of the DdMF1 construct (9.3 mg/mL) were obtained by hanging drop vapor diffusion at 290 K in 18% (wt/vol) PEG 8000 and 0.1 M MES, pH 6.0. Crystals of the bacterially expressed DdMF1 mutant #2 were obtained in 10% (wt/vol) PEG 20K, 20% (wt/vol) PEG 550 MME, 0.1M Mops, pH 7.5, 0.1 M Hepes, pH 7.5, 20 mM DL-alanine, 20 mM DL-glutamic acid, 20 mM glycine, 20 mM DL-lysine HCl, and 20 mM DL-serine using a protein solution at 11 mg/mL. DdMF2 native crystals appeared using a 13 mg/mL protein mixed with 18% (wt/vol) PEG 1500 and 0.1 M MMT (DL-malic Acid,

MES, and Tris, pH 8.0). The selenomethionine derivative crystals were obtained in 13% (wt/vol) PEG 1500 and 0.1 M MMT, pH 8.0, using a protein solution at the same concentration as for the native crystals. Finally, the DdMF2 mutant #1 crystallized by mixing a 13 mg/mL protein solution with 11.9% (wt/vol) PEG 3350 and 0.1M Bis-Tris propane pH 7.5). More detail in the protein separation, crystallization and structural determination can be found in *SI Materials and Methods*.

Equilibrium MT Coseedimentation Assays. Coseedimentation assays were performed as described (9). Reaction mixes included either 2 μ M MF protein or 2.5 μ M of DdMyo7 MF1 domain with increasing concentrations of MTs in 20 mM Pipes, pH 6.9, 1 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 40 μ M taxol, and 1 mM GTP. Equal volumes of supernatant and pellet samples were subjected to SDS/PAGE on either a 10% SDS/PAGE gel or an 8% Bis-Tris gel (Invitrogen) followed by staining with Coomassie Brilliant Blue G-250. The resulting gel was scanned and then quantified using the Analyze Gel module in Fiji (39). The data were plotted as the fraction of MF or DdMyo7 MF1 domain that partitioned to the pellet as a function of increasing MT concentration using KaleidaGraph (Synergy). The following quadratic equation was fit to the data:

$$\frac{\text{MF} \cdot \text{MT}}{\text{MF}_0} = a \left[\frac{\left(1 + \frac{\text{MT}_0}{\text{MF}_0} + \frac{K_d}{\text{MF}_0} \right) - \sqrt{\left(1 + \frac{\text{MT}_0}{\text{MF}_0} + \frac{K_d}{\text{MF}_0} \right)^2 - 4 \left(1 \right) \left(\frac{\text{MT}_0}{\text{MF}_0} \right)}}{2 \left(1 \right)} \right]$$

where MF-MT/MF₀ is the fraction of total micromolar MF that partitions to the MT pellet, MF₀ is the total micromolar MF, MT₀ is the total tubulin polymer in the assay, and K_d is the apparent dissociation constant. The normalization factor *a* takes into account the fraction of MF₀ that partitions to the MT at saturation binding and therefore represents the fraction of the population that is competent to bind MTs. The low fractional binding for DdMF1 (Fig. 3B) is hypothesized to be due to a slow equilibrium of DdMF1 in solution that generates a population that is competent to bind MTs relatively tightly and a population whose conformation cannot. The observation that there is not a significant amount of DdMF1 that partitions to the pellet in the absence of MTs, as would be expected for degraded protein, supports this interpretation.

Structure and Sequence Analysis. The sequence alignment of the MyTH4 and FERM domains were carried out using the MUSCLE multiple sequence alignment program (40) or online using PROMALS 3D (41) with the human Myo10 MF (PDB ID code 3AU5) and Myo7A MF-SH3 (PDB ID code 3PVL) domains as input structures. All MF myosin sequences used in the alignment are available from CyMoBase (www.cymobase.org/cymobase) (5). Representative sequences from the Amoebozoa, SAR, and Opisthokont (from Fungi to Metazoa) branches of the evolutionary tree were used for the alignments. All structural figures were prepared by PyMOL (www.pymol.org). Methods for the molecular dynamics simulations can be found in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Pierre Legrand and Andrew Thompson and beamline scientists of PROXIMA1 and PROXIMA2 (SOLEIL synchrotron) for excellent support during data collection; Dr. Holly Goodson (University of Notre Dame), Dr. Daniel Picot, Dr. Isabelle Callebaut, and Karl Petersen for comments on the manuscript; and Karl Petersen for assistance with the alignments. This work was supported by NIH Grant R37 GM054141 (to S.P.G.) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (M.C.). This project was granted access to the high-performance computing resources of Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur under Allocation 2015076644 made by Grand Équipement National de Calcul Intensif. A.H. was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, ANR-13-BSV8-0019-01, FRM, Ligue Nationale Contre le Cancer, and Association pour la Recherche sur le Cancer Subvention Fixe. The A.H. team is part of Labex CelTisPhyBio 11-LBX-0038, which is part of the Initiative d'Excellence at PSL Research University (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL). M.A.T. was supported by National Science Foundation Grants MCB-0923743 and MCB-1244235.

- Jacob F (1977) Evolution and tinkering. *Science* 196(4295):1161–1166.
- Sweeney HL, Houdusse A (2010) Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys* 39:539–557.
- Hartman MA, Finan D, Sivaramakrishnan S, Spudis JA (2011) Principles of unconventional myosin function and targeting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:133–155.
- Pylypenko O, et al. (2013) Structural basis of myosin V Rab GTPase-dependent cargo recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(51):20443–20448.

- Odrionitz F, Kollmar M (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* 8(9):R196.
- Sebé-Pedrós A, Grau-Bové X, Richards TA, Ruiz-Trillo I (2014) Evolution and classification of myosins, a pan-eukaryotic whole-genome approach. *Genome Biol Evol* 6(2):290–305.
- Berg JS, Cheney RE (2002) Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intracellular motility. *Nat Cell Biol* 4(3):246–250.

8. Tuxworth RI, et al. (2001) A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr Biol* 11(5):318–329.
9. Moen RJ, Johnsrud DO, Thomas DD, Titus MA (2011) Characterization of a myosin VII MYTH/ERM domain. *J Mol Biol* 413(1):17–23.
10. Weber KL, Sokac AM, Berg JS, Cheney RE, Bement WM (2004) A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature* 431(7006):325–329.
11. Woolner S, O'Brien LL, Wiese C, Bement WM (2008) Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J Cell Biol* 182(1):77–88.
12. Bohil AB, Robertson BW, Cheney RE (2006) Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(33):12411–12416.
13. Kerber ML, Cheney RE (2011) Myosin-X: A MYTH-ERM myosin at the tips of filopodia. *J Cell Sci* 124(Pt 22):3733–3741.
14. Belyantseva IA, et al. (2005) Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat Cell Biol* 7(2):148–156.
15. Crawley SW, et al. (2014) Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* 157(2):433–446.
16. El-Amraoui A, Petit C (2005) Usher I syndrome: Unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J Cell Sci* 118(Pt 20):4593–4603.
17. Probst FJ, et al. (1998) Correction of deafness in *shaker-2* mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* 280(5368):1444–1447.
18. Zhang H, et al. (2004) Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 6(6):523–531.
19. Liu KC, Jacobs DT, Dunn BD, Fanning AS, Cheney RE (2012) Myosin-X functions in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 23(9):1675–1687.
20. Liu R, et al. (2008) *Sisyphus*, the *Drosophila* myosin XV homolog, traffics within filopodia transporting key sensory and adhesion cargos. *Development* 135(1):53–63.
21. Boëda B, et al. (2002) Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J* 21(24):6689–6699.
22. Pi X, et al. (2007) Sequential roles for myosin-X in BMP6-dependent filopodial extension, migration, and activation of BMP receptors. *J Cell Biol* 179(7):1569–1582.
23. Sakai T, et al. (2015) Structure and regulation of the movement of human myosin VIIA. *J Biol Chem* 290(28):17587–17598.
24. Umeki N, et al. (2009) The tail binds to the head-neck domain, inhibiting ATPase activity of myosin VIIA. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(21):8483–8488.
25. Umeki N, et al. (2011) Phospholipid-dependent regulation of the motor activity of myosin X. *Nat Struct Mol Biol* 18(7):783–788.
26. Yang Y, et al. (2009) A FERM domain autoregulates *Drosophila* myosin 7a activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(11):4189–4194.
27. Hirano Y, et al. (2011) Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MYTH4-FERM domain. *EMBO J* 30(13):2734–2747.
28. Narasimulu SB, Reddy AS (1998) Characterization of microtubule binding domains in the *Arabidopsis* kinesin-like calmodulin binding protein. *Plant Cell* 10(6):957–965.
29. Wei Z, Yan J, Lu Q, Pan L, Zhang M (2011) Cargo recognition mechanism of myosin X revealed by the structure of its tail MYTH4-FERM tandem in complex with the DCC P3 domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(9):3572–3577.
30. Wu L, Pan L, Wei Z, Zhang M (2011) Structure of MYTH4-FERM domains in myosin VIIa tail bound to cargo. *Science* 331(6018):757–760.
31. Janke C (2014) The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* 206(4):461–472.
32. Kwon M, Bagonis M, Danuser G, Pellman D (2015) Direct microtubule-binding by Myosin-10 orients centrosomes toward retraction fibers and subcortical actin clouds. *Dev Cell* 34(3):323–337.
33. Heide AJ, et al. (2011) Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication. *Genome Res* 21(11):1882–1891.
34. Zhu XJ, et al. (2007) Myosin X regulates netrin receptors and functions in axonal path-finding. *Nat Cell Biol* 9(2):184–192.
35. Elliott PR, et al. (2010) The structure of the talin head reveals a novel extended conformation of the FERM domain. *Structure* 18(10):1289–1299.
36. García-Alvarez B, et al. (2003) Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* 11(1):49–58.
37. Li X, et al. (2012) Structural basis for small G protein effector interaction of Ras-related protein 1 (Rap1) and adaptor protein Krev interaction trapped 1 (KRIT1). *J Biol Chem* 287(26):22317–22327.
38. Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA (2000) Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101(3):259–270.
39. Schindelin J, et al. (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676–682.
40. Edgar RC (2004) MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113.
41. Pei J, Kim BH, Grishin NV (2008) PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res* 36(7):2295–2300.
42. Titus MA (1999) A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr Biol* 9(22):1297–1303.
43. Gilbert SP, Johnson KA (1993) Expression, purification, and characterization of the *Drosophila* kinesin motor domain produced in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32(17):4677–4684.
44. Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 2):125–132.
45. McCoy AJ, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst* 40(Pt 4):658–674.
46. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31(13):3381–3385.
47. Langer G, Cohen SX, Lamzin VS, Perrakis A (2008) Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat Protoc* 3(7):1171–1179.
48. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 4):486–501.
49. Afonine PV, et al. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68(Pt 4):352–367.
50. Terwilliger TC, et al. (2009) Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: The PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65(Pt 6):582–601.
51. Bricogne G, et al. (2011) BUSTER version 2.10.1 (Global Phasing Ltd, Cambridge, UK).
52. Cowtan K (2006) The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62(Pt 9):1002–1011.
53. Fiser A, Sali A (2003) Modeller: Generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* 374:461–491.
54. Davis IW, et al. (2007) MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W375–383.
55. MacKerell AD, et al. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B* 102(18):3586–3616.
56. Bashford D, Karplus M (1991) Multiple-site titration curves of proteins: An analysis of exact and approximate methods for their calculation. *J Phys Chem* 95:9556–9561.
57. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10037–10041.
58. Kiseritzky G, Knapp EW (2008) Optimizing pKa computation in proteins with pH adapted conformations. *Proteins* 71(3):1335–1348.
59. Rabenstein B, Knapp EW (2001) Calculated pH-dependent population and protonation of carbon-monooxygen-myoglobin conformers. *Biophys J* 80(3):1141–1150.
60. Mackerell AD, Jr, Feig M, Brooks CL, 3rd (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 25(11):1400–1415.
61. Phillips JC, et al. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26(16):1781–1802.
62. Durell SR, Brooks BR, Ben-Naim A (1994) Solvent-induced forces between two hydrophilic groups. *J Chem Phys* 98(8):2198–2202.
63. Luo Y, Roux B (2010) Simulation of osmotic pressure in concentrated aqueous salt solutions. *J Phys Chem Lett* 1(1):183–189.
64. Tuckerman M, Berne BJ, Martyna GJ (1992) Reversible multiple time scale molecular dynamics. *J Chem Phys* 97:1990.
65. Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJ (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys* 23(3):327–341.
66. Berendsen HJ, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81:3684–3690.
67. Fiorin G, Klein ML (2013) Using collective variables to drive molecular dynamics simulations. *Mol Phys* 111(22–23):3345–3362.
68. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1):33–38, 27–28.
69. Seeber M, Cecchini M, Rao F, Settanni G, Caflisch A (2007) Wordom: A program for efficient analysis of molecular dynamics simulations. *Bioinformatics* 23(19):2625–2627.
70. Seeber M, et al. (2011) Wordom: A user-friendly program for the analysis of molecular structures, trajectories, and free energy surfaces. *J Comput Chem* 32(6):1183–1194.
71. Perez F, Granger BE (2007) IPython: A system for interactive scientific computing. *Comput Sci Eng* 9:21–29.
72. Hunter JD (2007) Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput Sci Eng* 9:90–95.
73. Takai Y, Kitano K, Terawaki S, Maesaki R, Hakoshima T (2008) Structural basis of the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD43 and its binding to ERM proteins. *J Mol Biol* 381(3):634–644.
74. Mori T, et al. (2008) Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins. *J Biol Chem* 283(43):29602–29612.
75. Mori T, Gotoh S, Shirakawa M, Hakoshima T (2014) Structural basis of DDB1-and-Cullin 4-associated Factor 1 (DCAF1) recognition by merlin/NF2 and its implication in tumorigenesis by CD44-mediated inhibition of merlin suppression of DCAF1 function. *Genes Cells* 19(8):603–619.
76. Li Y, Wei Z, Zhang J, Yang Z, Zhang M (2014) Structural basis of the binding of Merlin FERM domain to the E3 ubiquitin ligase substrate adaptor DCAF1. *J Biol Chem* 289(21):14674–14681.
77. Hamada K, et al. (2003) Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *EMBO J* 22(3):502–514.
78. Stiegler AL, Zhang R, Liu W, Boggon TJ (2014) Structural determinants for binding of sorting nexin 17 (SNX17) to the cytoplasmic adaptor protein Krev interaction trapped 1 (KRIT1). *J Biol Chem* 289(36):25362–25373.
79. Terawaki S, Kitano K, Hakoshima T (2007) Structural basis for type II membrane protein binding by ERM proteins revealed by the radixin-neutral endopeptidase 24.11 (NEP) complex. *J Biol Chem* 282(27):19854–19862.
80. Yang J, et al. (2014) Conformational activation of talin by RIAM triggers integrin-mediated cell adhesion. *Nat Commun* 5:5880.
81. Ghai R, et al. (2013) Structural basis for endosomal trafficking of diverse transmembrane cargos by PX-FERM proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(8):E643–E652.
82. Gingras AR, Liu JJ, Ginsberg MH (2012) Structural basis of the junctional anchorage of the cerebral cavernous malformations complex. *J Cell Biol* 199(1):39–48.
83. Alushin GM, et al. (2014) High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in α -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157(5):1117–1129.

Supporting Information

Planelles-Herrero et al. 10.1073/pnas.1600736113

SI Materials and Methods

Construct Design. The regions of the *Dictyostelium* Myo7 gene (GenBank accession no. L35321.2) encoding either the DdMF1 (1119–1620) or DdMF2 (1835–2357) domains were PCR cloned (Strataclone; Agilent) using a full-length genomic clone as a template (42). The regions were then cloned into a pET-23 plasmid (Novagen/EMD Millipore) for expression in *Escherichia coli*. The resulting plasmids encode the MF domain followed by a 6xHis tag at the C terminus. DNA fragments encoding the MyTH4-FERM cassette (residues 1501–2058) of human Myo10 gene (GenBank accession no. NP_036466) were amplified by PCR and cloned into a modified pET-14 plasmid (Novagen/EMD Millipore) that lacks the thrombin cleavage site. As previously described (29), 36 residues were deleted from the FERM domain to avoid protein degradation (Myo10MF: residues 1871–1906). The truncated Myo10-MyTH4 construct (Myo10MyTH4: residues 1501–1699) was generated by inverse PCR. The resulting plasmids encode an N-terminal 6xHis tag followed by an SSG linker then the protein of interest. Mutations eliminating positively charged or nearby surface residues, mutated by themselves or in combination with charge reversal mutations of the MT binding residues, were introduced either using the Quickchange (Agilent) or Q5 Mutagenesis (New England Biolabs) systems per manufacturer's instructions. The sequences of all PCR generated or mutated clones were verified.

Protein Expression and Purification. The previously described DdMyo7 MF1 domain [amino acids 1085–1620 (9)] was either purified from *E. coli* (discussed below) or from *D. discoideum* cells using a modified protocol. The *Dictyostelium* expressed S1-MF1 fusion was released from a cytoskeletal fraction with 10 mM MgATP and then digested with tobacco etch virus protease. MF1 was purified from the total digest by FPLC (GE Healthcare) by ion exchange chromatography on a CM-650 column and the MF1 eluted using a linear 20–200 mM NaCl gradient. MF1-containing peak fractions were identified by SDS/PAGE, pooled, dialyzed into 50 mM NaCl, 25 mM Hepes, pH 7.5, and 0.1 mM DTT, and concentrated by ultrafiltration using a 30,000 molecular weight cutoff membrane (Amicon), and then small aliquots were snap-frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C.

All other human and *Dictyostelium* MF domains were expressed in *E. coli*. Expression of the fusion proteins was carried out in *E. coli* BL21-AI (Invitrogen) or *E. coli* BL21 (DE3) Gold (Agilent) in 2× YT medium at 20 °C and induced by the addition of 0.2% L-arabinose or 0.2 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, respectively. Selenomethionine derivatives were prepared using *E. coli* 834 (DE3) and SelenoMet medium from Molecular Dimensions. The cells were collected by centrifugation, and the pellets were frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C. On the day of purification, the frozen pellets were thawed rapidly and then lysed using a Broyeur TS cell disruptor (Celdd). Following centrifugation the supernatant was applied to a Histrap column (GE Healthcare) and the His-fused proteins eluted with 300 mM imidazole. The resulting peak of MF protein was pooled, dialyzed into 80 mM Pipes, pH 6.8, 40 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, and 1 mM EGTA then concentrated and further purified by gel filtration on a Sephadex 200-16/60 column in the same buffer. The final pool was clarified by centrifugation, concentrated, and stored in small aliquots at –80 °C.

Taxol-stabilized MTs were polymerized from purified bovine brain tubulin (43). Tubulin was cold-depolymerized, clarified, and

polymerized with 1 mM MgGTP at 37 °C, followed by MT stabilization with 40 μM taxol.

Crystallization, Data Collection, and Structure Determination. The DdMF1 construct was crystallized using the hanging drop vapor diffusion method at 290 K by mixing 1 μL of 9.3 mg/mL protein solution with 1 μL of reservoir solution [18% (wt/vol) PEG 8000 and 0.1M MES, pH 6.0]. The crystals appeared overnight and were subsequently optimized using the microseeding technique and cryocooled in liquid nitrogen in a final solution containing 18% (wt/vol) PEG 8000, 0.1 M MES, pH 6.0, and 25% (wt/vol) PEG 400. Crystals of the bacterially expressed K1157E, H1159E, K1161E, and K1174E DdMF1 mutant were grown by mixing 1 μL of 11 mg/mL protein solution with 1 μL of reservoir solution [10% (wt/vol) PEG 20,000, 20% (wt/vol) PEG 550 MME, 0.1 M Mops, pH 7.5, 0.1 M Hepes, pH 7.5, 20 mM DL-alanine, 20 mM DL-glutamic acid, 20 mM glycine, 20 mM DL-lysine HCl, and 20 mM DL-serine]. Crystals were flash-frozen in the crystallization condition. Crystals of DdMF2 were obtained using the same technique. For the native form of the protein, the crystals appeared using a 13 mg/mL protein solution mixed with a reservoir solution containing 18% (wt/vol) PEG 1,500 and 0.1 M MMT (DL-malic Acid, MES, and Tris, pH 8.0). Crystals grew spontaneously as plates and were cryocooled in liquid nitrogen in 22% (wt/vol) PEG 1,500, 0.1 M MMT, pH 8.0, and 20% ethylene glycol. The selenomethionine derivative protein was crystallized in 13% (wt/vol) PEG 1,500 and 0.1 M MMT, pH 8.0, using a protein solution at the same concentration as for the native crystals. Finally, crystals of the DdMF2 K1881E, R1882E, K1909E, K1912E, and K1913E mutant were obtained by mixing a 13 mg/mL protein solution with a reservoir solution containing 11.9% (wt/vol) PEG 3,350 and 0.1 M Bis-Tris propane, pH 7.5. The crystals appeared overnight and were subsequently optimized using the microseeding technique and cryocooled in liquid nitrogen in a final solution containing 12% (wt/vol) PEG 8,000, 0.1 M MES, pH 6.0, and 25% (wt/vol) PEG 400.

X-ray datasets were collected at the Proxima 1 and Proxima 2 beamlines (SOLEIL Synchrotron). The diffraction datasets were indexed and scaled with XDS (44). The DdMF1 model was solved by molecular replacement with Phaser (45) using a homology model based on mouse Myo7 MF1 (3PVL) built using SwissModel (46). Model editing and refinement was carried out with ARP/wARP (47), Coot (48), and phenix.refine (49). The model of the DdMF1 K1157E, H1159E, K1161E, and K1174E mutant was solved using the structure of DdMF1 WT as a search model for molecular replacement. No molecular replacement solutions were found for the DdMF2 dataset using the MyTH4-FERM published structures, neither using the full structure nor the different domains separately. Phases were calculated by the single-wavelength anomalous dispersion method using the selenomethionine derivative crystals and collecting the data at the peak wavelength of selenium. Seventeen Se sites were found by the PHENIX AutoSol wizard (50). The model generated was refined with autoBUSTER (51) and used as a search model for molecular replacement with the native data. The model was subsequently edited and refined with Coot and autoBUSTER, respectively. Loop building was carried out using buccaneer (52) and ARP/wARP. The model of the DdMF2 K1181E, R1882E, K1909E, K1912E, and K1913E mutant was solved using the structure of DdMF2 WT as a search model for molecular replacement. Statistics on the data collection for the all of the

structures and crystallographic statistics of the final models are summarized in Table S1.

Molecular Dynamics Simulations. Simulations were carried out for DdMF1 (28 ns), DdMF2 (33 ns), and talin F0-F1-F2-F3 module (31VF, 25 ns). Missing loops in the crystal structures were built using the MODELER program (53). All models were submitted to the Molprobiy server to optimize the sidechain flips (54). Hydrogens were added using the hbuild tool of the CHARMM program [version 38b1 (55)]. The most likely protonation states at pH 7 for histidine residues were determined using a multisite titration approach (56). The solvent and protein interior were modeled as continuums with respective dielectric constants of 4.0 and 80.0. A Boltzmann-distributed charge density, corresponding to 150 mM of NaCl at 300 K, was added to model ions in solution. Numerical resolution of the Poisson–Boltzmann equation was done using the Adaptive Poisson–Boltzmann Solver (APBS) (57), through tAPBS (agknapp.chemie.fu-berlin.de/karlsberg). Finally, the protonation probabilities were obtained by Monte Carlo optimization via the Karlsberg2 program (58, 59). All of the other titratable residues were assumed to be in their standard state. Molecular dynamics simulations were run using the CHARMM36 force field (60) with the highly scalable package NAMD 2.10 (61). Short-range nonbonded interactions were truncated using a cutoff of 12 Å and a force-switching function starting at 10 Å. Periodic boundary conditions were applied and the long-range electrostatics was treated by the particle mesh Ewald method with a grid spacing of 1 Å and a sixth-order B-spline charge interpolation scheme. Each structure was first solvated in an orthorhombic box of TIP3P water molecules (62). Na⁺ and Cl[−] ions [with the Roux and coworkers parameters (63)] were added so as to ensure the electroneutrality of the system and reach a physiological concentration of 150 mM of salt.

After 5,000 steps of energy minimization, each system was progressively heated by random velocity reassignment from 0 to 300 K during 600 ps while imposing harmonic restraints on the backbone atoms with a force constant of with 10 kcal·mol^{−1}·Å^{−2}. Restraints were not applied on the reconstructed loops to permit full structural relaxation. Heating was followed by a 2-ns equilibration run at constant temperature (300 K) and pressure (1 atm) in which the restraints were gently decreased to zero. Production runs of ~30 ns at the same constant temperature and volume were then carried out.

All molecular dynamics runs use the r-RESPA multiple timestep algorithm with a 2-fs timestep for bonded and short-range nonbonded forces and a 4-fs timestep for long-range electrostatics (64). The SHAKE algorithm was used to constrain the length of covalent bonds involving hydrogen atoms (65).

Temperature control at 300 K for equilibration and production was ensured using a Langevin thermostat (friction constant 1/ps for equilibration and 0.1/ps for production). Pressure control at 1 atm was achieved using a Berendsen barostat (66), in which the system is weakly coupled to a bath with a 400-fs time constant and

the compressibility of liquid water 4.57×10^{-5} /bar. During production dynamics, the orientation of the protein was restrained using an external harmonic potential on the orientation quaternion with a force constant of 1,000 kcal/mol (67). This allowed the use of an anisotropic box by cancelling the overall rotation of the protein, which effectively reduced the total number of water molecules in the system increasing the computational efficiency. Trajectory analysis was done with VMD (68) and Wordom (69, 70), along with ipython (71) and matplotlib (72).

SI Alignment

A structure-based alignment of MF domains from a range of phylogenetically diverse organisms illustrating class-specific insertions in the MyTH4 and FERM domains (see Tables S3–S5). Alignments were made using PROMALS 3D (41) with the human Myo10 and mouse Myo7a MF1 structures (PDB ID codes 3AU5 and 3PVL, respectively) as references. Full-length MF myosin sequences from the following organisms are available at www.cymobase.org/cymobase (5):

Metazoa: Ecdysozoa - (Cag) *Crassostrea gigas* (oyster), (Lg) *Lottia gigantea* (owl limpet), (Dap) *Daphnia pulex* (water flea), (Hb) *Heterohabditis bacteriophora* (nematode), (Dm) *Drosophila melanogaster* (fruit fly), (Aea) *Aedes aegypti* (mosquito); Chordata (Hs) *Homo sapiens*, (Mm) *Mus musculus* (mouse), (Xt) *Xenopus tropicalis* (frog), (Tag) *Taeniopygia guttata* (finch); Urochordata - (Ci) *Ciona intestinalis* (sea squirt); Cephalochordata - (Bf) *Branchiostoma floridae* (lancelet); Echinodermata - (Spt) *Strongylocentrotus purpuratus* (sea urchin); Hemichordata - (Sck) *Saccoglossus kowalevskii* (acorn worm)

Cnidaria: (Nv) *Nematostella vectensis* (sea anemone), (Hm) *Hydra magnipapillata*

Placozoa: (Tia) *Trichoplax adherens*

Porifera: (Amq) *Amphimedon queenslandica* (sponge)

Ctenophora: (Mnl) *Mnemiopsis leidyi* (water comb jelly)

Choanoflagellata: (Mb) *Monosiga brevicollis*, (Pro) *Proterospongia*

Filasteria: (Co) *Capsaspora owczarzaki*

Ichtyosporae: (Aop) *Amoebidium parasiticum*

Fungi: (Gnp) *Gonapodya prolifera*, (Prs) *Piromyces* sp. (Chytrid fungus)

Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria (SAR): (Alk) *Aplanochytrium kerguelense* PBS07 (marine protist), (Pyc) *Phytophthora capsici* (oomycete)

Amoebozoa: (Dd) *Dictyostelium discoideum* (social amoeba), (Dif) *Dictyostelium fasciculatum* (social amoeba), (Ac) *Acanthamoeba castellanii*, (Bama) *Balamuthia mandrillaris* (pathogenic amoeba)

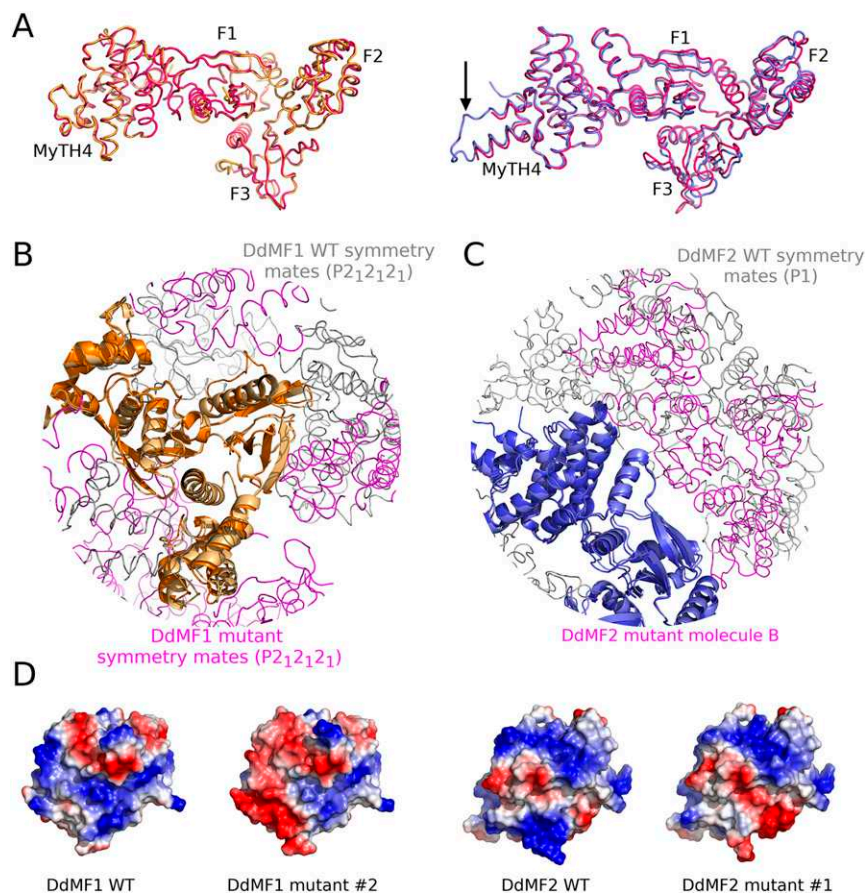


Fig. S1. Structural comparison of DdMyo7 WT and mutant DdMF1 and DdMF2. (*A, Left*) Superimposition of the DdMF1 WT (orange) and mutant #2 K1157E, H1159E, K1161E, and K1174E (magenta) structures (rmsd = 0.485 Å for 381 atoms). (*Right*) Comparison between the DdMF2 WT (blue) and mutant #1 K1181E, R1882E, K1909E, K1912E, and K1913E structures (magenta, rmsd = 0.829 Å for 411 atoms). Note that a part of the N-terminal sequence of the mutant is not visible in electron density and not modeled (arrow). (*B*) Comparison of the crystal packing of DdMF1 WT (dark orange) and DdMF1 mutant #2 (light orange) structures. Symmetry molecules are in gray (DdMF1 WT) and pink (DdMF1 mutant #2). Note that the environment of the MF molecule differs in the two crystal forms. The position of the different domains (MyTH4 and the three FERM lobes F1, F2, and F3) found in the crystal is thus not greatly influenced by the interactions with other molecules in the crystal. (*C*) Comparison of the crystal packing of DdMF2 WT (dark blue) and mutant #1 structures (light blue, molecule A). Symmetry molecules of the DdMF2 WT molecule are in gray. Note that the asymmetric unit of the mutant includes two molecules; molecule B is shown in pink. The environment of the WT and the mutant molecules is clearly different. (*D*) The surface analysis shows a difference in the electrostatic potential between the WT and the mutant MFs that accounts for the difference in MT affinity.

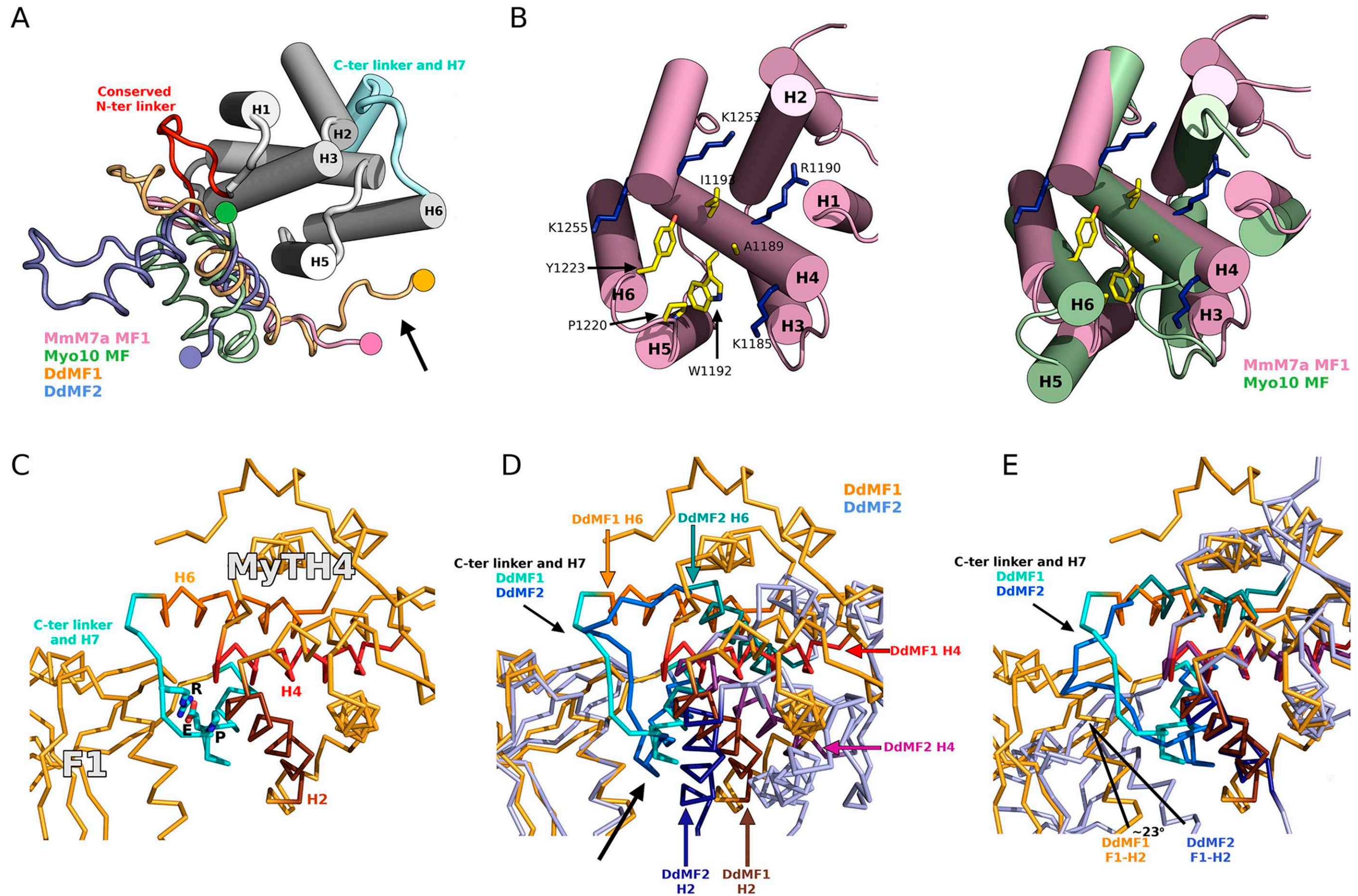


Fig. S2. Variable features of the MyTH4 domain. (A) The N-terminal variable region of Myo7a (pink), Myo10 (green), DdMF1 (orange), and DdMF2 (blue) are shown. This region is near the conserved N-ter linker and modifies the surface of the H3 and H5 helices. In DdMF1 and Myo7a MF1, it adopts a similar conformation and partially covers the H6 surface (black arrow). The N-terminal residue is indicated with a circle using the same color code. (B) Binding pocket in Myo7a for the CEN2 peptide as described (30) (*Left*). Some residues of the pocket are labeled. (*Right*) The same region in Myo10 (green) is shown for comparison. Note that the longer H5 and H6 helices in Myo10 and their slightly different orientation compared with Myo7a as well as the conformation of the H3.H4 linker close the cleft and thus prevent peptide binding to this surface in Myo10. (C-E) The supramodule MyTH4-FERM interface differs in DdMF2 compared with DdMF1. (C) The C-ter linker that connects the H6 and H7 helices (cyan) strongly interacts with the MyTH4 and F1 domains (shown here for DdMF1). The strictly conserved arginine, proline, and glutamate (27) residues of the linker that stabilize the supramodule interface between the MyTH4 and FERM domains are also shown using sticks representation (R, E, and P, respectively). In D, the DdMF2 structure (blue) is superimposed on the DdMF1 structure (orange) using the F1 lobe as a reference. Note the difference in orientation of the H6, H4, and H2 helices that reflect the difference in orientation of the whole MyTH4 domain, relative to the F1 lobe. The H7 helix (black arrow) superimposes in both structures and interacts similarly with the F1 lobe. In E, the DdMF2 structure is compared with the DdMF1 structure using the core of the MyTH4 domain as a reference. Note the large differences in the C-ter linker position (blue and cyan) that result in a reorientation of the H7 helix together with the F1-lobe by ~23°, represented here using the F1-H2 as a reference.

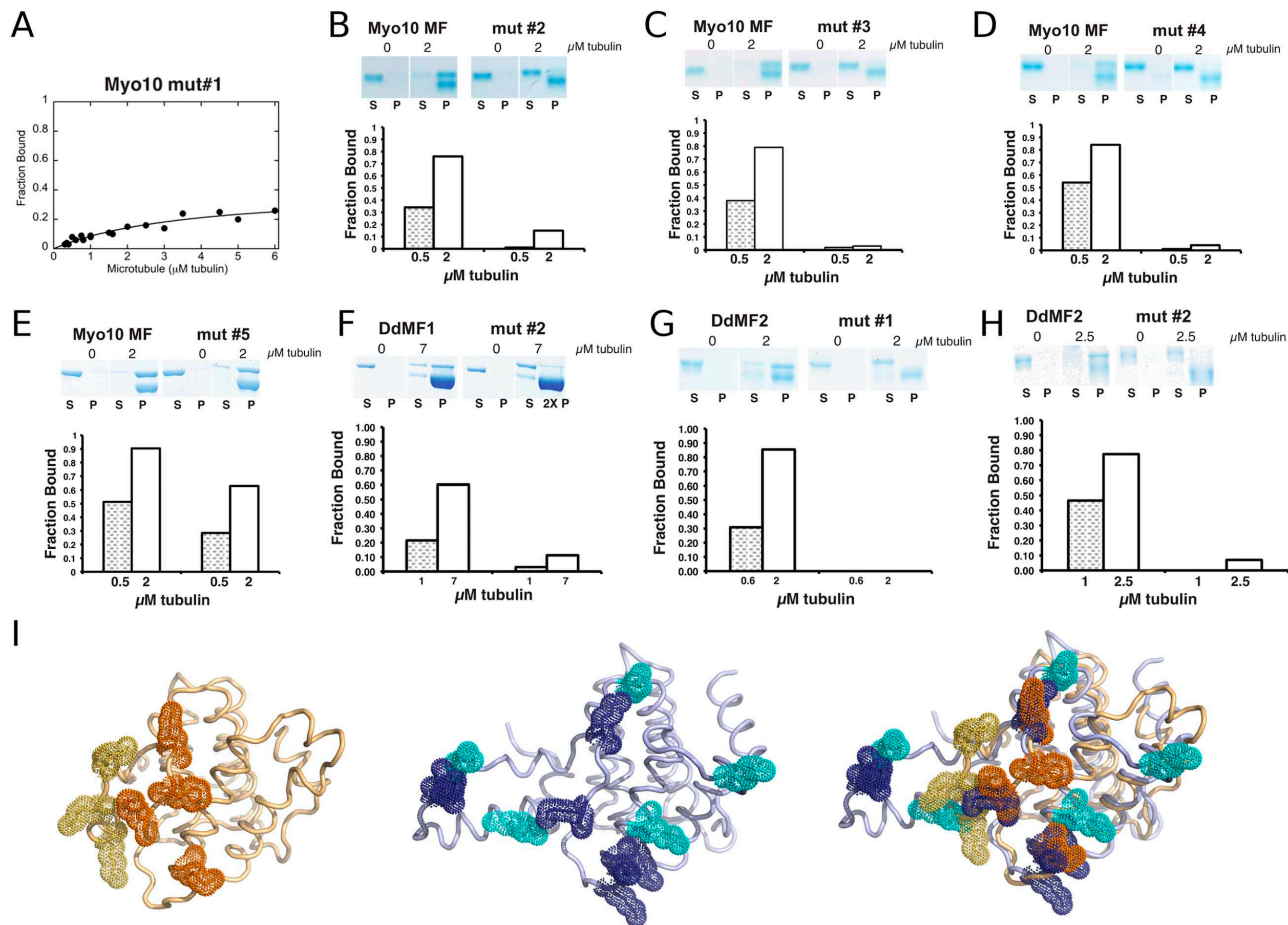


Fig. S3. Identification of the MyTH4 MT binding sites. (A) Equilibrium MT binding assays to measure the binding affinity of the MF domains of HsMyo10 mutant #1. (B–D) Identification of additional Myo10 MF residues required for MT binding. MT binding assays to identify the full MT binding site of Myo10 MF domain. Shown are examples of the binding analysis using SDS/PAGE (top) and quantification of the binding for two different concentrations of tubulin polymer at approximately half maximal or saturation binding (0.5 μ M and 2 μ M, respectively). (B) Mutant #2 R1643A, K1647A, K1650E, K1654E, and R1657E. (C) Mutant #3 R1643A, K1647A, K1650E, R1657E, and R1600E. (D) Mutant #4 R1643A, K1647A, K1650E, P1546E, P1548E, and R1600E. (E) Mutant #5 P1546E, P1548E, and R1600E. (F–H) MT binding assays to identify the MT binding sites of the DdMF1 and DdMF2 MF domains. Shown are representative examples of binding analysis using SDS/PAGE (top) and quantification of the binding for two different concentrations of tubulin polymer at approximately half maximal or saturation binding (1 and 7 μ M for DdMF1; 0.5 and 2 μ M, respectively, for DdMF2). (F) DdMF1 mutant #2 K1157E, H1159E, K1161E, and K1174E. (G) DdMF2 mutant #1 K1896E, K1900E, K1909E, and K1912E. (H) DdMF2 mutant #2 K1881E, R1882, K1909E, K1912E, and K1913E. (I) The DdMF1 and DdMF2 MT binding surfaces are different. Ribbon representation of the MT binding surface of DdMF1 (Left) and DdMF2 (Middle). The two surfaces are directly compared (Right) in the same orientation as in Fig. 4 B and C. Residues participating in MT binding are highlighted. Residues identified by mutagenesis are shown in dark colors (orange, DdMF1; blue, DdMF2) and other residues in this surface that could participate to the MT binding are in lighter colors.

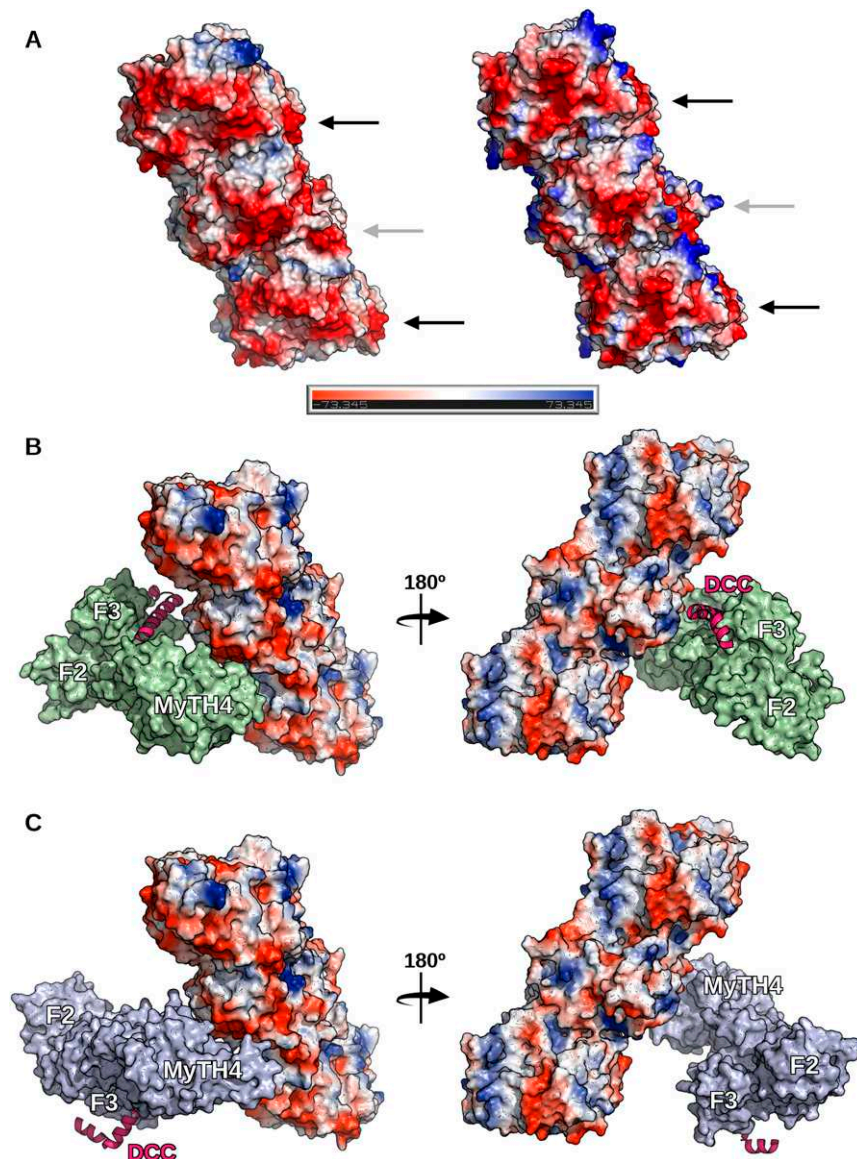


Fig. S4. Model of Myo10 MF binding to MT illustrating steric hindrance by DCC binding. (A) Electrostatic surface potential of a mammalian protofilament [Left (83)] and a *D. discoideum* homology-modeled protofilament [Right, Swiss model (46)]. Note the abundance of negative charges (red) on both surfaces. The C-terminal region of both α -tubulin and β -tubulin are indicated with gray and black arrows, respectively. (B and C) Model of the interaction between HsMyo10 MF (green, B), DdMF2 (light blue, C) and the MT (red/blue) using the MT binding surface identified in Fig. 4. Note that the binding would be impaired if the FERM domain was engaged in binding partners via the F3 lobe, such as DCC (pink) (mode ①). In DdMF2, different restrictions for cooperative binding of partners and MT sites would apply because the MT binding site is located on the opposite surface of the MyTH4 domain for this myosin MF domain, compared with that of Myo10.

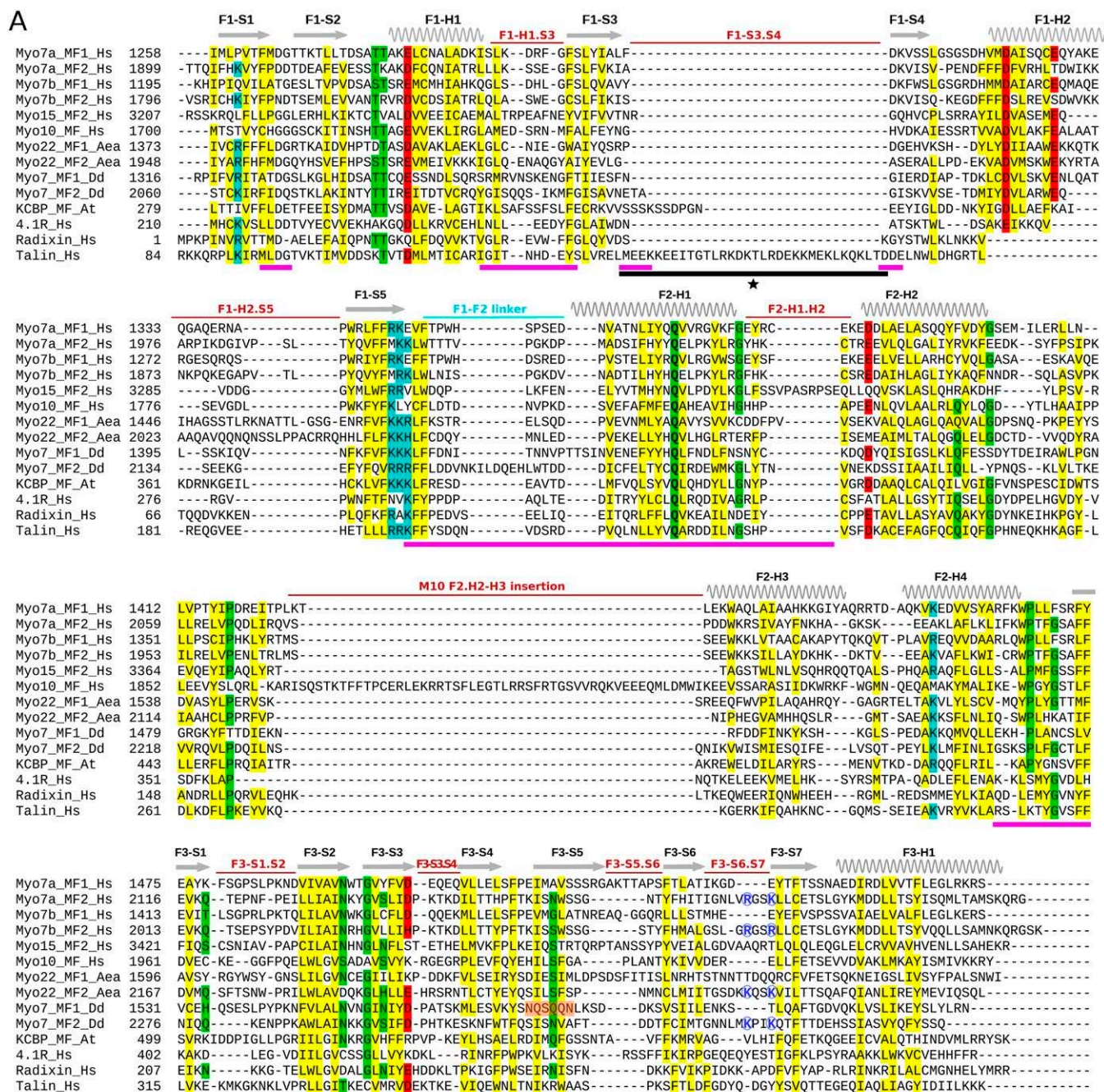


Fig. S5. Structure-based alignment of representative FERM domains and molecular dynamics. (A) Residues that are absolutely conserved are indicated in bold. Residues that are highly conserved are highlighted in yellow (hydrophobic residues), blue (positively-charged), red (negatively-charged), and green (other residues). The variable regions between the conserved elements of each lobe are indicated in red, on top of the sequences. Residues present on the surfaces that participate in the maintenance of the cloverleaf structure (Fig. 6) are indicated with a magenta line below the sequences. Highlighted in orange is the F3-S5 strand that adopts a different conformation in DdMF1 as shown in Fig. 5C (note the absence of the conserved hydrophobic residues). The conserved insertion found in the F1 lobe of talin is indicated with a black line and a star below its sequence. The blue line below the sequence highlights the Myo7 regulation loop between the 56 and 57 strands of the F2 F3 lobe. The conserved lysines in this loop are highlighted with blue circles. Interestingly, basic residues for this loop are not conserved for other myosins such as Myo10 MF (see also Fig. S6) and Myo15 MF2. (B) Rmsd of the backbone atoms of the secondary structure elements after least-square fit on the respective crystal structures. The average rmsd $\pm$ SD (angstroms) of the F1-F2-F3 assembly in molecular dynamics simulations is significantly higher in the elongated talin FERM than in myosin MF domains, which feature the cloverleaf organization. The high value observed for the F1-F2 linker in DdMF1 and DdMF2 is due to punctual rearrangements rather than higher flexibility, as demonstrated by the similar values for the rmsd standard deviations. The F2-F3 linker and the lobes themselves are conformationally stable.

Table S2. Protein identity (blue) and similarity (yellow) for the MF proteins studied

Percent	Myo10 MF	Myo7A MF1	DdMF1	DdMF2
Myo10 MF		44	41	40
Myo7A MF1	28		40	41
DdMF1	23	27		45
DdMF2	24	24	25	

For detail on the sequences used, see *Materials and Methods*.

Table S3. MyTH4 domain inserts and variable loops

Name	Residues	Location	Conserved within the class	Observations
M10-L0	1546–1560	Before H1 helix	Sequence conserved from Co to Hs Shorter in Tia, Mnl, Ci and Aop	Covers part of the surface of the H1 and H2 helices
M7a-L1	1055–1147	Between H1 and H2	Not conserved in length and composition within the class Longer in M7a than in M7b	Covers the surface of the H1 and H2 helices
M22A-L3	1063–1067 in Gnp M22 MF1	Between H3 and H4	Three to five residues inserted in Choanoflagellate and Fungi M22; absent in Aop M22 and Gnp M22B; longer in Foa M22 and Prs M22B	May modify the surface of the MyTH4 domain
M7-L5	1219–1222 in M7a MF1	Between H5 and H6	Shorter in all of the M7a and M7b MF1 and MF2 (except Co, Hb, Ce and <i>Dd</i> Myo7), and in M15 MF1	SANS Cen binding pocket in Myo7a
DdMF2-L6	2031–2036	Between H6 and H7	Seven residues inserted, in particular prolines, in DdMF2 and Amoeba M7 MF2 (except Ppp and Ays)	May change the interface between the MyTH4 and F1 within the supramodule
M15-L6	2192–2202	Between H6 and H7	Five to seven residues inserted of variable sequence in M15 MF1	May modulate the organization of the supramodule

Name	Conserved within the class	Observations
F1-S1.S2(between F1 S1 and S2 strands)	Small and variable sequence for different classes, but conserved within classes	Part of the interface with lobe F2, includes a solvent exposed surface
F1-H1.S3	Small insert for M15-MF2, DdM7 MF1 and MF2	Part of the interface with F2 lobe, interacts with F1.F2 linker
	Variable linker in solvent (same surface as that of M10-L0 and M7a-L1), near F1-F2 linker; conserved in length within classes, but not in sequence	
F1-S3.S4	Small insert for M15 MF2, M10, DdM7 and M22	Exposed in solvent, same surface as that of M10-L0 and M7a-L1
	Big insert in talin (residues 134–169, disordered in the X-ray structure)	Part of the inner cleft of the FERM domain; in talin, it might cover part of the F1 surface
	Conserved in length within classes, but not in sequence	
F1-H2.S5 (in MF myosins)	Conserved within classes, except in M22 (variable length and sequence)	Exposed in solvent, same surface as that of M10-L0 and M7a-L1
F1-S4.S5 (in Talin+ERM)	Small linker for FERM proteins such as radixin	Part of the important hinges between the F1 and F2 lobes
		May influence the inner cleft of the FERM domain
F1-F2 linker	Longer in Dd MF2 and MF1; conserved within MF classes; variable among FERM classes in length, sequence, and conformation	Plays a role in the exact positioning of the lobes in the cloverleaf
F2-H1.H2	Longer in M15 MF2; conserved in length but not in sequence within the class	Plays a role in the exact positioning of the lobes in the cloverleaf
F2-H2.H3	Well conserved within classes	Solvent exposed at the F2 lobe, binding mode ③
F2-H2.H3	Long insert in the Myo10 MF sequence before the H3 helix (residues 1869–1913); absent in Pro M10, and shorter in Co M10B	May prevent accessibility of part of the F3 lobe surface
F2.F3 linker	Four residues linker conserved in length; sequence conserved within classes	Control the path with which a peptide can bind the inner cleft, binding mode ④
		Controls flexibility between the F2 and F3 lobes
F3-S1.S2	Conserved within classes in M7 and M10	Solvent exposed at the F3 lobe, binding mode ②
	Sequence variable in other classes	
F3-S3.S4	Conserved within classes	Solvent exposed at the F3 lobe, binding mode ②
		Control the path with which a peptide can bind the inner cleft, binding mode ④
F3-S5 Strand	DdMF7 and other M22 MF1 (but not MF2) have an insert of two residues in the S5 strand	Prevents binding as seen in mode ①
F3-S5.S6	Longer in all M7 and M15, also in Aea and Foa M22 MF1 and Co M7 MF2; conserved within classes	Solvent exposed at the F3 lobe, binding mode ②
F3-S6.S7	Insert longer in MF2 proteins (M7a MF2, M7b MF2, M15 MF2, M22 MF2, DdMF2) with two basic residues conserved; conserved within classes	Solvent exposed at the F3 lobe, binding mode ②
		Seems involved in autoregulation

Hinges of the FERM in red: controls the overall shape of the FERM domain. See Fig. 6.

Surface binding sites in blue: binding modes①, ②, and ③; see Fig. 5.

Inner cleft binding mode ④ in green; see Fig. 5.

Sequences from the following organisms were aligned: Metazoa: Ce (*Caenorhabditis elegans*), Ci (*Ciona intestinalis*), Hs (*Homo sapiens*), Hb (*Heterorhabditis bacteriophora*); Placozoa: Tia (*Trichoplax adhaerens*); Ctenophora: Mnl (*Mnemiopsis leidyi*); Filasterea: Co (*Capsaspora owczarzakii*); Ichthyosporea: Aop (*Amoebidium parasiticum*); Nucleariidae: Foa (*Fonticula alba*); Fungi: Gnp (*Gonapodya prolifera*), Prs (*Piromyces*); Amoebozoa: Ays (*Acytostelium subglobosum*), Ppp (*Polysphondylium pallidum*) (Dataset S1).

Binding protein	MyTH4/FERM	Binding mode	RCSB PDB ID code	Ref.
MyTH4 binding protein				
SANS Cen2	Myo7a MF1		3PVL	30
FERM binding protein				
CD43	Radixin FERM	①	2EMS	73
CD44	Radixin FERM	①	2ZPY	74
DCAF1	Merlin FERM	①	3WA0	75
			4P7I	76
DCC	Myo10 MF	①	3AU4	27
			3PZD	29
ICAM-2	Radixin FERM	①	1J19	77
Integrin	Talin FERM	①	1MK7	36
KRIT1	SNX17 FERM	①	4TKN	78
NEP	Radixin FERM	①	2YVC	79
RIAM	Talin FERM	①	2MWN	80
Selectin	SNX17 FERM	①	4GXB	81
Moesin C-ter	Moesin FERM	②	1EF1	38
Rap1	KRIT1 FERM	③	4DXA	37
SANS Cen1	Myo7a MF1	④	3PVL	30
Heg1	KRIT1 FERM	④	3U7D	82

For the proteins binding to the FERM domain, the four modes of binding previously identified are indicated by ① through ④; see Fig. 5. The coordinates for the complexes as well as the reference that describes the interactions are given.

Other Supporting Information Files

Dataset S1 (DOCX)

ARTICLE

Received 16 Jan 2017 | Accepted 3 May 2017 | Published 29 Jun 2017

DOI: 10.1038/ncomms15864

OPEN

Myosin 7 and its adaptors link cadherins to actin

I-Mei Yu^{1,*}, Vicente J. Planelles-Herrero^{1,2,*}, Yannick Sourigues¹, Dihia Moussaoui¹, Helena Sirkia¹, Carlos Kikuti¹, David Stroebel³, Margaret A. Titus^{4,**} & Anne Houdusse^{1,**}

Cadherin linkages between adjacent stereocilia and microvilli are essential for mechanotransduction and maintaining their organization. They are anchored to actin through interaction of their cytoplasmic domains with related tripartite complexes consisting of a class VII myosin and adaptor proteins: Myo7a/SANS/Harmonin in stereocilia and Myo7b/ANKS4B/Harmonin in microvilli. Here, we determine high-resolution structures of Myo7a and Myo7b C-terminal MyTH4-FERM domain (MF2) and unveil how they recognize harmonin using a novel binding mode. Systematic definition of interactions between domains of the tripartite complex elucidates how the complex assembles and prevents possible self-association of harmonin-a. Several Myo7a deafness mutants that map to the surface of MF2 disrupt harmonin binding, revealing the molecular basis for how they impact the formation of the tripartite complex and disrupt mechanotransduction. Our results also suggest how switching between different harmonin isoforms can regulate the formation of networks with Myo7a motors and coordinate force sensing in stereocilia.

¹Structural Motility, Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 144, F-75005 Paris, France. ²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Sorbonne Universités, IFD, 4 Place Jussieu 75252 Paris, France. ³Ecole Normale Supérieure, PSL Research University, CNRS, INSERM, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), 75005 Paris, France. ⁴Department of Genetics, Cell Biology, and Development, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455, USA. * These authors contributed equally to this work. ** These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.H. (email: anne.houdusse@curie.fr).

Mechanotransduction is a process by which cells convert mechanical stimuli into electrochemical signals. Special classes of cellular protrusions, such as the stereocilia of sensory hair cells and microvilli of intestinal epithelial cells, are linked together by cadherins, enabling a coordinated response to extracellular stimuli. Links between the tips and sides of adjacent stereocilia are important for transmitting force to the mechano-electrical transduction (MET) channels that convert sound waves into an electrical signal^{1,2}. Similarly, microvilli increase the surface area of epithelial cells for absorption, and are tightly connected at their tips to provide an integrated barrier against resident gut bacteria³. The cadherin-based connections between stereocilia or microvilli are essential for the formation of mechanically integrated bundles of these projections that must withstand shear stresses imposed on them. This is achieved by anchoring the cytoplasmic domains of cadherins to the actin cytoskeleton via similar tripartite complexes consisting of a class-VII myosin motor (Myo7) and two modular adaptor proteins^{3–5} (Fig. 1).

Stereocilia of increasing height are organized into bundles that are linked together by a variety of connections that undergo dynamic changes during development^{6,7}. These links serve to both maintain bundle morphology and enable force transmission. When stimulated, hair cell bundles are deflected and the MET channels open, resulting in Ca²⁺ influx. They then undergo adaptation, a process that involves myosin motors, to reduce the electrical response of the hair bundle, thus preventing saturation and ensuring that the bundle remains sensitive to further stimuli^{8,9}. Tip links connect the top of a lower stereocilia, where the MET channel is localized, to the side of an adjacent, upper one; and are thought to contribute to resting tension and regulate adaptation. They appear early in development, initially composed of protocadherin 15 (*PCDH15*) dimers, then mature into a heterodimer of *PCDH15* and Cadherin 23 (*CDH23*) homodimers localized to the lower- and upper-tip link density (LTLD and UTLD) in adjacent stereocilia, respectively^{8,10}. The cytoplasmic tail of *CDH23* is bound to the PDZ domain scaffolding protein harmonin (*USH1C*), which forms a tripartite

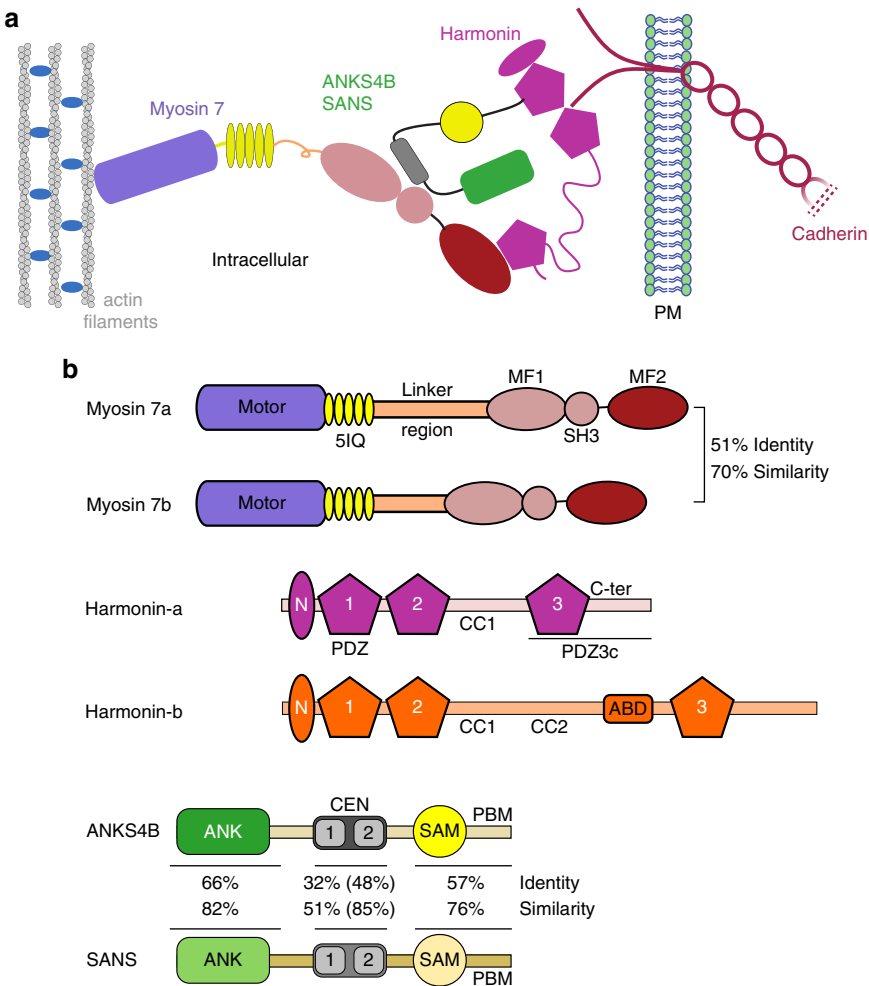


Figure 1 | Shared components of epithelial cell apical tip link complexes. (a) Diagram of the ternary, Myo7-based complex that links cadherins to the actin cytoskeleton in stereocilia tip links or microvilli showing the known domain interactions among partners. (b) Schematic illustration of Myosin 7a, Myosin 7b, Harmonin-a and -b, ANKS4B and SANS (*USH1G*). Harmonin-a stands for both a1 and a2 isoforms. Harmonin-b represents only the b2 and b3 isoforms. Harmonin-c is not shown. Harmonin-b has an additional predicted coiled-coil region (CC2), an actin binding domain (ABD), and a divergent 47aa long C-terminal extension. Although harmonin isoforms share identical N-ter, PDZ1, 2 and 3, and the CC1, in order to highlight the different functional impact between harmonin-a and -b we represent them in different colours in all figures. The percentage of identity and similarity between the Myo7 tails and between the individual ANKS4B and SANS domains are shown. The CEN domain of ANKS4B/SANS is comprised of two highly conserved CEN regions (labelled 1 and 2) connected by a short linker (see also Fig. 3a). The per cent identity and similarity when only CEN1 and CEN2 regions are taken into account are shown in parentheses.

complex with the ankyrin-repeat SANS adaptor (*USH1G*) that, in turn, binds to the tail domain of Myo7a (refs 4,11) (Fig. 1a). Altogether these proteins constitute a dynamic Usher protein complex that is essential in the morphogenesis of the stereocilia bundle in hair cells and in the calycal processes of photoreceptor cells¹². While Myo7a and harmonin are found to localize along the length of stereocilia, all three Usher proteins are also concentrated at UTLD, where they associate with the tip link and regulate the function of MET^{13–15}. Several mutations in these proteins and/or cadherin are found to be associated with non-syndromic deafness DFNB and DFNA⁷, while others result in Usher syndrome type I (USH1), the most severe form of deaf-blindness characterized by profound congenital hearing loss and a prepubertal onset of *retinis pigmentosa*⁴. Similar interactions between homologous proteins connect cadherins to actin filaments in microvilli. Protocadherin 24 (*CDHR2*) links adjacent microvilli via its interaction with the mucin-like protocadherin (*CDHR5*) and both cadherin tails bind to harmonin. ANKS4B, a protein homologous to SANS, also binds to harmonin and the Myo7b tail^{3,5} similar to SANS (Fig. 1a). Mutations in, or deletions of, any component of this tripartite complex results in disorganization of apical microvilli^{3,5,16}.

Myo7 is a crucial component of the tripartite complex that maintains the necessary mechanical tension across the cadherin links^{16–18}. It is also implicated in the transport of the complex to the tips of stereocilia or microvilli^{4,16,19,20}. The Myo7 tail domain consists of two MyTH4-FERM (MF; myosin tail homology 4; band 4.1, ezrin, radixin, moesin) domains separated by an SH3 domain (Fig. 1b). The N-terminal MF domain (MF1) binds to the CEN domain of SANS/ANKS4B, which can be further divided into CEN1 and CEN2 regions (Fig. 1b). Structures of the MF1 in complex with the CEN domain have been determined for both Myo7a-SANS and Myo7b-ANKS4B (refs 21,22). While the binding sites show a high degree of conservation, the affinities of the two interactions drastically differ, with Myo7a-SANS reported to be notably stronger²².

There are three major harmonin splice isoforms (a, b and c), each with identical N-terminal domain (NTD), two PDZ domains followed by a coiled-coil region (CC). Harmonin-a and -b have a third PDZ domain; and harmonin-b has an extra CC (CC2), an actin-binding domain (ABD), and an extended C-terminal tail (Fig. 1b). The common NTD and PDZ1 (NPDZ1) domains interact with the SAM-PBM (PDZ binding motif) domains of SANS/ANKS4B (refs 5,21,22) (Fig. 1a,b), while the PDZ2 and/or NTD bind cadherin tails^{23–25}. In addition, the extended PDZ3c (PDZ3 plus its C-terminal peptide) of harmonin-a binds directly to the C-terminal MF domain (MF2) of Myo7b but only very weakly to Myo7a, suggesting a possible mechanism for reinforcing the ANKS4B-Myo7b interaction in microvilli²². The nature and significance of this interaction and the basis for the specificity between Myo7 paralogs are unknown.

The linker complexes in stereocilia and microvilli have many similarities yet notable differences have been reported, suggesting that they may differ in their assembly and/or maintenance^{3,5,16,21,22}. Understanding how cadherin-based linkages between stereocilia and microvilli are generated and maintained requires a complete description of the interactions between Myo7, harmonin and SANS/ANKS4B proteins, and how their modular complexes may switch the motor function from a transporter to a force sensor/anchor. Harmonin plays a pivotal role due to its ability to interact with cadherin as well as all other components of the complex. Gaining structural insights into these cadherin-based complexes is also critical to learn about how they respond to and transduce external forces across cells.

We describe here a combined structural and biochemical approach to define the interactions between Myo7 MF domains and their partners, harmonin and SANS/ANKS4B.

High-resolution structures reveal a conserved mechanism by which Myo7 MF2 domain recognizes harmonin, as well as the molecular basis for how several deafness mutations may disrupt stereocilia mechanotransduction. The results highlight how switching of harmonin isoforms could trigger the formation of distinct complexes that may control the functional role of the motor in cells.

Results

Harmonin PDZ3c recognition by Myo7b MF2. The basis of the harmonin-a PDZ3c/Myo7b MF2 interaction was determined by solving the crystal structures of Myo7b MF2 and of PDZ3c/Myo7b MF2 complex at 2.44 and 1.88 Å resolution, respectively (Tables 1 and 2; Fig. 2a; Supplementary Fig. 1a). The MF2 domain adopts a canonical MyTH4-FERM supramodule, with limited flexibility between the MyTH4 and FERM domains; while the FERM domain consists of three globular subdomains or ‘lobes’, similar to previously described MF structures^{21,22,26–28} (Supplementary Table 1). The majority of the MF2 and PDZ3c interactions occur between the FERM domain and harmonin-a’s C-terminal polypeptide chain (545YDDELTF552, hereafter referred to as Cter) (Fig. 2b,d), with relatively few contacts between the F1 and F3 lobes of MF2 and the PDZ3 domain (Supplementary Fig. 1d). Limited structural changes are found in the Myo7b MF2 supramodule upon PDZ3c binding (Fig. 2c), with an overall r.m.s.d. of 0.63 Å for 414 Cα atoms between the bound and free structures. This limited conformational pliability upon cargo binding indicates that the groove of a particular FERM domain defines its cargo recognition.

The interacting groove within the FERM domain and the orientation of the Cter peptide in our PDZ3c/Myo7b MF2 structure are notably different from the CEN1 peptide binding to the Myo7 MF1 domain^{21,22} (Supplementary Fig. 2d). The distinct orientation of the FERM lobes in Myo7b MF1 and MF2 domains

Table 1 | Details of proteins and their boundaries used in the study.

Construct name	Residues
<i>Myosin 7a</i> (Uniprot: Q13402-1)*	
M7a MF1.SH3	991–1692
M7a MF2	1702–2215
<i>Myosin 7b</i> (Uniprot: Q16PIF6-1)	
M7b MF1.SH3	958–1586
M7b MF2	1605–2116
<i>Harmonin-a1 (USH1C)</i> (Uniprot: Q9Y6N9-1)	
NPDZ1	1–197
NPDZ1.PDZ2	1–301
PDZ2-end	194–552
PDZ3c	428–552
PDZ3CΔCter	428–542
Full length (FL)-harmonin	1–552
FL-harmonin-ΔCter	1–542
<i>Harmonin-b3</i> (Uniprot: Q9Y6N9-5)	
PDZ3CisoB	728–899
<i>SANS (USH1G)</i> (Uniprot: Q495M9)	
SANS _{CEN-PBM}	300–461
<i>ANKS4B</i> (Uniprot: Q8N8V4)	
ANKS4B _{CEN-PBM}	259–417

*Note that residues 1523–1560 were deleted from MF1.

Table 2 Data collection and refinement statistics.				
	Myo7b MF2 Native	Myo7b MF2 SeMet	Myo7b MF2 + HarA PDZ3c	Myo7a MF2 + HarA PDZ3c
Data collection				
Space group	C 2	C 2	P 2 ₁	C 2 2 2 ₁
Cell dimensions				
a, b, c (Å)	123.7, 42.8, 118.4	124.3, 42.7, 118.3	69.62, 42.56, 118.17	121.52, 151.71, 100.8
α, β, γ (deg)	90.0, 97.7, 90.0	90.0, 97.8, 90.0	90.0, 98.02, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolution (Å)	50–2.44 (2.53–2.44)*	50–2.86 (3.11–2.86)	50–1.88 (1.95–1.88)	50–2.60 (2.70–2.60)
R _{sym} (%)	7.2 (61.8)	17.9 (68.7)	9.7 (124.3)	5.3 (53.2)
I/σ	11.86 (1.87)	8.42 (1.65)	12.77 (1.0)	14.16 (1.68)
CC _{1/2} (%)	99.7 (91.5)	99.1 (84.9)	99.8 (54.3)	99.8 (76.2)
Completeness (%)	97.4 (93.7)	99.5 (95.0)	95.0 (61.0)	97.0 (96.0)
Redundancy	3.4 (3.1)	14.0 (8.1)	6.4 (4.0)	3.1 (3.0)
Wavelength (Å)	0.9786	0.9792	0.9060	0.9786
Refinement				
Resolution (Å)	35.17–2.44		34.47–1.88	19.84–2.60
No. reflections	22,553 (2,098)		53,484 (3,181)	87,935 (8,118)
R _{work} / R _{free} (%)	20.86/25.80		18.98/21.90	17.97/23.70
No. atoms				
Protein	4,026		4,789	4,737
Ligand/ion	37		37	8
Water	139		380	328
R.m.s.d.'s				
Bond lengths (Å)	0.010		0.010	0.010
Bond angles (°)	1.10		0.99	1.13
Ramachandran plot				
Favoured (%)	97.73		97.62	96.27
Accepted (%)	100		99.66	100
Outliers (%)	0		0.34	0
PDB Code	5MV7		5MV8	5MV9

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

(Supplementary Movie 1) readily explains their specific recognition of different targets within their FERM core elements (reviewed in²⁷). The five linkers in the FERM lobes (Supplementary Figs 2e,f and 3) dictate the orientation of each lobe and thus define the shape and, as a result, the specificity of the central groove. While the binding mode of harmonin PDZ3c to Myo7b FERM has some similarity to that of Heg1 tail bound to the KRIT FERM domain²⁹ (Supplementary Fig. 2d, right), the positioning and specific recognition of the two tails drastically differ. It is worth noting that Myo15a's MF-containing tail also binds to the PDZ domain protein whirlin, however this interaction is mediated by a class-I PBM in Myo15a binding to the PDZ3 domain of whirlin. Thus, Myo7b MF2 recognizes harmonin PDZ3c via a new binding mode.

Binding of PDZ3c to MF2 results in a buried solvent-accessible surface area of 1276 Å² (484 Å² from PDZ3 domain and 792 Å² from Cter). The Cter fits into the groove between the three FERM lobes (Fig. 2b, Supplementary Fig. 1c) and interacts with all three via numerous, mainly hydrophobic, interactions. Two aspartates, D546 and D547, are involved in hydrogen bonds with Myo7b R1921 and S2082 (Fig. 2d). The last two phenylalanines of the Cter reach to the centre of the cloverleaf where they interact with all three lobes through extensive hydrophobic and hydrogen bond contacts (Fig. 2d). In this buried environment, the negatively charged carboxylic group of the Cter interacts specifically with three residues of Myo7b, K1918, Q1914 and W1895 (Fig. 2d). The harmonin-a Cter peptide is highly conserved in vertebrates (Supplementary Fig. 5), with the most important residues recognized by the FERM domain forming the following consensus sequence: ϕ-D-D-x-Ψ-x-FF-_{COOH}, where ϕ and Ψ indicate Phe/Tyr and Leu/Val/Ile/Met, respectively (Fig. 2b,d). Notably, the canonical class-II PBM binding site in the PDZ3

domain^{24,30,31} is not involved in binding to Myo7b MF2 and is available for other partners (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2c).

The extensive interactions found between the PDZ3c and the FERM domain (Fig. 2d) are consistent with Myo7b MF2 and harmonin PDZ3c forming a tight complex (K_d of 1.4 μM; Table 3, Supplementary Fig. 4a), as previously reported²². The harmonin PDZ3c mutants, F551V-F552V and D546R, exhibit substantially reduced affinity for MF2, K_d of 68 and > 300 μM, respectively (Table 3, Fig. 2b, Supplementary Fig. 4d). A triple mutant D546R-F551V-F552V, as well as deletion of the entire Cter motif (ΔCter) abolishes the interaction (Table 3, Supplementary Fig. 4b). Finally, mutations of the Myo7b MF2 (L2083W and R1921E-F1923V) that disrupt major contacts in the interface also abolish binding (Table 3, Fig. 2b, Supplementary Fig. 4c). Altogether, our results establish that the conserved harmonin-a Cter motif mediates binding to Myo7b MF2 and highlight the importance of extensions of the PDZ domains to specifically mediate interactions with binding partners (Supplementary Fig. 2a,b)^{32–34}.

Conserved mechanism of recognition by Myo7s. The MF2 of Myo7a was reported to interact weakly, if at all, with PDZ3c²²; and this could be attributed to divergent sequences (Fig. 1b) and/or differences in the orientation of the Myo7a MF2 lobes. All of the residues present in the central FERM groove of Myo7b MF2 involved in binding to PDZ3c are conserved in both vertebrate paralogs, except for a small Tyr2026^{Myo7a}/Phe1923^{Myo7b} difference (Supplementary Fig. 6, arrows and #). Consistent with this sequence conservation, PDZ3c binds to Myo7a MF2 with ~ 1 μM affinity, the same affinity as the Myo7b MF2/PDZ3c interaction (Table 3, Supplementary Fig. 4d). This is in contrast to initial reports that did not detect a significant interaction²²,

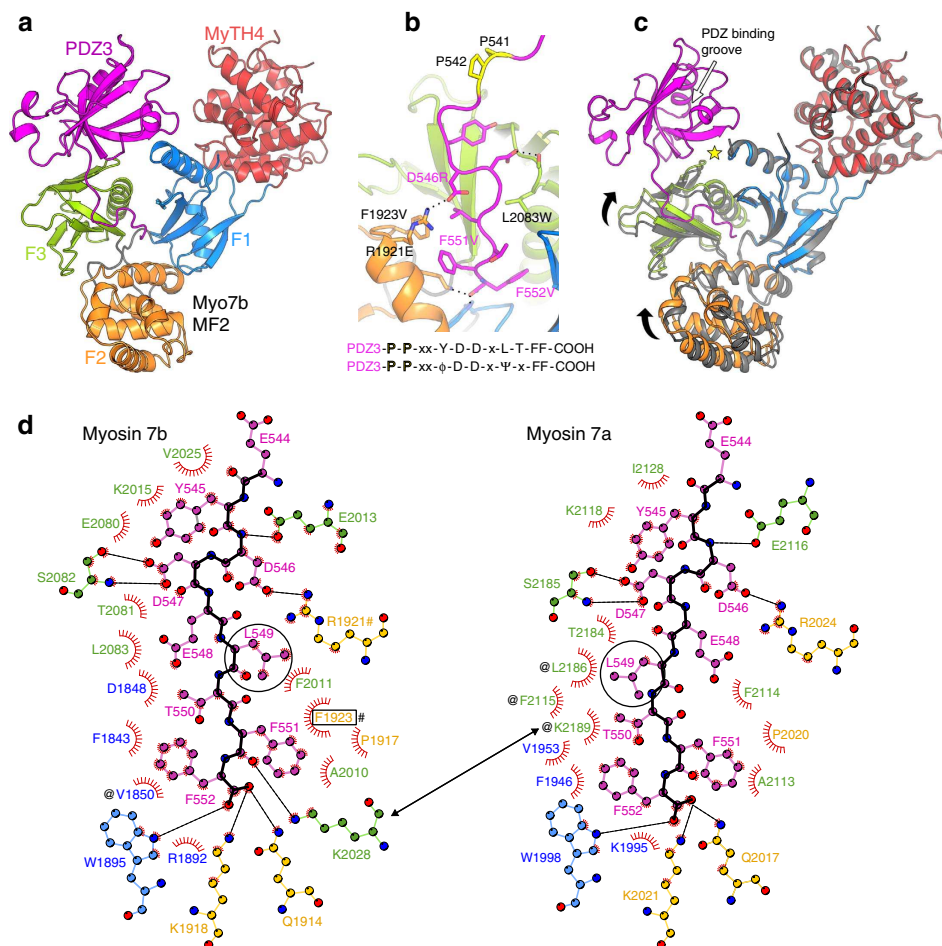


Figure 2 | Structural basis of harmonin PDZ3c recognition by Myo7b MF2. (a) Structure of the harmonin PDZ3c-Myo7b MF2 complex. The MyTH4 domain is shown in red and the FERM subdomains are coloured in blue (F1), orange (F2) and green (F3) throughout the figures. The harmonin PDZ3c is shown in magenta. (b) Critical residues mediating interactions between the harmonin Cter extension (magenta) and the Myo7b FERM (ribbon representation) domain. Important side chains are shown in sticks. Two conserved prolines (P541 and P542) at the end of the PDZ3 domain help direct the Cter extension. The motif that mediates binding to the FERM domain is shown (bottom). (c) Superimposition of the free (dark grey) and PDZ3c-bound (multi-coloured) Myo7b MF2 structures using the F1 lobe as a reference. The black arrows indicate the lobe displacements upon PDZ3c binding. The white arrow in the PDZ3 domain indicates the partner-binding groove within the PDZ3 domain. The yellow star highlights the interface between the PDZ3 domain and the Myo7b F1 and F3 lobes. The minor changes in the orientation of the three lobes ($<5^\circ$) promote optimal interactions between the Cter peptide and the FERM domain via an induced fit of small amplitude. (d) Diagram of the interactions between the harmonin PDZ3 Cter extension (magenta, black backbone) and the Myo7b FERM domain. Dotted lines: hydrogen bond within distances <3.5 Å; Red spikes: hydrophobic interactions. The major difference between the two complexes is in the orientation of harmonin L549 side chain (black circles) due to the F1923^{Myo7b}/Y2026^{Myo7a} substitution. The following residue, T550, also changes its environment (# denotes residues interacting with L549, while @ indicates residues interacting with T550). The black arrow indicates the homologous lysines 2086/2189 (Myo7b/Myo7a) that interact differently with PDZ3c. This figure is generated using LigPlot +⁶⁹.

despite the fact that the binding assays were performed at the same ionic strength (100 mM NaCl). The Cter motif is also critical for the Myo7a MF2/PDZ3c interaction, since the PDZ3^{D546R-F551V-F552V} and Δ Cter mutants abolish binding (Table 3). These findings suggest that the Myo7a and Myo7b MF2 domains use a similar binding mode to interact with PDZ3c.

The structure of Myo7a MF2 bound to harmonin PDZ3c was determined at 2.6 Å resolution (Table 2; Supplementary Fig. 1e). Comparison with the PDZ3c/Myo7b MF2 structure results in an r.m.s.d. of 1.20 Å (for 411 C α atoms) (Supplementary Fig. 1g) despite the low-sequence identity (51%) between the two MF2 domains and major differences in the crystal packing environments. The harmonin PDZ3c binds in the same overall manner by inserting the Cter motif into Myo7a MF2's central FERM cavity (Supplementary Fig. 1g). However, the Cter motif adopts a slightly different conformation in the two complexes

(Supplementary Fig. 1f), namely residues Leu549 and Thr550 interact distinctively in the two FERM cavities (Fig. 2d) due to the Tyr2026^{Myo7a}/Phe1923^{Myo7b} variation (Fig. 2d; supplementary Fig. 1f). Such slight adaptability of the FERM groove results mainly from conformational variability in the F1 lobe (Supplementary Fig. 1g,h). The affinities of PDZ3c for either Myo7a or Myo7b MF2 are similar despite these changes (Table 3), showing that some adaptation of the binding mode in this FERM cavity can occur without much cost in affinity.

There are relatively few contacts between the surface of the PDZ3 domain and the F1 and F3 lobes of Myo7 MF2 (Supplementary Fig. 1d). The PDZ3 E469A mutant, which disrupts the interactions with two main chain nitrogens of the F3 lobe (Supplementary Fig. 1d, yellow star), modestly reduces the binding affinity for both Myo7s' MF2s (from K_d of 1.6–1.8 μ M to $\sim$ 5–6 μ M; Table 3). Introducing a bulky residue at the interface,

Table 3 | Structural basis for harmonin PDZ3c recognition by Myo7b MF2.

Myosin	Harmonin	K_d
<i>Myo7b MF2 binding to Harmonin</i>		
M7b MF2	PDZ3c (isoA)	$1.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ($n = 2$)*,†
	YFP PDZ3c (isoA)	$1.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
M7b MF2 L2083W	YFP PDZ3c (isoA)	w.b. ($> 300 \mu\text{M}$) ($n = 2$)
M7b MF2 R1921E-F1923V	PDZ3c (isoA)	n.b.*
	YFP PDZ3c (isoA)	w.b. ($> 100 \mu\text{M}$) ($n = 2$)
YFP M7b MF2	PDZ3c (isoA) F551V-F552V	w.b. ($> 100 \mu\text{M}$) ($n = 2$)
YFP M7b MF2	PDZ3c (isoA) D546R	w.b. ($> 300 \mu\text{M}$) ($n = 2$)
YFP M7b MF2	PDZ3c (isoA) D546R-F551V-F552V	n.b.
M7b MF2	PDZ3c (isoA) D546R-F551V-F552V	n.b.*
YFP M7b MF2	PDZ3 Δ Cter	n.b.
M7b MF2	YFP FL (isoA)	$2.05 \pm 0.79 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
YFP M7b MF2	PDZ2-end (isoA)	$2.79 \pm 0.79 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
YFP M7b MF2	NPDZ1.PDZ2	n.b.
YFP M7b MF2	FL Δ Cter	n.b.
M7b MF2	PDZ3c (isoB)	n.b.*
<i>Myo7a MF2 binding to Harmonin</i>		
M7a MF2	PDZ3c (isoA)	$1 \mu\text{M}$ *
YFP M7a MF2	PDZ3c (isoA)	$1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
YFP M7a MF2	PDZ3c (isoA) F551V-F552V	n.b.
YFP M7a MF2	PDZ3c (isoA) D546R	n.b.
YFP M7a MF2	PDZ3c (isoA) D546R-F551V-F552V	n.b.
YFP M7a MF2	PDZ3c Δ Cter	n.b.
M7a MF2	YFP FL (isoA)	$2.36 \mu\text{M}$
YFP M7a MF2	PDZ2-end (isoA)	$1.88 \mu\text{M}$
YFP M7a MF2	NPDZ1.PDZ2	n.b. ($n = 2$)
YFP M7a MF2	FL Δ Cter	n.b.
M7a MF2	PDZ3c (isoB)	n.b.*
<i>Harmonin PDZ3 contribution to the binding of Myo7 MF2</i>		
M7a MF2	YFP PDZ3c (isoA) E469A	$5.4 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
M7a MF2	YFP PDZ3c (isoA) I476W	$17.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
M7a MF2	YFP PDZ3c (isoA) E469A-I476W	$70.4 \pm 7.2 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
M7b MF2	YFP PDZ3c (isoA) E469A	$6.11 \pm 0.44 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
M7b MF2	YFP PDZ3c (isoA) I476W	$18.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ($n = 2$)
M7b MF2	YFP PDZ3c (isoA) E469A-I476W	$38.1 \pm 4.9 \mu\text{M}$ ($n = 2$)

n.b. and w.b. stand for no binding (no fit possible) and weak binding (the end of the curve is missing, and only a rough estimate of the K_d can be provided), respectively.
*ITC results; n = number of independent experiments.
†Previously measured $1.7 \mu\text{M}$ (ref. 22).

I476W, results in even weaker binding (K_d of $\sim 18 \mu\text{M}$; Table 3), likely due to its interference with key interactions between the PDZ3 and the FERM domain (Supplementary Fig. 1d, yellow star). Thus, PDZ3 contributes modestly to the interaction with MF2. The Myo7a MF2 domain has been shown by pull-down experiment to bind to the NPDZ1.PDZ2 domains of harmonin²³, suggesting that Myo7a could have multiple direct interactions with this adaptor. However, MST binding assays failed to detect any direct interaction between NPDZ1.PDZ2 and the MF2 of either Myo7a or Myo7b (Table 3). Although the different techniques and/or conditions used for those binding assays might lead to the conflicting outcomes, consistent with our results, the Δ Cter full-length (FL) harmonin-a does not interact with either Myo7a or Myo7b MF2 (Table 3). In addition, the FL-harmonin and the PDZ2-end region (Table 1) both bind to either MF2 with a similar affinity as PDZ3c (Table 3), suggesting that PDZ3c mediates the main interaction between the MF2 and harmonin-a. Taken together, these results demonstrate that the binding mode of MF2 to PDZ3c is conserved between Myo7 paralogs and involves both an essential, tight association with the harmonin Cter motif, as well as critical interactions with the core PDZ3 domain. Moreover, the tight binding between the Cter of harmonin-a and Myo7a MF2 suggests a potential, previously overlooked role for harmonin-a in stereocilia.

Interactions within the Myo7 tripartite complex. A number of binary interactions between members of the Myo7a and Myo7b tripartite complexes have been characterized. While many of these are conserved between the two homologous systems, there are significant differences^{3,5,21,22}. An intriguing divergence is found between the interactions of Myo7a-SANS and Myo7b-ANKS4B. Neither ANKS4B CEN nor SANS CEN domain was reported to bind to Myo7a or Myo7b MF1.SH3, respectively²², suggesting the homologous interactions are not interchangeable. However, structures of the two complexes have shown that they share an almost identical interaction site^{21,22} and the sequences of the ANKS4B and SANS CEN1 and CEN2 regions are highly conserved (85%, Figs 1 and 3a). In agreement with the structure and sequence conservation involved in the interactions, SANS_{CEN-PBM} and ANKS4B_{CEN-PBM} (including both CEN regions and the SAM domain; Fig. 1 and Table 1) both bind to Myo7b MF1.SH3 with similar affinities (K_d of $3\text{--}6 \mu\text{M}$) (Fig. 3c, Table 4). Moreover, ANKS4B_{CEN-PBM} also binds Myo7a MF1.SH3 with a comparable affinity (K_d of $\sim 5 \mu\text{M}$) (Fig. 3c, Table 4). Mutation of conserved surface residues (A1128E-R1129E-K1192E; Fig. 3b) in the Myo7b_{MyTH4} CEN2-binding site abrogates both ANKS4B_{CEN-PBM} and SANS_{CEN-PBM} binding (Table 4), consistent with a conserved CEN2-binding site on Myo7b MF1 for both ANKS4B and

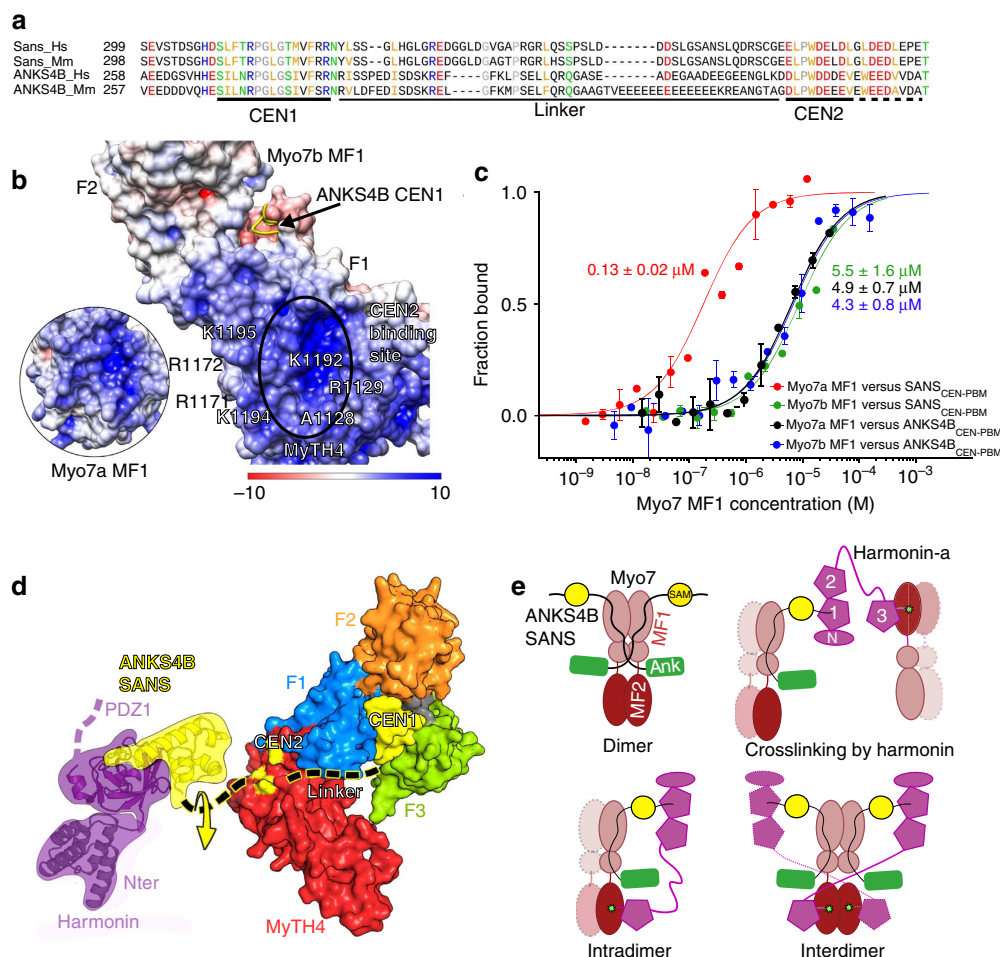


Figure 3 | Myosin 7 MF1 binding to SANS_{CEN-PBM} and ANKS4B_{CEN-PBM}. (a) Alignment of SANS and ANKS4B CEN domain (Hs: human; Mm: mouse). Conserved residues are shown in red (negatively charged), blue (positively charged), yellow (hydrophobic), green (polar and not charged) and grey (proline and glycine). (b) Electrostatic surface potential of Myo7b MF1/ANKS4B (5F3Y) and Myo7a MF1/SANS (3PVL) (inset). The residues found in the positively charged pocket in the MyTH4 domains that participate in SANS or ANKS4B CEN2 binding are indicated (note that the CEN2 region is highly negatively charged, (a)). The surface potential was calculated using the APBS server with default parameters. (c) MST curves comparing the Myo7 MF1.SH3 binding to either SANS_{CEN-PBM} or ANKS4B_{CEN-PBM}. Averaged K_d s from two technical replicates (mean ± s.d.) are shown. (d) Model of the tripartite Myo7 MF1-SANS/ANKS4B-Harmonin complex. The Myo7 MF1 is shown in a surface representation, with the binding site of CEN2 highlighted in yellow. CEN1 and SAM of ANKS4B or SANS are also shown in yellow. The linkers are shown as black dashed line. The short variable linker between CEN2 and SAM domain is likely flexible, allowing for movement of the SAM domain relative to the Myo7 tail (yellow arrow). (e). Cartoon models showing the different tripartite complexes that could be assembled. Full length SANS can dimerize via a region between the ANKyrin domain and CEN1 (ref. 35) and, thus, potentially facilitates Myo7 dimerization (dimer). While interacting with MF1 (brown) via SANS/ANKS4B (yellow and green), the long CC1 region of harmonin may allow PDZ3c to reach a MF2 of another Myo7 molecule (crosslinking), the same Myo7 molecule (intradimer), or the other MF2 in the same myosin dimer (interdimer).

SANS. In contrast, SANS_{CEN-PBM} binds Myo7a MF1 with 130 nM K_d (Table 4), an affinity much higher than for Myo7b as previously reported²¹, revealing how small changes in sequence can modulate the strength of association between complex members. Interestingly, the presence of saturating concentrations of harmonin NPDZ1.PDZ2 does not affect the binding between MF1 and SANS/ANKS4B (Table 4), establishing that SANS_{CEN-PBM}/ANKS4B_{CEN-PBM} binding to harmonin does not influence their interactions with Myo7. Furthermore, size-exclusion chromatography combined with multi-angle light scattering (SEC-MALS) demonstrates that the stoichiometry of the Myo7a MF1/SANS_{CEN-PBM} and MF1/SANS_{CEN-PBM}/NPDZ1 complexes are 1:1 and 1:1:1, respectively (Supplementary Fig. 7a,b). Altogether, these results establish that the tripartite complex can form based on the known, characterized binary interactions, where SANS/ANKS4B binds to the MF1 via their

CEN1 and CEN2 regions and to harmonin NPDZ1 via their SAM-PBM domain (Fig. 3d).

The defined interactions between members of the tripartite complex and their intrinsic plasticity suggest multiple, possible ways they can assemble. The linker between CEN2 and SAM is long enough (~10 aa) to provide significant rotational flexibility for the orientation of MF1 relative to harmonin and SANS/ANKS4B (Fig. 3d). In addition, the region upstream of CEN1 in SANS has been shown to dimerize³⁵, thus binding to SANS may promote Myo7 dimerization (Fig. 3e, dimer). On the basis of all the current binding and structural data, we propose several possible models for how the tripartite complex may assemble (Fig. 3e). A single-harmonin molecule, through interactions with both Myo7 tail's MF1 (via SANS/ANKS4B) and MF2 domains, can either crosslink two independent Myo7 (Fig. 3e, crosslinking), bind to the same Myo7 (Fig. 3e,

Table 4 Myo7 MF1.SH3 interaction with SANS or ANKS4B.		
Myosin/Harmonin	SANS/ANKS4B	K _d
M7b MF1.SH3	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM}	5.4 ± 1.6 μM (n = 2)
M7a MF1.SH3	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM}	0.13 ± 0.02 μM (n = 3)*
M7a MF1.SH3	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM} + NPDZ1.PDZ2	0.386 μM
NPDZ1.PDZ2	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM}	0.017 μM
M7b MF1.SH3 A1128E	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM}	18.2 ± 2.8 μM (n = 2)
M7b MF1.SH3	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM}	n.b. (n = 2)
A1128E-R1129E-K1192E		
M7b MF1.SH3	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM}	6.6 ± 2.3 μM (n = 2)
K1194E-K1195E		
R1171E-R1172E		
M7a MF2	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM}	n.b.
M7b MF2	YFP ^{SANS} _{CEN-PBM}	n.b.
YFP M7b MF1.SH3	ANKS4B _{CEN-PBM}	2.9 ± 0.03 μM (n = 2)*
M7b MF1.SH3	YFP ^{ANKS4B} _{CEN-PBM}	4.3 ± 0.8 μM (n = 2)
M7a MF1.SH3	YFP ^{ANKS4B} _{CEN-PBM}	4.9 ± 0.7 μM (n = 2)
M7b MF1.SH3	YFP ^{NPDZ1.PDZ2} + ANKS4B _{CEN-PBM}	4.0 μM
NPDZ1.PDZ2	YFP ^{ANKS4B} _{CEN-PBM}	0.009 μM
M7b MF1.SH3 A1128E	YFP ^{ANKS4B} _{CEN-PBM}	13.1 ± 0.7 μM (n = 2)
M7b MF1.SH3	YFP ^{ANKS4B} _{CEN-PBM}	n.b. (n = 2)
A1128E-R1129E-K1192E		
M7b MF1.SH3	YFP ^{ANKS4B} _{CEN-PBM}	3.1 ± 0.2 μM (n = 2)
K1194E-K1195E		
R1171E-R1172E		

n = number of independent experiments. n.b. and w.b. stand for no binding (no fit possible) and weak binding (the end of the curve is missing, and only a rough estimate of the K_d can be provided), respectively.
*Previously measured 0.05 and 1.06 μM, respectively^{21,22}.

intradimer), or crosslink two Myo7 within a particular dimer (Fig. 3e, interdimer). This modular nature of the Myo7 tail–adaptor interaction could thus allow distinct motor clustering, depending on the presence of various partners and their respective concentrations that may vary in the different environments in stereocilia and microvilli. Dynamic variations in the partners’ expression would result in diverse tripartite complex assemblies, as proposed in Fig. 3e, and may control whether Myo7 is used to transport an adaptor complex to target sites (that is, cadherin tails) or to anchor the different cadherin-based linkages during microvilli and stereocilia development.

Tripartite complex in stereocilia and MF2 deafness mutants. Multiple harmonin isoforms present in stereocilia likely contribute both to anchoring the tip links and to the stabilization of other inter-stereociliary links^{36–38}. Harmonin-b, abundant in stereocilia, has a longer Cter tail lacking the conserved motif required for interaction with the MF2 domain. Indeed, no binding was observed between the PDZ3 domain with the longer extension (PDZ3c_{isoB}) and either the Myo7a or Myo7b MF2 (Table 3), establishing that interaction between harmonin and the MF2 domain of Myo7 is dependent on the specific harmonin isoform. Thus, in stereocilia, interactions between harmonin-b and myosin in the tripartite complexes are likely restricted to the indirect, but strong MF1–SANS interactions^{21,22}; and the proposed tripartite complex models (Fig. 3e) can only form with harmonin-a containing the short Cter motif, but not harmonin-b (Figs 1b and 2b, Supplementary Fig. 5).

Harmonin-b is an important component of the tip link complex^{23,36,39}, yet its association with Myo7a would not require the MF2 domain. However, several deafness mutations suggest the importance of this domain for the integrity of stereocilia. In light of the new structures, 25 missense mutations of Myo7a MF2 that cause deafness were mapped onto the structure to assess their potential impact on binding to partners (Fig. 4c,

Supplementary Table 2 and references therein, Supplementary Movie 2). The majority of these likely result in destabilization of the MF2 fold. However, mutations affecting three surface residues (K2118N, G2163S, G1982E/R) suggest a role for the surface next to the F1_{H2-S5} loop and the F3 lobe in making specific interactions with partners. Interestingly, these four mutations significantly weaken the interaction with PDZ3c (Fig. 4), suggesting the importance of the Myo7a MF2/harmonin PDZ3c interactions in hearing and a functional role for harmonin-a. Consistently, a study of mutant mouse Myo7a targeting showed that GFP-Myo7a G1982R failed to localize to stereocilia²⁰. Furthermore, a specific deficit in harmonin-b (Ush1c^{dfcr-2j/dfcr-2j} mutant mice) was shown not to impair the stereocilia bundle morphology whereas Ush1c^{dfcr} mutant mice, lacking both harmonin-a and -b, have abnormal stereocilia^{37,38}. Altogether, these results support an essential role for the MF2 domain via interactions with harmonin-a and/or other partners despite the fact that the tripartite complex would remain together through strong SANS interactions. Disruption of the interactions involving Myo7a MF2 would be predicted to interfere with the formation of strong stereocilia linkages, resulting in deafness.

Harmonin autoinhibition and self-association. Harmonin has a pivotal role in the formation and function of the tripartite complex and has been suggested to interact with itself, possibly promoting formation of a larger anchoring complex^{24,35}. Various inter-domain interactions have been reported but have not been well-characterized. The Cter motif involved in binding with the Myo7 MF2 domain has been suggested to contain a putative class-I PBM²⁴ (Supplementary Fig. 5) that can bind to PDZ1 and PDZ2. Consistently, NPDZ1 binds PDZ3c with a weak affinity (K_d ~ 10 μM) (Fig. 5a, Table 5). The affinity between NPDZ1 and PDZ2-end or between NPDZ1.PDZ2 and PDZ3c is slightly higher (K_d ~ 3–5 μM). The Cter motif is essential for this interaction as PDZ3c_{ΔCter} or PDZ3c_{F551V-F552V} abolishes binding (Table 5). Furthermore, no interaction was detected between the

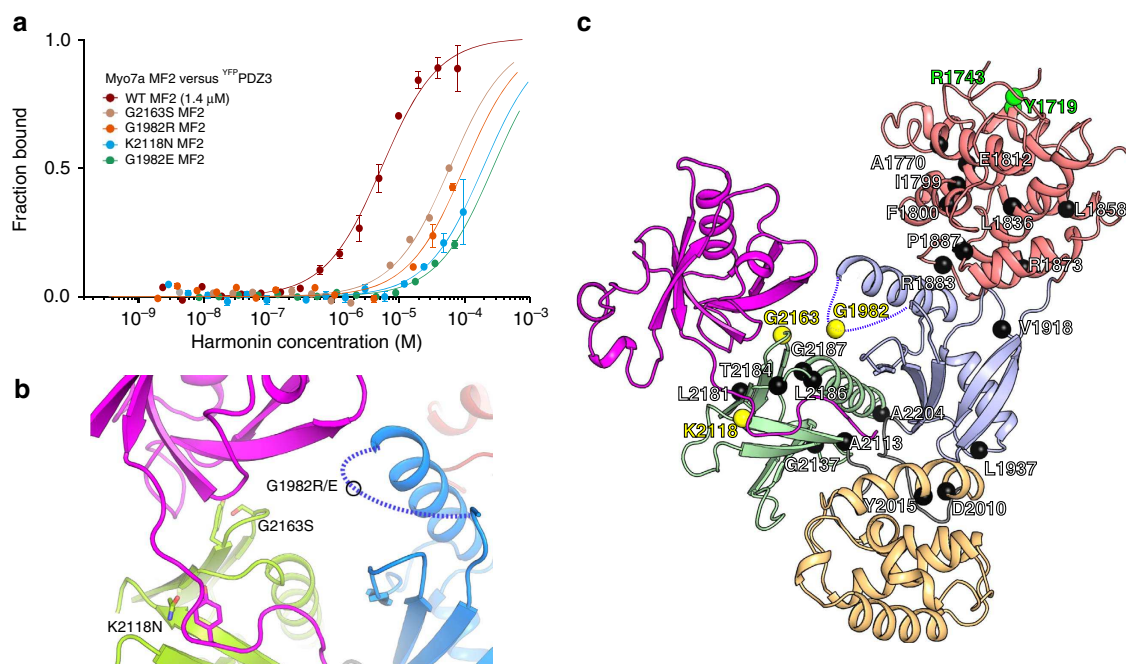


Figure 4 | Myo7a deafness mutations impair PDZ3c-MF2 interaction. (a) Analysis of the interactions between Myo7a MF2 deafness mutants and PDZ3c by MST. Averaged K_d s from two technical replicates (mean $\pm$ s.d.) are shown. All four mutants display weak binding affinities ($> 60 \mu$ M) (b) The location of the three surface mutations on the F1 (blue) and F3 (green) lobes of MF2 relative to PDZ3c (magenta) is shown. The missing loop in the F1 lobe is indicated by a dashed line. (c) The location of known deafness mutations found in Myo7a MF2 is shown in black spheres, with the mutants tested shown in yellow spheres (see also Supplementary Table 2 and Supplementary Movie 2).

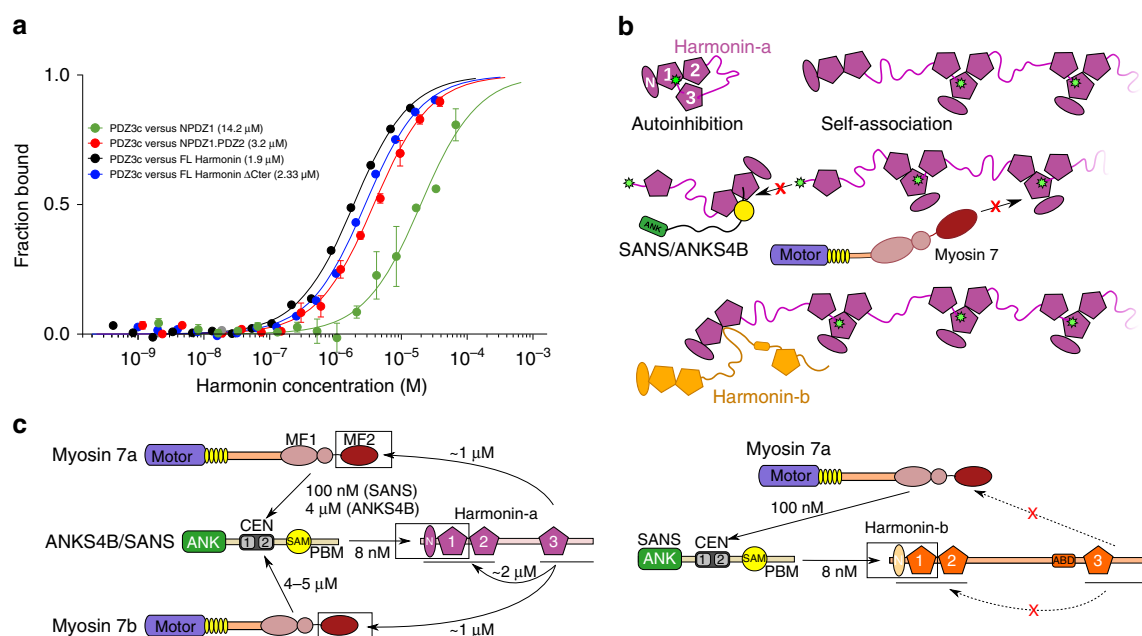


Figure 5 | Intramolecular interaction between the N- and C-terminus of harmonin and compatibility with Myo7 clustering. (a) Representative MST binding curves measuring the interactions between PDZ3c and NPDZ1, NPDZ1.PDZ2, FL-harmonin Δ Cter or FL-harmonin. The deduced K_d is indicated in parentheses. Averaged K_d s from two technical replicates (mean $\pm$ s.d.) are shown. (b) Proposed models of harmonin interactions. Top: Harmonin can exist in an autoinhibited state (autoinhibition) or can form a network (self-association) via its Cter (green star). Middle: SANS binding to the NPDZ1 domain of harmonin or harmonin-a binding to the Myo7 MF2 domain are incompatible with harmonin self-association. Bottom: Harmonin-b (orange) cannot self-associate via its Cter since its sequence differs. Instead, harmonin-b can participate into the network via its CC2 binding to NPDZ1.PDZ2. (c) Schematic diagrams summarizing the known interaction affinities within the tripartite complex involving harmonin isoforms. Left: Nearly identical interactions involving harmonin-a are found in microvilli and stereocilia, where ANKS4B and SANS can each bind to the MF1 of both Myo7 isoforms. Right: Interactions with harmonin-b in stereocilia will differ because its long Cter extension is not compatible with binding to MF2.

Table 5 Characterization of harmonin interactions.		
Harmonin auto-inhibition/self-association		K _d
NPDZ1	PDZ3c (isoA)	10.0 ± 3.0 μM (n = 3)*
	YFP PDZ3c (isoA)	14.2 μM
YFP NPDZ1	PDZ2-end (isoA)	4.2 μM
NPDZ1.PDZ2	YFP PDZ3c (isoA)	3.2 μM
YFP NPDZ1.PDZ2	PDZ3c (isoA)	5.2 μM
FL	YFP PDZ3c (isoA)	1.9 μM
YFP FL	PDZ3c (isoA)	1.4 μM
FL ΔCter	YFP PDZ3c (isoA)	2.3 μM
YFP NPDZ1.PDZ2	PDZ3 ΔCter	n.b.
YFP NPDZ1.PDZ2	PDZ3c (isoA) F551V-F552V	n.b.
PDZ2-end (isoA)	YFP PDZ3c (isoA)	n.b.
YFP NPDZ1.PDZ2	PDZ3c (isoB)	n.b.
YFP FL	NPDZ1	11.3 μM
YFP FL	NPDZ1.PDZ2	3.4 ± 0.1 μM (n = 2)
YFP FL	PDZ3 ΔCter	n.b.
FL	YFP FL ΔCter	2.5 μM
YFP FL	PDZ3c (isoA) F551V-F552V	n.b. (n = 2)
YFP FL	PDZ3c (isoA) D546R-F551V-F552V	n.b.
FL ΔCter	YFP NPDZ1.PDZ2	n.b.
YFP FL ΔCter	PDZ2-end	2.0 μM
YFP FL ΔCter	FL ΔCter	n.b. (n = 2)
YFP FL ΔCter	PDZ3c F551V-F552V	n.b.
PDZ3c (isoA)	YFP SANS _{CEN-PBM} + NPDZ1.PDZ2	w.b. (> 100 μM) (n = 2)
PDZ3c (isoA)	SANS _{CEN-PBM} + YFP NPDZ1.PDZ2	w.b. (> 100 μM)
PDZ3c (isoA)	SANS _{CEN-PBM} + YFP FL ΔCter	w.b. (> 100 μM)
PDZ3c (isoA)	YFP ANKS4b + NPDZ1.PDZ2	w.b. (> 100 μM)
PDZ3c (isoA)	ANKS4b + YFP NPDZ1.PDZ2	w.b. (> 100 μM)
n.b. and w.b. stand for no binding (no fit possible) and weak binding (the end of the curve is missing, and only a rough estimate of the K _d can be provided), respectively.		
*ITC result; n = number of independent experiments.		

PDZ3c and the PDZ2-end construct (Table 5), showing that PDZ1 is essential for the interaction. Altogether, these results suggest that the PDZ3c domain is likely positioned so that the PBM may bind to the PDZ1 domain, while PDZ2 contributes to the interaction. Although the measured affinities are not high, covalent linkage between these domains in FL-harmonin-a will drastically increase the apparent local concentration, favouring this interaction. Consistent with the existence of this potentially ‘auto-inhibited’ state of harmonin, small angle X-ray scattering (SAXS) studies showed that FL-harmonin adopts a shorter conformation ($R_g = 38.42 \pm 1.75 \text{ \AA}$, $D_{max} = 136.0 \text{ \AA}$) compatible with a ‘folded-back’ structure with Cter PBM bound to NPDZ1; while FL-harmonin-ΔCter is a more elongated molecule ($R_g = 43.41 \pm 1.53 \text{ \AA}$, $D_{max} = 156.1 \text{ \AA}$) (Supplementary Fig. 7b).

The ability of harmonin-a’s Cter to bind to PDZ1 could lead to a stable, auto-inhibited molecule or mediate inter-molecular self-associations (Fig. 5b, top). The PDZ3c domain binds to both FL- and FL-harmonin-ΔCter with similar affinities ($\sim 2 \mu\text{M}$) (Fig. 5a, Table 5), suggesting the harmonin opening/closing equilibrium is fast enough to allow association with PDZ3c. Importantly, the results demonstrate that self-association of harmonin molecules require the Cter motif and PDZ1 (Table 5). SANS_{CEN-PBM} and ANKS4B_{CEN-PBM} bind strongly to NPDZ1.PDZ2 (Table 4) and competition experiments show that this association abolishes PDZ3c binding (Table 5). Altogether, the data indicate a rather loose and dynamic auto-inhibited state of FL-harmonin-a that may form inter-molecular chains via Cter/PDZ1 interactions (Fig. 5b). This scaffold of harmonin-a would however be incompatible with Myo7 recruitment via either MF2 or MF1/ SANS (Fig. 5b). Whether FL-harmonin-a indeed can self-interact to form chains of higher oligomers and whether this network is impeded by SANS remain to be determined.

The CC2 of harmonin-b can interact with the NPDZ1.PDZ2 of harmonin present in all isoforms^{24,35} (Fig. 5b, bottom). Association of harmonin-b could promote formation of a network with F-actin attachment points via the ABD of harmonin-b (Fig. 1b). It would also leave the Myo7a MF2 domain available for interactions with other partners. Altogether, the data presented here extends our understanding of the interactions within the tripartite complex (Fig. 5c). They further highlight the potential mechanism of regulation by the presence and/or different concentrations of each member of the tripartite complex and how it may enable the assembly of diverse Myo7/adaptor/harmonin complexes.

Discussion

Cadherin-based connections are essential for the stability and function of stereocilia and microvilli as well as for sensing external forces at the cell surface. The results presented here reveal nearly identical interactions between members of the Myo7/harmonin-a/SANS:ANKS4B tripartite complexes that link cadherins to the actin-rich core in stereocilia and microvilli. Both Myo7a and Myo7b MF2 domains bind to harmonin-a PDZ3c with similar affinities via a novel mode. SANS and ANKS4B both can bind to the MF1 domains of either Myo7a or Myo7b, consistent with the conserved sequences and structures of their binding sites. Binding to SANS/ANKS4B provides Myo7 a second, indirect link to harmonin, allowing the formation of a tightly integrated tripartite complex. Furthermore, the interactions of harmonin-a’s Cter motif with either harmonin NPDZ1.PDZ2 or Myo7 MF2 may play a role in regulating tripartite complex assembly. Altogether, these results highlight the common global landscapes shared by the stereocilia and microvilli tripartite complexes.

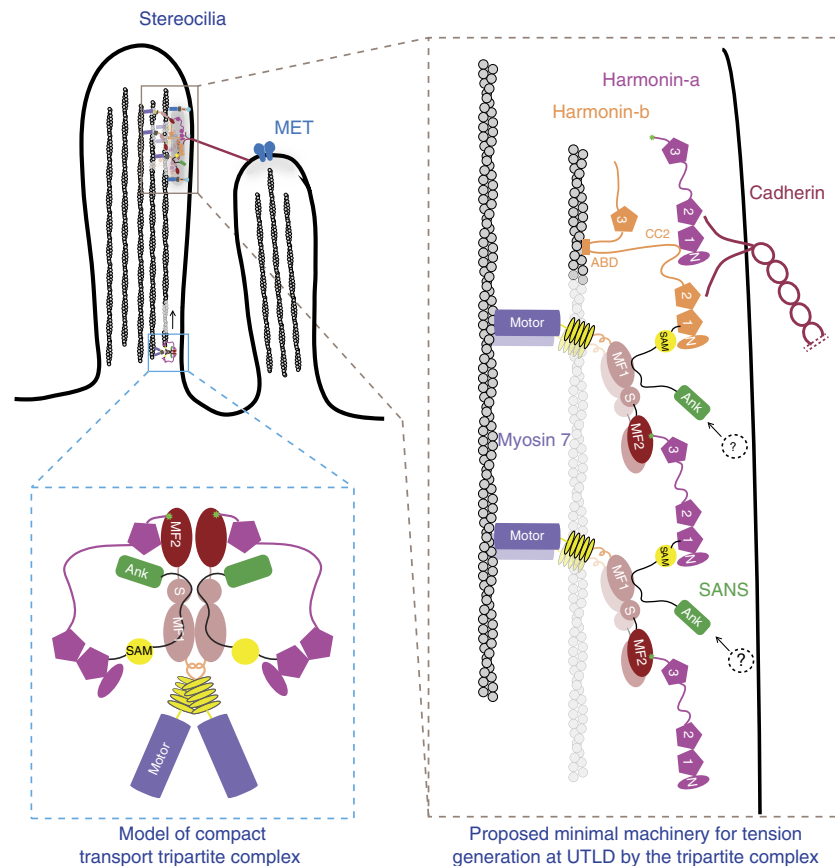


Figure 6 | The proposed Myo7a tip link complex. A cartoon view of stereocilia tip link. The upper tip link density (UTLD) is highlighted in grey. This region clusters several Usher syndrome proteins, as well as molecular motors implicated in adaptation such as Myo1c and Myo7a. A compact transport complex with Myo7a is shown at the base of the stereocilia moving up towards the tip link; and the proposed model shows that this complex consists of harmonin-a, SANS and Myo7a (blue box). Brown box: a proposed, much-simplified model showing a potential mechanism for Myo7a recruitment to the UTLD based on known interactions within the tripartite complex. Harmonin-a can crosslink two motors by interacting directly with a Myo7a via PDZ3c/MF2 interactions (mediated by the Cter motif, green star) and indirectly with another Myo7 via SANS/MF1. The motor in this case can be either monomeric or dimeric (shown in lighter colours; potentially promoted by SANS dimerization, see Fig. 3e). This network would be compatible with association between different harmonin isoforms. Harmonin-b (in orange) would provide the means to tether this network to actin filaments via its ABD while its CC2 region could extend the network by recruiting another harmonin. Thus, different numbers of Myo7a motors and harmonin-b could potentially be crosslinked and regulate the stiffness and extent of movement of this Usher protein assembly network, which would also bind the cadherin tails via harmonin. Also indicated is the potential interaction of the SANS ANK domain with other unknown partners (dotted circle). MET: mechano-electrical transduction channel.

Localization of tripartite complex members^{14,19,23,35,40,41} indicates that Myo7 likely functions both as a transporter and as a tension generator at the apical link of stereocilia and microvilli. The structural, biochemical, and mutagenesis data suggest the modular nature of the complex and how it could specify different roles for Myo7. For driving long-range transport, the association of harmonin-a to two sites of the same Myo7 tail (Fig. 3e, intradimer and interdimer; Fig. 6, blue box) would strengthen a stable and tightly packed tripartite complex, while preventing harmonin-a from self-association via its Cter motif (Fig. 5b). This ternary complex would form a compact cargo with an active, likely dimerized Myo7 able to walk on bundled actin filaments to deliver specific partners⁴². It should be noted that while forced dimers of Myo7 can move along filopodia or microvilli^{16,42}, little is known about native Myo7 dimerization and how its motor function is activated in the context of the tripartite complex.

Clustering of several motors at the apical links of microvilli or stereocilia is likely required to efficiently apply tension and respond to external forces. Multiple harmonin isoforms are expressed in sensory hair cells^{23,39}, and they may form different

networks of Usher proteins for clustering molecular motors and anchoring each type of link to the actin cytoskeleton. Stoichiometric cadherin/harmonin interaction has been proposed to cluster motors to the UTLD⁴³. However, the number of cadherin tails present at the stereocilia tip link^{10,44,45} is probably too low to cluster a sufficient number of motors¹⁴. A scaffold of harmonin-a formed via its N-ter/C-ter connections also cannot cluster motors to work as an assembly since this interaction is incompatible with direct recruitment of the Myo7 tail (Table 5, Fig. 5b).

A simple conceptual model for the potential role of harmonin-a in recruiting multiple Myo7a motors can be proposed (Fig. 6, brown box). The multidentate Myo7 tail binding sites in harmonin-a, together with its flexible linker region, could assemble tripartite complexes into a network connecting several Myo7 motors (see example in Fig. 3e, crosslinking by harmonin). While all of the binary interactions in this assembly are identical to those in the compact transport complex (Fig. 6, blue box), the flexibility within each protein allows the formation of distinct complexes. The harmonin CC region and/or linkers in SANS could allow the relative orientation

between each molecule to vary (Fig. 3d), potentially triggered by the increase in local concentration of the complex members and/or other signals present at the tip link, and thus promote 'clustering/crosslinking'. Self-association of harmonin-a would reduce the number of motors recruited; while SANS/ANKS4B binding to harmonin shifts the balance towards an organized scaffold that recruits molecular motors (Figs 5b and 6). The harmonin-b isoform, abundant at the stereocilia tip link, cannot bind either NPDZ1.PDZ2 or Myo7 MF2 via its extended Cter (Tables 1 and 5). Thus, clustering with harmonin-b would be based on its CC2-mediated interactions with NPDZ1.PDZ2 of other harmonins³⁵, as well as its binding to SANS; and would provide actin attachment points via its ABD. Changing the number of harmonin-b molecules participating in this network could impact the 'tightness' of the linkage between cadherins and the actin core, consistent with the phenotype of *Ush1c^{djcr-2/djcr-2}* mutant mice, where loss of harmonin-b leads to an impairment in the extent and speed of adaptation after a stereocilia deflection^{36,37}. Whether this simplest network or other types of assembly between harmonin and Myo7 molecules can form and would be adequate to apply force on cadherin tails requires further studies.

The molecular mechanism regulating tension/adaptation at the UTLD and the proteins involved are complex. The architecture of the Usher complex found at the stereocilia tip link needs to be tuned to contribute to the different sensitivities and selectivities from hair cell to hair cell specialized for different frequencies^{46–48}. An important property of the model presented in Fig. 6 is its ability to be tuned for different stiffness. The amount and ratio of harmonin-a and -b isoforms would control the 'spring' of this motor assembly, the number of links connecting cadherins to the actin cytoskeleton, and the response it could have to deformation and force generation. The expression profile of different harmonin isoforms within stereocilia bundles as well as along the length of the cochlea is not well-characterized. However, a base-to-apex gradient of harmonin mRNA expression in the cochlea was observed⁴⁹, suggesting that changes in harmonin levels could indeed contribute to determining hair cell responses and sensitivities to different frequencies. The ability of harmonin-b to self-assemble and to bind F-actin may thus represent a delicate and refined mechanism for regulating the dynamics of the tip link protein assembly. Thus, variations in the assembly and the architecture of the tripartite complexes associated with each type of link and the resulting number of connections the network makes to the actin cytoskeleton are likely achieved by differential expression of harmonin isoforms. Other partners and motors could participate in this network to further fine-tune adaptation. One such motor is Myo1c (refs 50,51) that is broadly distributed in hair cells and concentrated in UTLD^{51,52}. Whether and how Myo1c interacts with any member of the tripartite complex remains to be determined.

The interplay between Myo7 motors and various harmonin isoforms can result in distinct motor assemblies to fulfil specific developmental and mechanotransduction roles. Characterization of the force generated by motors and evaluation of the stiffness of different motor/harmonin assemblies is now needed to understand how those functions are accomplished. Isoform-specific functions as means of regulation has been observed for *espin*, *whirlin* and *Myo15* (refs 53–55), with distinct isoforms trafficking selectively to different locations within stereocilia to independently modulate stereocilia elongation. Consequently, the development, maintenance and mechanotransduction of these cellular protrusions are regulated through a sophisticated, multi-layered mechanism that involves not only the function of the individual proteins and their

constituent isoforms but also their precise expression, regulation and localization profiles. How the interchange between each isoform can direct the assembly of different complexes and how these networks orchestrate the intricate functions of cell mechanotransduction remain to be elucidated.

Note added in proof: While this paper was under final review, Li *et al.*⁷⁰ reported the structure of the binary harmonin-a PDZ3c/Myo7b MF2 complex and presented complementary biochemical and cell biological results on the interactions between the Myo7b tripartite complex proteins.

Methods

Construct design. The MF regions of the human Myo7a and Myo7b genes (UNIPROT Q13402-1; Q6PIF6, respectively) and harmonin-a (UNIPROT Q9Y6N9-1) were PCR cloned (Stratagene, Agilent or Gibson assembly, New England BioLabs) from available cDNA clones^{3,5} (the Myo7A clone was a kind gift of Dr Lee Sweeney). Regions encoding either the Myo7a's or Myo7b's MF1.SH3 and MF2 (Fig. 1) were cloned into a modified pET-14 plasmid (Novagen/EMD Millipore) whose thrombin cleavage site was replaced by an SSG linker. Human harmonin-a and ANKS4B were PCR amplified from full-length cDNA clones³ and cloned by TA cloning (Stratagene, Agilent). The full-length SANS gene and the 3' end of the harmonin-b gene encoding the C-terminal extension were synthesized (Genscript and IDTDNA, respectively). The region of interest for each gene was ligated into pGST-parallel vector⁵⁶ or a modified pET14 or pET14-YFP expression plasmid using standard restriction cloning methods. The resulting pGST-parallel harmonin constructs all have an N-terminal GST tag followed by a Tobacco Etch Virus protease cleavage site. The ANKS4B and SANS constructs all have an N-terminal 6xHis or 6xHis-YFP tag. Mutations or deletions were introduced either using the Quikchange Multi Lightning (Agilent) or Q5 Mutagenesis (New England Biolabs) systems per manufacturer's instructions. The sequences of primers and synthetic genes are listed in Supplementary Table 3.

Protein expression and purification. All 6xHis fusion proteins were expressed in either BL21-AI, BL21 (DE3) Rosetta (Invitrogen) or BL21-Gold (DE3) (Agilent) *Escherichia coli* at 20 °C after induction with 0.2 mM IPTG with or without 0.2% L-arabinose, accordingly. Selenomethionine derivatives were prepared using B834 (DE3) *E. coli* (Agilent) and Selenomethionine medium from Molecular Dimensions. The cells were collected by centrifugation, frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C. Frozen cells were thawed and lysed using a TS cell disruptor (Celd). The soluble fraction of the lysate was applied to a HisTrap FF crude column (GE Healthcare) and the His fused proteins were eluted with 20 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 0.5 mM PMSF and 300 mM imidazole. The proteins were further purified by ion exchange chromatography on a HiScreen CaptoQ column (GE Healthcare) and gel filtration on a Superdex 200 or Superdex 75 column (GE Healthcare) in final buffer containing 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 0.5 mM PMSF. The final pool was concentrated, flash-frozen in liquid N₂ and stored in small aliquots at –80 °C.

All harmonin constructs were expressed in BL21 (DE3) Rosetta (Invitrogen), as described above and purified using Glutathione Sepharose 4B affinity resin followed by size-exclusion chromatography. Samples submitted to ITC experiments or crystallization trials were digested with Tobacco Etch Virus protease and incubated with Glutathione Sepharose 4B resin. Small aliquots of purified harmonin constructs were flash-frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C. Mutants of MF or harmonin were purified similarly as wild type constructs.

Crystallization and structure determination. The Myo7b MF2 was crystallized using the hanging drop vapour diffusion method at 290 K by mixing 1:1 protein to reservoir solution (31–34% (v/v) PEG 400, 100 mM Tris-HCl pH 8.5 and 200 mM Li₂SO₄). The crystals were cryocooled in liquid nitrogen using the same reservoir solution. The selenomethionine derivative protein was crystallized in the same condition. The complex of Myo7b MF2 and harmonin-a PDZ3c was prepared by mixing the two proteins at 1:1.2 molar ratio and the sample was crystallized by mixing 1:1 protein to reservoir solution (7% (w/v) PEG 4000, 0.1 M HEPES pH 7.5, 50 mM MgCl₂) in hanging drops. The crystals were cryo-protected by sequential soaking in reservoir solution plus glycerol as a cryo-protectant and flash-frozen in liquid N₂. The complex of Myo7a MF2 and PDZ3c was prepared and crystallized similarly with reservoir solution containing 5% (w/v) PEG 4000, 0.1 M MES pH 6.5, 50 mM MgCl₂ and 10% (v/v) isopropanol. Crystals were optimized by microseeding and cryo-cooled in liquid N₂ in the reservoir solution plus 25% (v/v) glycerol.

X-ray data sets were collected at the Proxima-1 and Proxima-2 beamlines (SOLEIL synchrotron). The diffraction data sets were indexed and scaled with XDS⁵⁷. Phases for the Myo7b MF2 structure were calculated by the single isomorphous replacement with the anomalous signal (SIRAS) method using native and selenomethionine derivative crystals collected at the peak wavelength of selenium. Seven Se sites were found by autoSHARP⁵⁸, and an initial model was

built by cycling between density modification and model building^{59,60}. The model generated was refined with autoBUSTER (2.10.2; Global Phasing Ltd) and used as a search model for molecular replacement⁶¹ using the native data. The model was subsequently edited and refined with Coot⁶² and autoBUSTER. The Myo7b MF2-PDZ3c complex was solved by molecular replacement with Phaser⁶³ using the Myo7b MF2 structure as a search model. Model building and refinement were carried out with phenix.autobuild⁶⁴, Coot and phenix.refine⁶⁵. The structure of Myo7a MF2-PDZ3c was then solved by molecular replacement using Myo7b MF2-PDZ3c as a search model. The model building and refinement were carried out similarly in phenix.autobuild, Coot and phenix.refine. Statistics on the data collection for all the structures and crystallographic statistics of the final models are summarized in Table 2. All structural figures were prepared using PyMOL (www.pymol.org/).

Affinity measurements. Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements were performed on a Microcal iTC200 system (Malvern) at 10 °C. The protein samples were buffer-exchanged using PD-10 column (GE Healthcare) into 20 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.5 mM TCEP and 1 mM EGTA. Total of 3- μ l aliquots of sample in the syringe were injected into the sample in the cell at 200 s intervals, enough time for the titration peak to return to the baseline. The titration data were analysed using Origin 7.0 (Microcal) using a single binding site model.

Microscale thermophoresis (MST) measurements were performed on a Monolith NT.115 (Nanotemper Technologies) using YFP-fusion proteins. Two-fold dilution series (16 in total) of the non-fluorescent protein were performed in the interaction buffer (20 mM Hepes pH 7.0, 100 mM NaCl (150 mM for FL-Harmonin-a), 1 mM EGTA, 0.5 mM TCEP and 0.05% (v/v) Tween 20). The YFP-fused partner was kept at a constant concentration of 100 nM. The samples were loaded into premium capillaries (Nanotemper Technologies) and heated for 30 s at 50% laser power. The affinity was quantified by analysing the change in thermophoresis as a function of the concentration of the titrated protein using the NTAanalysis software provided by the manufacturer.

For all affinity measurements, protein quality and monodispersity was assessed by Dynamic Light Scattering in interaction buffer (20 mM Hepes pH 7.0, 100 mM NaCl (150 mM for FL-Harmonin-a), 1 mM EGTA, 0.5 mM TCEP) with a DynaPro Plate Reader II (Wyatt Technology) at 20 °C. Only proteins and complexes displaying a single population with polydispersity <25% were used.

SEC-MALS. Absolute molar masses of proteins were determined using size-exclusion chromatography combined with multi-angle light scattering (SEC-MALS). Protein samples (30.0 μ l at $\sim$ 20 mg ml⁻¹) were loaded onto a Superdex 10/300 Increase column (GE Healthcare) in 20 mM Tris pH 7.0, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA and 0.5 mM TCEP at 0.5 ml min⁻¹ using a Dionex UltiMate 3000 HPLC system. The column output was fed into a DAWN HELEOS II MALS detector (Wyatt Technology). Data were collected and analysed using Astra X software (Wyatt Technology). Molecular masses were calculated across eluted protein peaks.

Small angle X-ray scattering experiments. SAXS data for the harmonin constructs were collected on the SWING beamline at the SOLEIL synchrotron (λ = 1.033 Å). 50 μ l of FL-harmonin or FL Δ Cter at $\sim$ 2 mg ml⁻¹ were injected onto a size-exclusion column (SEC-3 300 Å Agilent), using an Agilent HPLC system⁶⁶ in 20 mM HEPES pH 7.0, 200 mM NaCl, 0.5 mM TCEP and 1 mM EGTA. Data reduction, frame averaging and buffer subtraction were done in FOXTROT, a dedicated home-sourced software, and the subsequent data processing and analysis were carried out with PRIMUS and other programs of the ATSAS suite⁶⁷. The radius of gyration R_g was derived by the Guinier approximation using PRIMUS. The program GNOM⁶⁸ was used to compute the pair-distance distribution functions, $p(r)$ and the maximum dimension of the macromolecule, D_{max} .

Data availability. The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org, with accession numbers 5MV7 (Myo7b.MF2), 5MV8 (Myo7b.MF2/PDZ3c), 5MV9 (Myo7a.MF2/PDZ3c). The authors declare that all relevant data supporting the findings of this study are available on reasonable request.

References

- Michalski, N. & Petit, C. Genetics of auditory mechano-electrical transduction. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* **467**, 49–72 (2015).
- Hudspeth, A. J. Integrating the active process of hair cells with cochlear function. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 600–614 (2014).
- Crawley, S. W. *et al.* Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* **157**, 433–446 (2014).
- El-Amraoui, A. & Petit, C. Usher I syndrome: unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J. Cell Sci.* **118**, 4593–4603 (2005).
- Crawley, S. W., Weck, M. L., Grega-Larson, N. E., Shifrin, D. A. & Tyska, M. J. ANKS4B is essential for intermicrovillar adhesion complex formation. *Dev. Cell* **36**, 190–200 (2016).
- Goodyear, R. J., Marcotti, W., Kros, C. J. & Richardson, G. P. Development and properties of stereociliary link types in hair cells of the mouse cochlea. *J. Comp. Neurol.* **485**, 75–85 (2005).
- Petit, C. & Richardson, G. P. Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function. *Nat. Neurosci.* **12**, 703–710 (2009).
- Gillespie, P. G. & Müller, U. Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell* **139**, 33–44 (2009).
- Kazmierczak, P. & Müller, U. Sensing sound: molecules that orchestrate mechanotransduction by hair cells. *Trends Neurosci.* **35**, 220–229 (2012).
- Kazmierczak, P. *et al.* Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* **449**, 87–91 (2007).
- Bahloul, A. *et al.* Cadherin-23, myosin VIIa and harmonin, encoded by Usher syndrome type I genes, form a ternary complex and interact with membrane phospholipids. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3557–3565 (2010).
- El-Amraoui, A. & Petit, C. The retinal phenotype of Usher syndrome: pathophysiological insights from animal models. *C. R. Biol.* **337**, 167–177 (2014).
- Senften, M. *et al.* Physical and functional interaction between protocadherin 15 and myosin VIIa in mechanosensory hair cells. *J. Neurosci.* **26**, 2060–2071 (2006).
- Grati, M. & Kachar, B. Myosin VIIa and sans localization at stereocilia upper tip-link density implicates these Usher syndrome proteins in mechanotransduction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 11476–11481 (2011).
- Hasson, T. *et al.* Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J. Cell Biol.* **137**, 1287–1307 (1997).
- Weck, M. L., Crawley, S. W., Stone, C. R. & Tyska, M. J. Myosin-7b promotes distal tip localization of the intermicrovillar adhesion complex. *Curr. Biol.* **26**, 2717–2728 (2016).
- Kros, C. J. *et al.* Reduced climbing and increased slipping adaptation in cochlear hair cells of mice with Myo7a mutations. *Nat. Neurosci.* **5**, 41–47 (2002).
- Self, T. *et al.* Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells. *Development* **125**, 557–566 (1998).
- Blanco-Sánchez, B., Clément, A., Fierro, J., Washbourne, P. & Westerfield, M. Complexes of Usher proteins preassemble at the endoplasmic reticulum and are required for trafficking and ER homeostasis. *Dis. Model. Mech.* **7**, 547–559 (2014).
- Riazuddin, S. *et al.* Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function. *Hum. Mutat.* **29**, 502–511 (2008).
- Wu, L., Pan, L., Wei, Z. & Zhang, M. Structure of MyTH4-FERM domains in myosin VIIa tail bound to cargo. *Science* **331**, 757–760 (2011).
- Li, J., He, Y., Lu, Q. & Zhang, M. Mechanistic basis of organization of the harmonin/USH1C-mediated brush border microvilli tip-link complex. *Dev. Cell* **36**, 179–189 (2016).
- Boëda, B. *et al.* Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J.* **21**, 6689–6699 (2002).
- Siemens, J. *et al.* The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 14946–14951 (2002).
- Pan, L., Yan, J., Wu, L. & Zhang, M. Assembling stable hair cell tip link complex via multidentate interactions between harmonin and cadherin 23. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 5575–5580 (2009).
- Wei, Z., Yan, J., Lu, Q., Pan, L. & Zhang, M. Cargo recognition mechanism of myosin X revealed by the structure of its tail MyTH4-FERM tandem in complex with the DCC P3 domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 3572–3577 (2011).
- Planelles-Herrero, V. J. *et al.* Myosin MyTH4-FERM structures highlight important principles of convergent evolution. *Proc. Natl Acad. Sci.* **113**, E2906–E2915 (2016).
- Hirano, Y. *et al.* Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain. *EMBO J.* **30**, 2734–2747 (2011).
- Gingras, A. R., Liu, J. J. & Ginsberg, M. H. Structural basis of the junctional anchorage of the cerebral cavernous malformations complex. *J. Cell Biol.* **199**, 39–48 (2012).
- Doyle, D. A. *et al.* Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **85**, 1067–1076 (1996).
- Songyang, Z. *et al.* Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**, 73–77 (1997).
- Yan, J., Pan, L., Chen, X., Wu, L. & Zhang, M. The structure of the harmonin/sans complex reveals an unexpected interaction mode of the two Usher syndrome proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 4040–4045 (2010).

33. Ye, F. & Zhang, M. Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem. J.* **455**, 1–14 (2013).
34. Wang, C. K., Pan, L., Chen, J. & Zhang, M. Extensions of PDZ domains as important structural and functional elements. *Protein Cell* **1**, 737–751 (2010).
35. Adato, A. *et al.* Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 347–356 (2005).
36. Grillet, N. *et al.* Harmonin mutations cause mechanotransduction defects in cochlear hair cells. *Neuron* **62**, 375–387 (2009).
37. Michalski, N. *et al.* Harmonin-b, an actin-binding scaffold protein, is involved in the adaptation of mechanoelectrical transduction by sensory hair cells. *Pflugers Arch.* **459**, 115–130 (2009).
38. Johnson, K. R. *et al.* Mouse models of USH1C and DFNB18: phenotypic and molecular analyses of two new spontaneous mutations of the Ush1c gene. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 3075–3086 (2003).
39. Verpy, E. *et al.* A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat. Genet.* **26**, 51–55 (2000).
40. Caberlotto, E. *et al.* Usher type 1G protein sans is a critical component of the tip-link complex, a structure controlling actin polymerization in stereocilia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 5825–5830 (2011).
41. Lefèvre, G. *et al.* A core cochlear phenotype in USH1 mouse mutants implicates fibrous links of the hair bundle in its cohesion, orientation and differential growth. *Development* **135**, 1427–1437 (2008).
42. Sakai, T. *et al.* Structure and regulation of the movement of human myosin VIIA. *J. Biol. Chem.* **290**, 17587–17598 (2015).
43. Wu, L., Pan, L., Zhang, C. & Zhang, M. Large protein assemblies formed by multivalent interactions between cadherin23 and harmonin suggest a stable anchorage structure at the tip link of stereocilia. *J. Biol. Chem.* **287**, 33460–33471 (2012).
44. Kachar, B., Parakkal, M., Kurc, M., Zhao, Y. & Gillespie, P. G. High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 13336–13341 (2000).
45. Corey, D. P. & Sotomayor, M. Hearing: tightrope act. *Nature* **428**, 901–903 (2004).
46. Fettiplace, R. & Ricci, A. J. Adaptation in auditory hair cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 446–451 (2003).
47. Eatock, R. A. Adaptation in hair cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 285–314 (2000).
48. Ricci, A. J., Crawford, A. C. & Fettiplace, R. Tonotopic variation in the conductance of the hair cell mechanotransducer channel. *Neuron* **40**, 983–990 (2003).
49. Yoshimura, H. *et al.* Deafness gene expression patterns in the mouse cochlea found by microarray analysis. *PLoS ONE* **9**, e92547 (2014).
50. Holt, J. R. *et al.* A chemical-genetic strategy implicates myosin-1c in adaptation by hair cells. *Cell* **108**, 371–381 (2002).
51. Gillespie, P. G. & Cyr, J. L. Myosin-1c, the hair cell's adaptation motor. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 521–545 (2004).
52. Steyger, P. S., Gillespie, P. G. & Baird, R. A. Myosin Ibata is located at tip link anchors in vestibular hair bundles. *J. Neurosci.* **18**, 4603–4615 (1998).
53. Ebrahim, S. *et al.* Alternative splice forms influence functions of whirlin in mechanosensory hair cell stereocilia. *Cell Rep.* **15**, 935–943 (2016).
54. Fang, Q. *et al.* The 133-kDa N-terminal domain enables myosin 15 to maintain mechanotransducing stereocilia and is essential for hearing. *Elife* **4**, e08627 (2015).
55. Ebrahim, S. *et al.* Stereocilia-staircase spacing is influenced by myosin III motors and their cargos espin-1 and espin-like. *Nat. Commun.* **7**, 10833 (2016).
56. Sheffield, P., Garrard, S. & Derewenda, Z. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of 'parallel' expression vectors. *Protein Expr. Purif.* **15**, 34–39 (1999).
57. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
58. Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. & Bricogne, G. Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol. Biol.* **364**, 215–230 (2007).
59. Cowtan, K. Recent developments in classical density modification. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 470–478 (2010).
60. Cowtan, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 1002–1011 (2006).
61. Vagin, A. & Teplyaev, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022–1025 (1997).
62. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
63. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
64. Terwilliger, T. C. *et al.* Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **64**, 61–69 (2008).
65. Afonine, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **68**, 352–367 (2012).
66. David, G. *et al.* Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 892–900 (2009).
67. Petoukhov, M. V. *et al.* New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* **45**, 342–350 (2012).
68. Svergun, D. IUCr. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503 (1992).
69. Laskowski, R. A. & Swindells, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 2778–2786 (2011).
70. Li, J. *et al.* Structure of Myo7b/USH1C complex suggests a general PDZ domain binding mode by MyTH4-FERM myosins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E3776–E3785 (2017).

Acknowledgements

We thank beamline scientists of PX1, PX2 and SWING (SOLEIL synchrotron) for excellent support during data collection and G.Jousset for assistance with cloning. We thank Drs P.Martin, H.Lee Sweeney and N.Courtemanche for critical reading of the manuscript. We are grateful to Drs M.Tyska and H.Lee Sweeney for sharing cDNA clones. V.J.P.-H. is the recipient of a fourth year fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer. M.A.T. was supported by NSF Grant MCB-1244235 and the University of Minnesota Foundation; A.H. was supported by grants from the CNRS, ANR-13-BSV8-0019-01, FRM ING20140129255, Ligue Nationale Contre le Cancer and Association pour la Recherche sur le Cancer – Subvention Fixe. The AH team is part of Labex CelTisPhyBio 11-LBX-0038 and IDEX PSL (ANR-10-IDEX-0001-02-PSL).

Author contributions

I.-M.Y. and V.J.P.-H. contributed equally to this work. I.-M.Y. and V.J.P.-H. determined X-ray structures and analysed them with A.H. V.J.P.-H. collected and analysed the SAXS data. Biochemical experiments were performed by Y.S. and M.A.T. with the help of H.S., I.-M.Y. and C.K. MST experiments were performed by D.M., V.J.P.-H. and H.S. ITC experiments were performed by D.S. A.H. conceived the project and oversaw the experiments. A.H. and M.A.T. analysed the results and wrote the manuscript with help from V.J.P.-H. and I.-M.Y.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

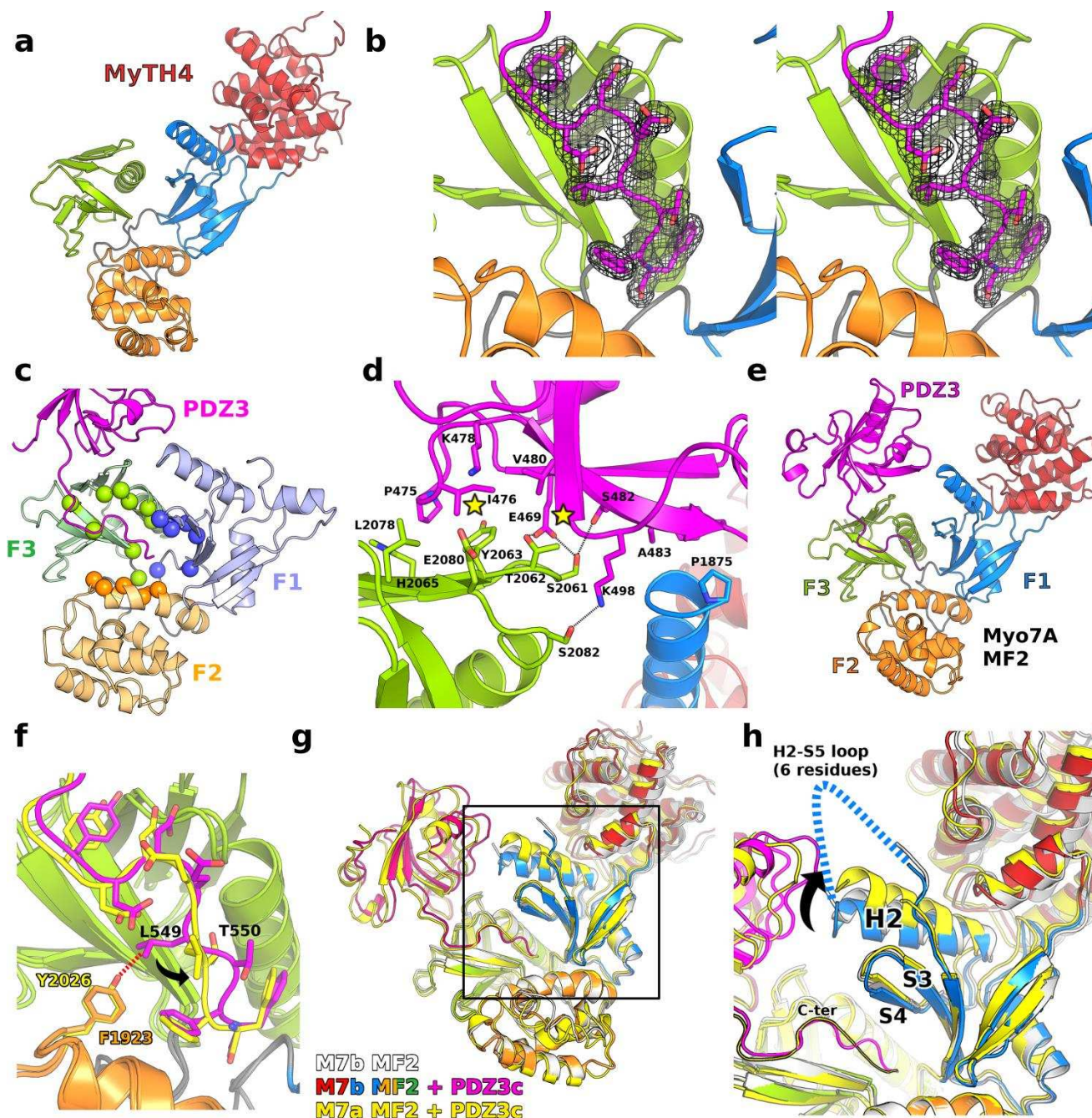
How to cite this article: Yu, I.-M. *et al.* Myosin 7 and its adaptors link cadherins to actin. *Nat. Commun.* **8**, 15864 doi: 10.1038/ncomms15864 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



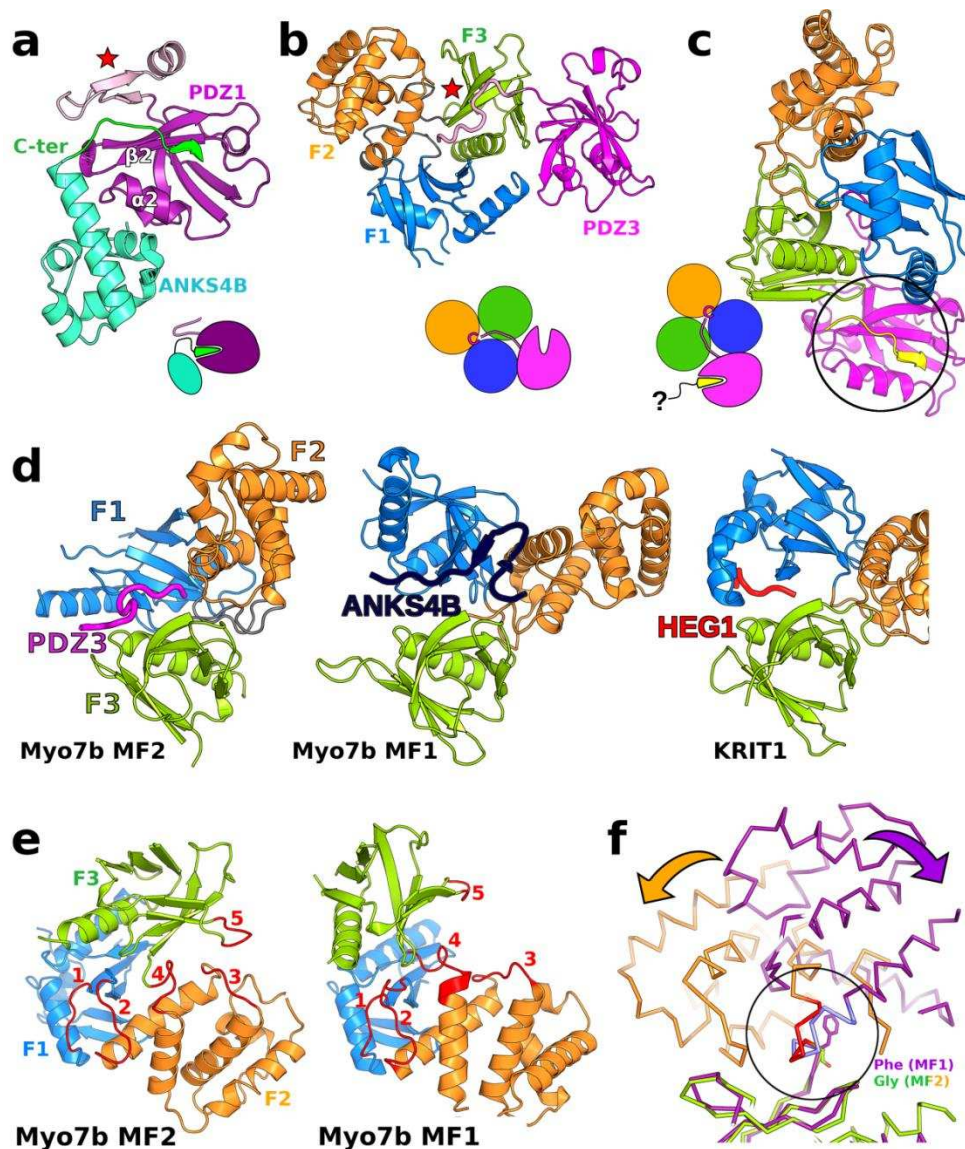
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017



Supplementary Figure 1 – Details of the Harmonin PDZ3 recognition by Myo7 MF2.

(a) Ribbon representation of the Myo7b MF2 structure. **(b)** Stereo image of the binding pocket for the PDZ3c/Myo7b MF2 structure. The $2F_o - F_c$ density map of PDZ3 C-terminal extension contoured at 1σ is shown in black. **(c)** Residues that define the groove specificity for polypeptide chain binding in the FERM domain are shown with balls (colored according to the lobe they belong to). **(d)** Interface between the harmonin PDZ3 domain (magenta) and the Myo7b MF2 F1 (blue) and F3 (green) lobes. Similar interactions are also formed in the Myo7a MF2/PDZ3c structure. The stars indicate the mutated PDZ3 residues E469 and I476. **(e)** Ribbon representation of the structure of the harmonin PDZ3c/Myo7a MF2 complex. Binding of PDZ3c to Myo7a MF2 results in the buried solvent accessible surface area of $1135 \text{ \AA}^2$ ($400 \text{ \AA}^2$ from PDZ3 domain and $735 \text{ \AA}^2$ from Cter). **(f)** Structural basis of harmonin PDZ3c binding to Myo7a and Myo7b MF2. The C-ter extension (Myo7b in magenta, Myo7a in yellow) adopts a different conformation (black arrow) in order to accommodate the Y2026's extra hydroxyl group (the steric clash is indicated with a red dash line). **(g)** Superimposition of Myo7b MF2 free (white), PDZ3c/Myo7b MF2 (multicolored) and PDZ3c/Myo7a MF2 (yellow) using the F2 lobe as a reference. **(h)** Details of the structural comparison of the boxed region shown in (g) centered on the F1 lobe. Note that the relative position of the F1 (blue)/F2 (orange) lobes is conserved. In contrast, variability within the F1 lobe (H2 helix, S3 and S4 strands and the loop that connects them) can impact the position of elements that face the central FERM cavity. These elements vary between the three structures (black arrow), and can fine-tune the binding site of the FERM groove, modulating the interactions in the groove. The H2-S5 loop (missing in the three crystal structures) is represented with a dash line.



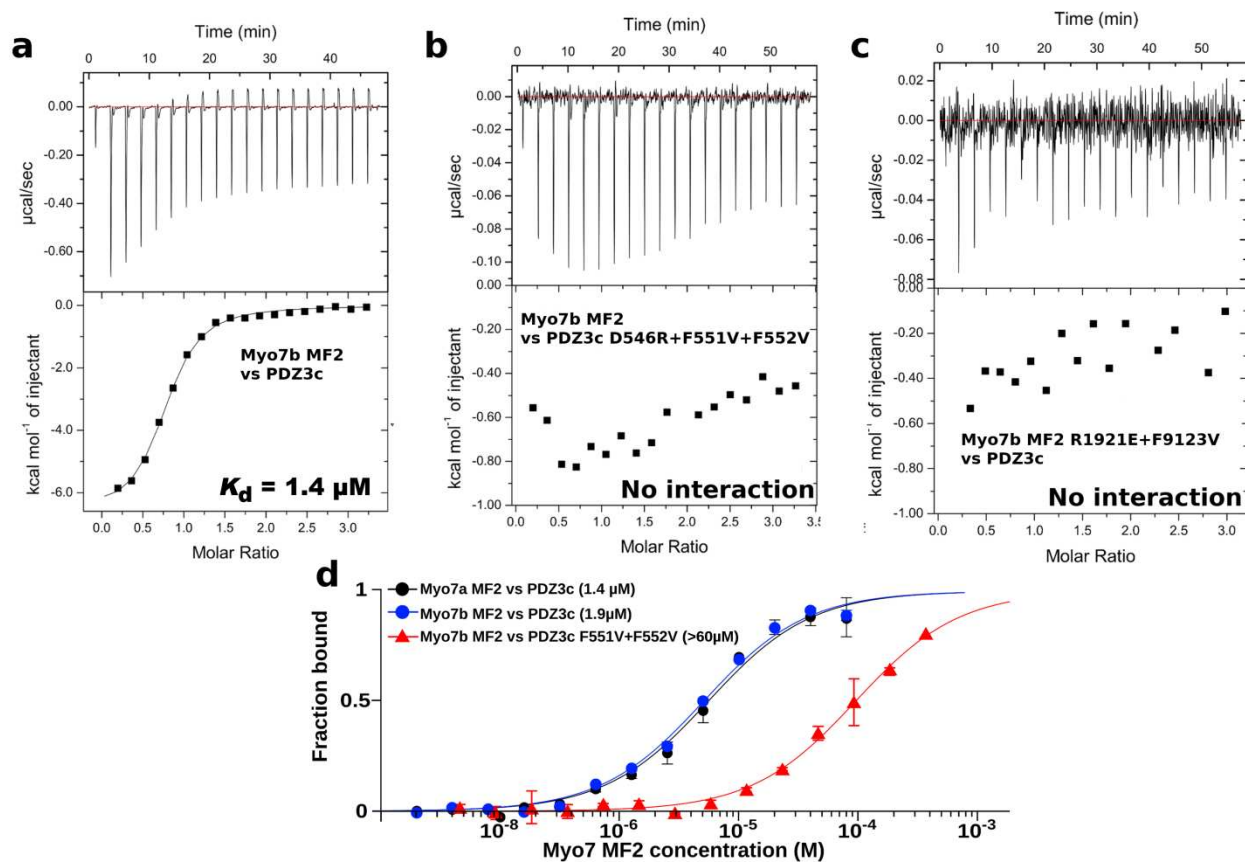
Supplementary Figure 2 – Different modes of binding for PDZ and MyTH4-FERM domains

(a-c) Examples showing the importance of the N- or C-ter extension of PDZ domain in partner recognition. **(a)** The structure of harmonin NPDZ1 and SANS SAM-PBM complex (3K1R) showing the Cter extension (light pink, red star) of harmonin PDZ1 (dark purple) folds into a minidomain and together with PDZ1 form a groove in which the SANS SAM domain and its Cter extension (containing the PBM, green) fit specifically and form strong interactions¹. **(b)** The Cter extension of harmonin PDZ3 (magenta) uses a different binding mode to interact with Myo7b MF2, as determined in this study. In this case the Cter motif extends away from the PDZ fold and binds strongly within the FERM lobes while few interactions form between the FERM and the PDZ3 domains. **(c)** The harmonin PDZ3 canonical binding groove (circle) remains free to interact with other proteins, even after formation of the Myo7b MF2/PDZ3c complex. The PDZ3 domain is predicted to belong to Class II PDZ and the tail of another protein (yellow) may thus be accommodated². **(d)** Representation of the FERM domain of Myo7b MF2 (left, this study), Myo7b MF1 (center, 5F3Y) and KRIT1 (right, 4HDQ) bound to different partners. The F3 lobe (green) is shown in the same orientation while the position/orientation of the F1 and F2 lobes differs greatly. Note that the three partners take advantage of the FERM central cavity, but PDZ3c goes deeper and interacts with all three lobes. **(e)** Location of the five linkers (red) that determine the relative position of the three lobes of the FERM domain shown in Myo7b MF2 (left) and Myo7b MF1 (right) with the F1 lobe in a similar orientation. The sequence of the linkers is variable (Supp Fig. 3) and in large part dictates the lobe orientation. **(f)** Comparison of the F2/F3 interface of Myo7b MF2 (green/orange) and MF1 (purple), with F3 lobes aligned. A significant sequence change in linker 4 (blue (MF1)/red (MF2)) is shown (Phe1387_{MF1}/Gly2008_{MF2}). As a consequence, the F2 lobe orientation changes drastically relative to the F3 lobe (arrows).



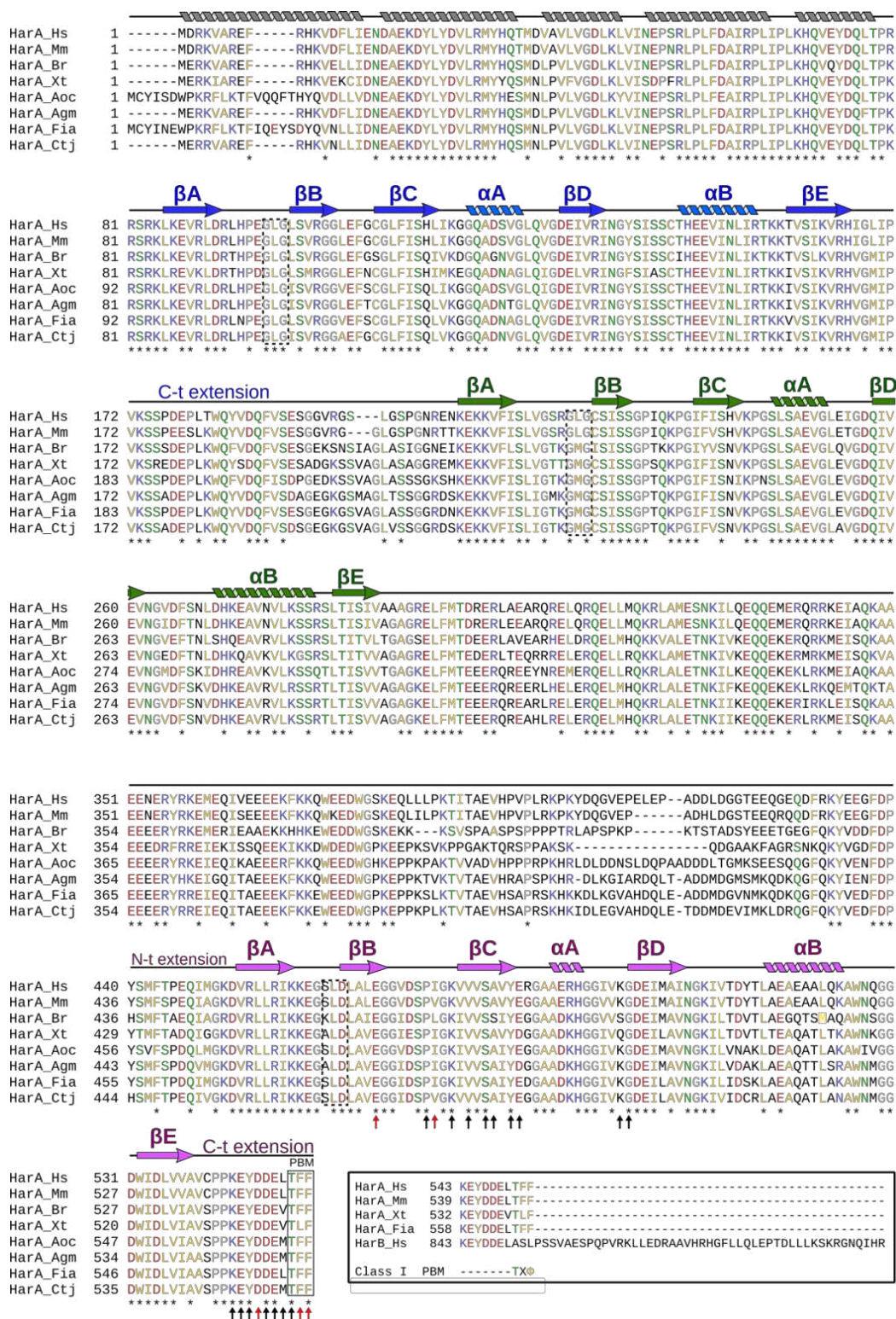
Supplementary Figure 3 – Comparison of FERM domains from Myo7 and Myo15

Structure based alignment MF1 and MF2 domains of human and mouse Myosin 7a (different isoforms), 7b and 15. Highly conserved residues are colored in yellow (hydrophobic), blue (positively charged), red (negatively charged), green (polar) and grey (glycine and proline). The linkers that dictate the relative position of the FERM lobes are indicated with red bars (1 to 5). Blue, orange and green spheres correspond to residues that define the internal pocket in the FERM domain (Supplementary Fig. 1C). Highlighted in pink in linker 4 are the phenylalanine (MF1) and the glycine (MF2) residues found between the F2-H5 and the F3-S1 elements that are crucial for the relative position of the FERM lobes (Supplementary Fig. 2F). Black and white arrows indicate the missense mutations found in the MF2 of Myo7a (Fig. 4C) and analysed in Supplementary Table 3; while the white arrows specify residues that are strictly conserved between the aligned sequences. Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*. Sequences used for analysis are available under UNIPROT accession numbers Q13402 (Myo7a Hs), P97479 (Myo7a Mm), Q6PIF6 (Myo7b Hs), Q99MZ6 (Myo7b Mm) and Q9UKN7 (Myo15 Hs).



Supplementary Figure 4 – Direct recognition of Harmonin by the Myo7 MF2 domain

Representative ITC (**a-c**) and MST (**d**) binding curves showing the interaction between PDZ3c and Myo7 MF2 and the effects of mutations on the interaction. Details on the temperature and buffers used are in Materials and Methods. The average of two technical replicates (mean±s.d.) are shown for each measurement.



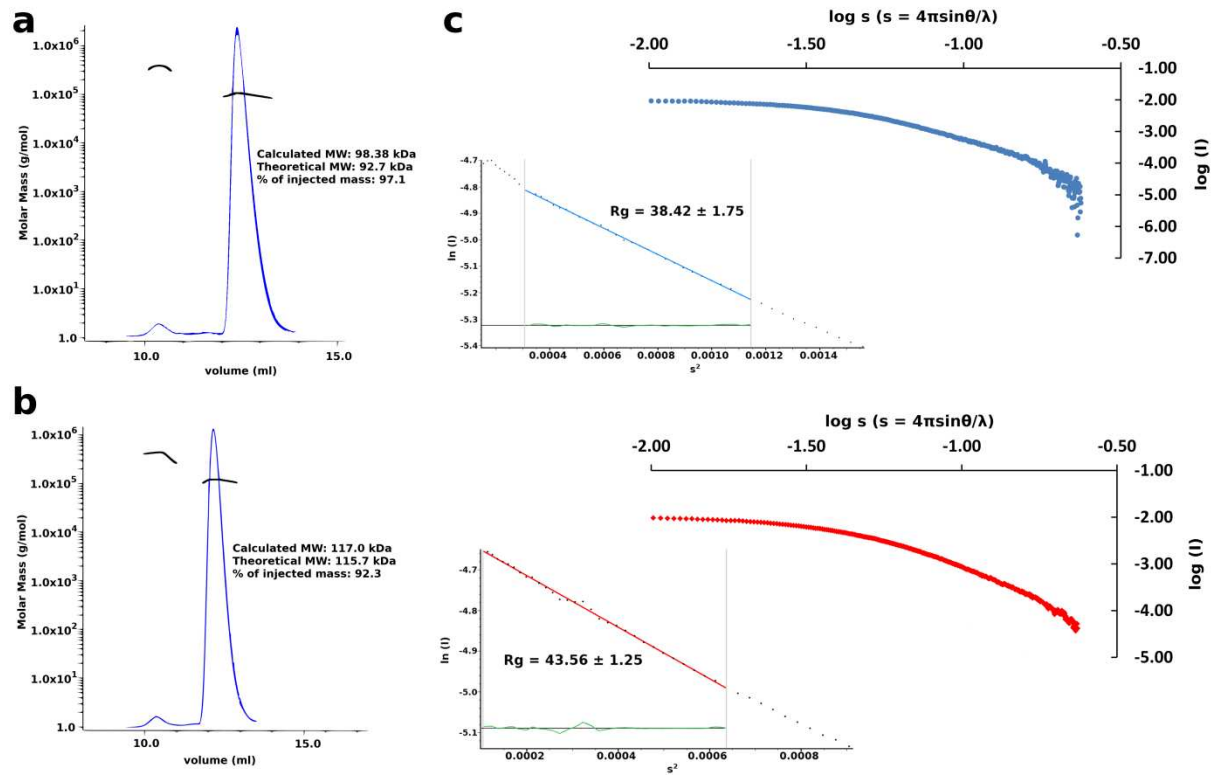
Supplementary Figure 5 – Harmonin-a is highly conserved in vertebrates

Alignment of harmonin-a from different vertebrates. Highly conserved residues are colored as in Supplementary Fig. 3. Residues strictly conserved are indicated with a star. The known secondary structural elements are shown above: grey (N-terminal domain), blue (PDZ1), green (PDZ2) and magenta (PDZ3). Dashed boxes highlight the canonical carboxylate-binding site of PDZ domains (the GLG motif in PDZ1 and PDZ2 binds class-I PBM while the SLD motif in PDZ3 could recognize class-II PBM²). The PBM in the C-terminal tail is also shown. Residues that participate in MF2 binding in the crystal structures are indicated with black arrows. Red arrows represent residues mutated and assayed for their effect on PDZ3c binding to Myo7a and Myo7b MF2. The box presents an alignment of the harmonin PDZ3 C-ter extension sequences compared to the human isoform b and a class I PBM. The Hs, Mm, Br, Xt, Aoc, Agm, Fia and Ctj abbreviations stand for *Homo sapiens* (RefSeq accession no. NP_001284693), *Mus musculus* (NP_001157205), *Brachydanio rerio* (NP_001035018), *Xenopus tropicalis* (NP_001096522), *Anolis carolinensis* (XP_016848700), *Alligator mississippiensis* (KYO22100), *Ficedula albicollis* (NC_021677) and *Coturnix japonica* (XP_01571962), respectively.



Supplementary Figure 6 – Structure based alignment of vertebrate Myosin 7a and b MF2

Conserved residues are colored as in Supplementary Fig. 3. The secondary structure elements of each lobe are indicated in red (MyTH4), blue (F1), orange (F2) and green (F3). Residues participating in the binding of the PDZ3 Cter are indicated with arrows, while residues interacting with the rest of the PDZ3 domain are indicated with circles. Red arrows correspond to residues found important for the binding of the PDZ3 Cter from mutation analysis. The Y2026/F1923 difference between Myo7a and Myo7b at the end of the F2 H1 helix that changes the positioning of the PDZ3 Cter and its interaction with the FERM domain is highlighted with a red box and a # symbol. As a result, the residue F2115/F2012 (blue arrow) interacts with the PDZ3 Cter in Myo7a but not in Myo7b. The Hs, Mm, Xt, Aoc, Agm, Fia and Ctj abbreviations stand for *Homo sapiens* (RefSeq accession numbers NP_000251 [Myo7a] and NP_001073996 [Myo7b], *Mus musculus* (NP_001243010, NP_115770), *Xenopus tropicalis* (XP_004912319, XP_002936659), *Anolis carolinensis* (XP_016852070, XP_016847423), *Alligator mississippiensis* (XP_019334939, XP_019341661), *Ficedula albicollis* (XP_016157295, XP_00505100) and *Coturnix japonica* (XP_01570798, XP_015726488), respectively.



Supplementary Figure 7 – SEC-MALS and SAXS characterisation of members of the tripartite complex

(a) and **(b)**: SEC-MALS elution profiles displaying the plots of the refractometer (blue) and molar mass (black line) vs. elution time of the Myo7a MF1.SH3 + SANS_{CEN-PBM} (a) and Myo7a MF1.SH3 + SANS_{CEN-PBM} + NPDZ1 (b) complexes. **(c)** Full-Length (FL) Harmonin-a1 adopts a compact form in solution. Differences in the conformation of FL (top, blue) versus FL_{ΔCter} harmonin (bottom, red) as determined by SAXS analysis.

Supplementary Table 1 – RMSD comparison between the Myo7b MF2 domain and other known MF structures.

PDB ID codes: Myo7a.MF1 (3PVL) – Myo7b.MF1 (5F3Y) – DdMyo7.MF1 (5EJY) – DdMyo7.MF2 (5EJR) – Myo10.MF (3PZD) – Myo7a.MF2 (this study, 5MV9) and Myo7b.MF2 (this study, 5MV8).

MYTH4 domain (residues 1608-1797 in Myo7b) 145 Cα in the core + 45 Cα for the variable Nter extension		
Myo7a MF2 (P1711-T1900)	0.466 for 124 Cα atoms	The MyTH4 core is well conserved. The major difference corresponds to the orientation of the last helix that interacts strongly and orients the F1 lobe (Myo10 and DdMF2). The Nter extension is different in Myo10, while strong similarities exist among all Myo7 MFs. Splice variants can drastically change the surface of this domain among Myo7 MF1 isoforms. This variability occurs on the MF surface in which the F3 lobe also participates.
Myo7b MF1	0.918 for 120 Cα atoms	
Myo7a MF1	0.795 for 100 Cα atoms	
Myo10 MF	1.892 for 100 Cα atoms	
DdMyo7 MF1	1.151 for 109 Cα atoms	
DdMyo7 MF2	1.355 for 101 Cα atoms	
F1 domain (residues 1798-1892 in Myo7b, 93 Cα)		
Myo7a MF2	0.579 for 73 Cα atoms	The fold of the F1 lobe core is well conserved. The major differences are seen in the H2 helix and the very flexible linker that precedes it. The linkers between the MyTH and F1, and the F1 and F2 lobes are quite variable allowing distinct relative position of these subdomains. The S1, S2, H1 helices are constrained by these inter-domain interactions while more dynamic variability is possible for the rest of the lobe (S3, S4, H2 helix and S5) allowing adaptability for the central groove of the FERM.
Myo7b MF1	0.953 for 65 Cα atoms	
Myo7a MF1	0.800 for 63 Cα atoms	
Myo10 MF	0.831 for 45 Cα atoms	
DdMyo7 MF1	0.898 for 61 Cα atoms	
DdMyo7 MF2	0.946 for 47 Cα atoms	
F2 domain (residues 1904-2002 in Myo7b, 99 Cα)		
Myo7a MF2	0.619 for 80 Cα atoms	The core of the F2 lobe is well conserved. It is formed by a bundle of helices connected by flexible loops. Note that Myo10 has a drastically different surface for this lobe due to longer H2 and H3 helices, a big insertion between them and a distinct conformation for the H3-H4 loop (18).
Myo7b MF1	2.888 for 75 Cα atoms	
Myo7a MF1	2.551 for 68 Cα atoms	
Myo10 MF	1.203 for 64 Cα atoms	
DdMyo7 MF1	7.389 for 83 Cα atoms	
DdMyo7 MF2	1.532 for 81 Cα atoms	
F3 domain (residues 2010-2097 in Myo7b, 88 Cα)		
Myo7a MF2	0.395 for 80 Cα atoms	The F3 fold is very well conserved. Some variability exists in the loops connecting the strands linked to both distinct sequence and flexibility. Note that DdMyo7 MF1 has a deformation in the S5 strand, preventing the ‘classic’ binding of FERM partners along this surface (18). In Myo7b MF1, the large rmsd compared to other F3 lobe is linked to a distinct orientation of the S5.S6.S7 beta sheet relative to the other structural elements.
Myo7b MF1	1.917 for 34 Cα atoms	
Myo7a MF1	1.635 for 58 Cα atoms	
Myo10 MF	0.979 for 59 Cα atoms	
DdMyo7 MF1	1.145 for 63 Cα atoms	
DdMyo7 MF2	1.301 for 74 Cα atoms	

Supplementary Table 2 – Analysis of 25 missense mutations in the Myo7a MF2 domain implicated in human deafness. The location of the mutations is shown in Fig. 4C.

Mutation	Domain	Predicted effect of the mutation	Reference
R1861stop		Truncated myosin lacking MF2	3
E1716X			4
K1737fs			
Q1798X			
E1917X			
G1942X			
R2024X			
Q2071X			5
C2182X			6
Y1719C	MyTH4 N-ter linker Non pathogenic	On the Nter extension of the MyTH4 domain. Faces outside – or could be at the interface with the SH3 domain.	7,8,9
R1743W	MyTH4 N-ter linker	On the Nter extension of the MyTH4 domain. Arginine faces the solvent – the tryptophan may disrupt the conformation of this Nter extension and potentially disrupt the interface with the SH3 domain of the Myo7 tail or with other unknown partners.	4,6
A1770D	MyTH4 H1 helix	internal – important for the folding of MyTH domain Charge inside the hydrophobic core of the MyTH4 domain.	4
L1799P	MyTH4 H2 helix	internal – important for the folding of MyTH domain Introduces proline in the middle of the helix – would destabilize the fold	10
F1800I	MyTH4 H2 helix	internal – important for the folding of MyTH domain Substitution with a smaller residue inside the hydrophobic core of the MyTH4 domain. Low protein level in cells.	6
E1812K/R	MyTH4 H3 helix	internal – important for the folding of MyTH domain Interaction with L1756. Disrupts interaction between N-ter linker and MF core.	11
L1836P	MyTH4 H4 helix	internal – important for the folding of MyTH domain Pro in the middle of the H4 helix. Disruption of the folding.	12
L1858P	MyTH4 H5 helix	internal – important for the folding of MyTH domain Pro inside the H5 helix. Disruption of the folding. This is near the putative SANS binding site in the MyTH4.	4,13
R1873W/Q	MyTH4 H6 helix	Important for the MyTH/FERM F1 interface	14
R1883Q	MyTH4 H6-H7 linker	Important for the MyTH/FERM F1 interface This is in the highly conserved RPE motif in the MyTH4-F1 interface. R to Q will disrupt the interaction with E1891 and thus the correct folding of the MyTH4-F1 interface	4
P1887L	MyTH4 H6-H7 linker	Important for the MyTH/FERM F1 interface This is in the highly conserved RPE motif in the MyTH4-F1 interface. Introduction of a Leucine would disrupt the folding.	13
V1918E	F1 lobe – S2 strand	internal – important for the folding of F1 domain Charge is introduced in the hydrophobic core of the F1 lobe.	15
L1937P	F1 lobe – end of helix 1	internal – important for the folding of F1 domain Pro at this position would destabilize the folding of the F1 lobe.	16
G1982R*	F1 lobe – disordered loop	In a disordered variable loop – prevents harmonin PDZ3c binding.	17
G1982E			18
D2010N	F2 lobe	internal – important for the folding of F2 domain D2010 is involved in specific interactions that stabilize the F2 lobe.	4
Y2015H			
A2113P	F3 lobe – S1 strand	internal – important for the folding of F3 domain Pro at the beginning of the F3 strand would destabilize the folding. + close to the binding site of the harmonin PDZ3-Cter	19
K2118N	F3 lobe	On the surface of the F3 lobe – close to the entrance of the groove. Prevents harmonin PDZ3c binding.	20
G2137E	F3 lobe	internal – important for the folding of the F3 lobe G2137 is in a small hydrophobic pocket. Glu will disrupt the folding.	21
G2163S	F3 lobe	Glycine in the F3 strand that is the most used for binding partner interactions (integrin, DCC, selectin, CD43, ICAM-2...). Prevents harmonin PDZ3c binding.	5,7,19,22
L2181P	F3 lobe	internal – important for the folding of F3 domain Introducing a proline at this position likely destabilizes the interactions between the beta strands and thus the integrity of the F3 lobe.	23
T2184M	F3 lobe	internal – important for the folding of F3 domain Met would be directed in the hydrophobic core of the F3 lobe. There is no room for the side chain and this thus destabilizes the fold of the F3 lobe.	23
L2186P	F3 lobe	internal – important for the folding of F3 domain Pro at the beginning of the F3 last helix. Not compatible with the folding. + close to the binding site of the harmonin PDZ3-Cter	24
G2187D	F3 lobe	internal – important for the folding of F3 domain Asp is not compatible with the F3 lobe folding (clashes)	13
A2204P	F3 lobe	internal – important for the folding of F3 domain This mutation would introduce a proline in the last F3 helix and would likely destabilize this helix and thus the F3 fold.	12

* Note that due to differences in the organism and isoform, this mutation is mentioned as G1933R in the referred article

Supplementary Table 3 – Primers and Synthesized Genes

Construct name	Residues
<i>Myosin 7a</i> (Q13402-2)*	
M7a MF1.SH3	F: taactcgaggatccggct R: CTGCCTCTGATCGGGAGT
M7a MF2	F: GCGTGCCAAGCCCTACACGCTGGAGGAGTTTTCC R: acctcgggctccgctGCCGCTGCTGTGATGATG
^{YFP} M7a MF2	F: acagctgaaCCCGAGGTGCGTGCCAAG R: gccgctgtgtgatgatg F: catcacagcagcggcgtagcaagggcgaggagctg R: gctgatccggcgccggtcacgaa
M7a MF2 G1982R	F: CATCAAGGACcgtATTGTGCCCTC R: GGCCGAGCTTTCTTTATC
M7a MF2 G1982E	F: TGTTCCTCACTCACCTACCAG R: ATtctGCTTGTATGGGCCGAGC
M7a MF2 K2118N	F: TCTTCGAGGTTaacCAAACACTACGGAGCC R: AGGCTGAGCCAAAGGTGG
M7a MF2 G2163S	F: CACGTACTTCCACATCACCATTGG R: TTgctGCTGCTCCAGTTGGAGAT
<i>Myosin 7b</i> (Q6PIF6-1)	
M7b MF1.SH3	F: catatgGCGGAGGAGCCTGAGGAGG R: ctcgagctaCCTCTTCTGTTGACATGG
^{YFP} M7b MF1.SH3	F: catcacagcagcggcgtagcaagggcgaggagctg R: GCCGCTGCTGTGATGATGATG
M7b MF1.SH3 A1128E	F: AAGCAGCCTGgaaCGGGGCTGGA R: GTTTTGAAGTTCTCCGAGAGCTGC
M7b MF1.SH3 A1128E-R1129E-K1192E	F: AAGCAGCCTGgaaGGCTGGATCC R: GTTTTGAAGTTCTCCGAGAGC F: GCAGGCTGTGaaTCCAAGAAGCAC R: AGTCCAGCCAGGTGGG
M7b MF1.SH3 K1194E-K1195E-R1171E-R1172E	F: TGTCAAGTCCgaggAGCACATCCCC R: GCCTGCAGCTCCAGCCAG F: CGAGCGCCTGgaaGaaACCTATGCCAATGGGG R: GCACAGAAGGGGCCGTAG
M7b MF2	F: AAGGAAAAGCTGCACACCC R: ATGGCCGCTGCTGTGAT
^{YFP} M7b MF2	F: CATAAGGAAAAGCTGCACACCC R: cagcttttcttatggctgccctgaaaatacaggttttc F: catcatcacagcagcggcgtagcaagggcgaggagc R: gccgctgtgtgatgatgatg
M7b MF2 L2083W	F: CTGCTGTGCGAGACCTctggGGGTATAAGATGGATGACC'
M7b MF2 R1921E-F1923W	F: CTGCCCAAGTACCTGgaaGGAgtcCACAAAGTTTCGCGGGAGGATGC
<i>Harmonin-a1 (USH1C)</i> (Uniprot: Q9Y6N9-1)	
Full length (FL)-harmonin	F: agatctATGGACCGAAAAGTGGCC R: actagtctaGAAGAAGGTCAGCTCATCGTC
^{YFP} FL	F: agatctATGGACCGAAAAGTGGCC R: actagtctaGAAGAAGGTCAGCTCATCGTC
FL ΔCter	F: ggtggGCAGACGGCAACCACAAG R: agcaTAGACTAGTCGCGGCCGC
^{YFP} FL ΔCter	F: ggtggGCAGACGGCAACCACAAG R: agcaTAGACTAGTCGCGGCCGC
NPDZ1	F: ggatccggagcagcaATGGACCGAAAAGTGGCC R: ctcgagctaGCCTCGCACGCCCCAGATT
^{YFP} NPDZ1	F: tagactagttaactgctaacaagcccgaaaggaag R: GCCTCGCACGCCCCAGAA
NPDZ1.PDZ2	F: ggatccggagcagcaATGGACCGAAAAGTGGCC R: ctcgagctaCCGGTCTGTATGAACAG
^{YFP} NPDZ1.PDZ2	F: CCGTCTGTGCATGAACAG R: tagactagttaactgctaac
PDZ2-end	F: agatctGGCGTGCAGGCGAGCCTG R: actagtctaGAAGAAGGTCAGCTCATCGTC
PDZ3c (isoA)	F: agatctCAGGATTTCCGAAATA R: actagtctaGAAGAAGGTCAGCTCATCGTC
^{YFP} PDZ3c (isoA)	F: agatctCAGGATTTCCGAAATA R: actagtctaGAAGAAGGTCAGCTCATCGTC
PDZ3c (isoA) F551V-F552V	F: CGTCTGCCCCCAAGGAGTATGACGATGAGCTGACCgtcgtcTA
PDZ3c (isoA) D546R-F551V-F552V	F: CGTCTGCCCCCAAGGAGTATaggGATGAGCTGACCgtcgtcTA
^{YFP} PDZ3c (isoA) E469A	F: CTGGCCCTGgcaGGCGGTGTG R: GTCTAAGGATCCCTCTTCTTGATGC
^{YFP} PDZ3c (isoA) I476W	F: GGAATCCCCctggGGGAAGGTGTTGTTTCTG R: ACACCGCTTCCAGGGCC
^{YFP} PDZ3c (isoA) E469A-I476W	I476W mutation (above) introduced into ^{YFP} PDZ3c (isoA) E469A
PDZ3c _{ΔCter}	F: agcatagactagtcgcccgc R: ggtggGCAGACGGCAACCACAAG
<i>Harmonin-b3</i> (Uniprot: Q9Y6N9-5)	
PDZ3c _{isoB}	GGATCCTTAGACCTGGCCCTGGAAGGCGGTGTGGACTCCCCATTGGGAAGGTG GTTGTTTCTGCTGTGTATGAGCGGGAGCTGCTGAGCGGCATGTTGGCATTGTGA

fragment synthesized by IDTDNA	AAGGGGACGAGATCATGGCAATCAACGGCAAGATTGTGACAGACTACACCTGG CTGAGGCTGACGCTGCCCTGCAGAAAGGCTTGAATCAGGGCGGGGACTGGATCG ACCTGTGGTTGCCGTCTGCCCCCAAGGAGTATGACGATGAGCTAGCTTCTCTT CCCTCCTCGTAGCTGAAAGCCCCAACCGGTCCGAAAGCTCCTTGAAGACCGTGC TGCCGTGCACAGACACGGGTTCTCTGAGCTGGAGCCACGGACCTTCTCTGA AGTCCAAAAGGGGAAACCAATTACCGTTAGACTAGT
SANS (<i>USH1G</i>) (Uniprot: Q495M9)	
SANS full-length gene synthesized by GENSCRIPT	ATCTAGAATGGGACACCACCACCACCACATGAATGACCAATACCACCGTGCTG CCCGGACGGCTATCTGGAAGTGTGAAAGAGGCCACCGTAAAGAACTGAACGC TCCGGATGAGGACGGCATGACCCCTACTCTGTGGCCGCTTACCACGAAATCTG GAGAGTCTGCGTCTGATCGTTTCGCGCGGTGGCGATCCGACAAGTGCATATTT GGGGTAACACGCCACTGCATCTGGCGGCAAGCAATGGCCACCTGCATTGCCTGAG TTTCTGGTGTCTTTGGCGGAACATCTGGTGTCTGGATAATGACTACACATCTC CCCTGGATATGGCCGCTATGAAAGGTCATATGGAGTGCCTCCGCTATCTGGACAG CATCGCGGCAAAACAGAGCTCCCTGAACCCAAAGCTGGTTGGCAAGCTGAAAGAT AAGGCCCTCCGTGAAGCTGAGCGTCGCATTGCGAATGTGCAAGCTGCAACGTC GCCACATGAACGTATGGAGCGTCGCTACCGTCGCAACTGGCTGAGCGCAGCG ACACCTGTCTTTTCTTCACTGACGAGTTCGACCTGTCCCGTCTGCTGCAACACC TGGCTCTGGGTTCTCATCTGCCTTATTCACAAGCGACTGCACGGTACGGCACGT GGCAAAACCAAGATGCAGAAAGAACTGGAACGTCGCAAAACAGGAGGTGAGGG TACTTCAAAGTCAGCAAGATGGCCGTAAGTCCGCACGCAGTCTGTGGGACTG CAACTGGGTTCCGACGTGATGTTCTCCGTCAAGGAACCTACGCAACCCCAAGG AGTGGGTCGTGCACCACTGCGCGATATGTTTCTGTGATGAAGACAGCGTTTTC CGCGCAACTCTGGCCGCTGAACCTGCTCACAGTGAGGTGTCGACGGATAGCGGCC ATGACTCACTGTTACGCGTCTGGTCTGGGCACTATGGTGTTCGTGCAACTAT CTGTCTTGGACTGCACGCACTGGGTCGTGAAGATGGCGACTGGACGGTGTG GGAGCGCCGCTGGTCCCTGCAATCTTACCTAGTCTGGACGATGACTCCCTGG GTTCTGCAAAATCACTGCAAGACCGTAGCTGCGCGAAGAGCTGCCGTGGGATGA GCTGGACCTGGGTCTGGATGAAGACCTGGAACCCGAGACCTCTCACTGGAGACT TTCTGGCCTCACTGCATATGGAAGATTTTGGCGCACTGCTGCGCCAGGAAAAAT TGACCTGGAGGCTCTGATGCTGTGTTCTGATCTGGACCTGCGTTCTATCTCAGTGC CGCTGGGCCCTCGCAAGAAATTCTGGGAGCCGTCCGCCGCCCGCTCAAGCAAT GGAACGCCGCCGCACTGGAAGACACTGAACGTGAACCTGCACTG
SANS _{CEN-PBM}	F: catatgGATAGCGGCCATGACTCACTG R: ctcgagTTACAGTTCACTGTCTTCCAG
YFP SANS _{CEN-PBM}	F: catatgGATAGCGGCCATGACTCACTG R: ctcgagTTACAGTTCACTGTCTTCCAG
ANKS4B _{CEN-PBM}	F: catatgAGTGTGCACCATGAATCCATTC R: ctcgagCTACAGGCTGGTGTGACACAG
YFP ANKS4B _{CEN-PBM}	F: catatgAGTGTGCACCATGAATCCATTC R: ctcgagCTACAGGCTGGTGTGACACAG

All primer sequences are listed from 5' end to 3' end, with nucleotides corresponding to sequences not encoded in the Myo7 or adapter gene (i.e. linkers or vector sequences) indicated in lowercase letters and altered codons in lowercase bold letters. Note that some codons were changed to facilitate cloning, in those cases the changes were non-mutagenic.

Supplementary Movie 1 – Myo7b MF2 FERM central cavity is very different from those of Myo7b and Myo7a MF1

Structural superimposition between Myo7b MF2 FERM (multi-colored), Myo7b MF1 (yellow) and Myo7a MF1 (violet) using the F1 lobe as a reference. The central cavity between the three FERM lobes (F1, F2 and F3) is drastically different between MF1 and MF2, explaining the binding selectivity between MF1 and MF2 partners.

Supplementary Movie 2 – Position of the 25 missense mutations found in Myo7a MF2

Representation of the missense mutations found in the MF2 of Myo7a (spheres). The spheres are colored following the color code used in Fig. 4C. The MF lobes are colored in red (MyTH4), blue (F1), orange (F2) and green (F3). The PDZ3c of Harmonin is in purple.

Supplementary References:

1. Yan, J., Pan, L., Chen, X., Wu, L. & Zhang, M. The structure of the harmonin/sans complex reveals an unexpected interaction mode of the two Usher syndrome proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4040–5 (2010).
2. Siemens, J. *et al.* The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14946–14951 (2002).
3. Adato, A. *et al.* Mutation profile of all 49 exons of the human myosin VIIA gene, and haplotype analysis, in Usher 1B families from diverse origins. *Am.J.Hum.Genet* **61**, 813–821 (1997).
4. Jacobson, S. G. *et al.* Usher syndromes due to MYO7A, PCDH15, USH2A or GPR98 mutations share retinal disease mechanism. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2405–2415 (2008).
5. Brownstein, Z. *et al.* Novel myosin mutations for hereditary hearing loss revealed by targeted genomic capture and massively parallel sequencing. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**, 768–775 (2013).
6. Liu, X. Z. *et al.* Mutations in the myosin VIIA gene cause a wide phenotypic spectrum, including atypical Usher syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 909–12 (1998).
7. Janecke, A. R. *et al.* Twelve novel myosin VIIA mutations in 34 patients with usher syndrome type I: Confirmation of genetic heterogeneity. *Hum. Mutat.* **13**, 133–140 (1999).
8. Cuevas, J. M. *et al.* Identification of three novel mutations in the MYO7A gene. *Hum. Mutat.* **14**, 181 (1999).
9. Boulouiz, R. *et al.* Analysis of MYO7A in a Moroccan family with Usher syndrome type 1B: novel loss-of-function mutation and non-pathogenicity of p.Y1719C. *Mol. Vis.* **13**, 1862–5 (2007).
10. Jiang, L. *et al.* Comprehensive molecular diagnosis of 67 Chinese Usher syndrome probands: high rate of ethnicity specific mutations in Chinese USH patients. *Orphanet J. Rare Dis.* **10**, 110 (2015).
11. Riahi, Z. *et al.* Whole exome sequencing identifies mutations in usher syndrome genes in profoundly deaf tunisian patients. *PLoS One* **10**, (2015).
12. Jaijo, T. *et al.* MYO7A mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins. *J. Med. Genet.* **44**, e71 (2007).
13. Bharadwaj, a K., Kasztejna, J. P., Huq, S., Berson, E. L. & Dryja, T. P. Evaluation of the myosin VIIA gene and visual function in patients with Usher syndrome type I. *Exp. Eye Res.* **71**, 173–181 (2000).
14. Roux, A.-F. *et al.* Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *J. Med. Genet.* **43**, 763–8 (2006).
15. Chen, Y. *et al.* Targeted next-generation sequencing in Uyghur families with non-syndromic sensorineural hearing loss. *PLoS One* **10**, e0127879 (2015).
16. Sodi, A. *et al.* MYO7A and USH2A gene sequence variants in Italian patients with Usher syndrome. *Mol. Vis.* **20**, 1717–31 (2014).
17. Riazuddin, S. *et al.* Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function. *Hum. Mutat.* **29**, 502–511 (2008).
18. Jacobson, S. G. *et al.* Retinal disease course in Usher syndrome 1B due to MYO7A mutations. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 7924–7936 (2011).
19. Atik, T. *et al.* Comprehensive analysis of deafness genes in families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PLoS One* **10**, (2015).
20. Naz, S. *et al.* Genetic causes of moderate to severe hearing loss point to modifiers. *Clin. Genet.* (2016). doi:10.1111/cge.12856
21. Lévy, G. *et al.* Myosin VIIA gene: heterogeneity of the mutations responsible for Usher syndrome type 1B. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 111–6 (1997).
22. Diaz-Horta, O. *et al.* Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing Loss. *PLoS One* **7**, (2012).
23. Yoshimura, H., Miyagawa, M., Kumakawa, K., Nishio, S. & Usami, S. Frequency of Usher syndrome type 1 in deaf children by massively parallel DNA sequencing. *J. Hum. Genet.* **61**, 1–4 (2016).
24. Bonnet, C. *et al.* Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis. *Orphanet J. Rare Dis.* **6**, 21 (2011).

Highly selective inhibition of myosin motors provides the basis of potential therapeutic application

Serena Sirigu^{a,b,1}, James J. Hartman^{c,1}, Vicente José Planelles-Herrero^{a,b,1}, Virginie Ropars^{a,b}, Sheila Clancy^c, Xi Wang^c, Grace Chuang^c, Xiangping Qian^c, Pu-Ping Lu^c, Edward Barrett^d, Karin Rudolph^d, Christopher Royer^d, Bradley P. Morgan^c, Enrico A. Stura^e, Fady I. Malik^c, and Anne M. Houdusse^{a,b,2}

^aStructural Motility, Institut Curie, Paris Sciences et Lettres Research University, CNRS, UMR 144, F-75005 Paris, France; ^bSorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie Univ Paris06, Sorbonne Universités, Institut de Formation Doctorale, 75252 Paris cedex 05, France; ^cPredclinical Research and Development, Cytokinetics, Inc., South San Francisco, CA 94080; ^dLovelace Respiratory Research Institute, Albuquerque, NM 87108-5127; and ^eCommissariat à l'Énergie Atomique, Direction des Sciences du Vivant, Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Edited by J. G. Seidman, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved October 7, 2016 (received for review June 9, 2016)

Direct inhibition of smooth muscle myosin (SMM) is a potential means to treat hypercontractile smooth muscle diseases. The selective inhibitor CK-2018571 prevents strong binding to actin and promotes muscle relaxation in vitro and in vivo. The crystal structure of the SMM/drug complex reveals that CK-2018571 binds to a novel allosteric pocket that opens up during the “recovery stroke” transition necessary to reprime the motor. Trapped in an intermediate of this fast transition, SMM is inhibited with high selectivity compared with skeletal muscle myosin (IC₅₀ = 9 nM and 11,300 nM, respectively), although all of the binding site residues are identical in these motors. This structure provides a starting point from which to design highly specific myosin modulators to treat several human diseases. It further illustrates the potential of targeting transition intermediates of molecular machines to develop exquisitely selective pharmacological agents.

myosin | actin | drug design | molecular motor | specific allosteric drugs

Myosins comprise a family of ATP-dependent motor proteins capable of producing directed force via interaction with their track, the F-actin filament. Force production by these motors powers numerous cellular processes such as muscle contraction, intracellular transport, and cell migration and division (1). Several myosins have also been linked to genetic disorders where either gain or loss of motor function can lead to disease. These motor proteins represent promising targets for the development of drugs modulating force production in cells, tissues, and muscle (2–4). Here we report a selective, small-molecule inhibitor of smooth muscle myosin (SMM) able to induce muscle relaxation. This mechanism of action has potential relevance for many diseases where smooth muscle contractility is central to the pathophysiology, such as asthma (5, 6) and chronic obstructive pulmonary disease (7).

Smooth muscle contractility can be activated through different pathways. Existing airway smooth muscle relaxants, such as β -adrenergic agonists and muscarinic antagonists, ultimately inhibit the activity of SMM. However, they do so via specific upstream signaling pathways. Direct inhibition of SMM contractility has the advantage of relaxing contracted smooth muscle regardless of the molecular stimulus driving it. Moreover, application of SMM inhibitors to the airway provides a means of selectively modulating contractility of these tissues by delivering a high local concentration of drug. We thus set about identifying selective inhibitors of SMM that can effectively relax muscle in vivo, leading to the discovery of a highly selective, small-molecule inhibitor, CK-2018571 (CK-571).

The detailed inhibitory mechanism of CK-571 was elucidated by a combination of in vitro characterization of the step in which the drug traps the motor and determination of the high-resolution structure of SMM cocrystallized with CK-571. The drug targets an intermediate state that occurs during the recovery stroke, the large conformational rearrangement that enables repriming of the motor. Blocking this critical transition thus results in efficient inhibition of force production. The SMM/CK-571 structure not only

reveals how the drug stops the motor but also provides important insights about drug specificity. Our study establishes that the drug works via an inhibitory mechanism that has not been previously described for a molecular motor, revealing a potentially powerful therapeutic approach for certain human diseases.

Results

Characterization of a Highly Selective SMM Inhibitor, CK-571. Muscle contraction is powered by the myosin molecular motor that produces force during its powerstroke (Fig. 1A). To promote tissue relaxation, inhibitors must stabilize myosin conformations that interact weakly with actin (Fig. 1A). High-throughput screens against SMM and extensive medicinal chemical optimization led to compound CK-571. As shown in Fig. 1B, the actin-activated ATPase of SMM is reduced to background levels in the presence of saturating concentrations of CK-571. The basal ATPase activity of SMM is also reduced more than 30 times upon CK-571 binding (Fig. 1C). Interestingly, the compound displays an IC₅₀ of ~9 nM and a high degree of selectivity for SMM compared with cardiac

Significance

Defects in myosin function are linked to a number of widespread and debilitating diseases, including asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and hypertrophic cardiomyopathy. We report here the discovery of an allosteric site that modulates myosin motor function with high specificity that opens the path toward new therapeutic solutions. Identification of specific antimyosin drugs that significantly alter a motor's function is an imperative first step toward the development of targeted and effective treatments for such diseases. Highly specific drugs against different members of the superfamily would also provide exquisite tools to investigate in cells their functional role. Additionally, detailed, high-resolution studies of the interaction of drugs with their myosin targets provide insights into the molecular mechanism of motor function.

Author contributions: J.J.H., F.I.M., and A.M.H. designed research; S.S., V.J.P.-H., V.R., S.C., X.W., G.C., X.Q., P.-P.L., E.B., K.R., C.R., B.P.M., and E.A.S. performed research; J.J.H. and A.M.H. analyzed data; and A.M.H. wrote the paper.

Conflict of interest statement: S.C. and X.Q. are former employees and potential shareholders of Cytokinetics, Inc. J.J.H., G.C., P.-P.L., B.P.M., and F.I.M. are current employees and shareholders of Cytokinetics, Inc. E.B., K.R., and C.R. received research support from Cytokinetics, Inc.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

Data deposition: Crystallography, atomic coordinates, and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID codes 5T45 and 5M05).

¹S.S., J.J.H., and V.J.P.-H. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. Email: anne.houdusse@curie.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1609342113/-DCSupplemental.

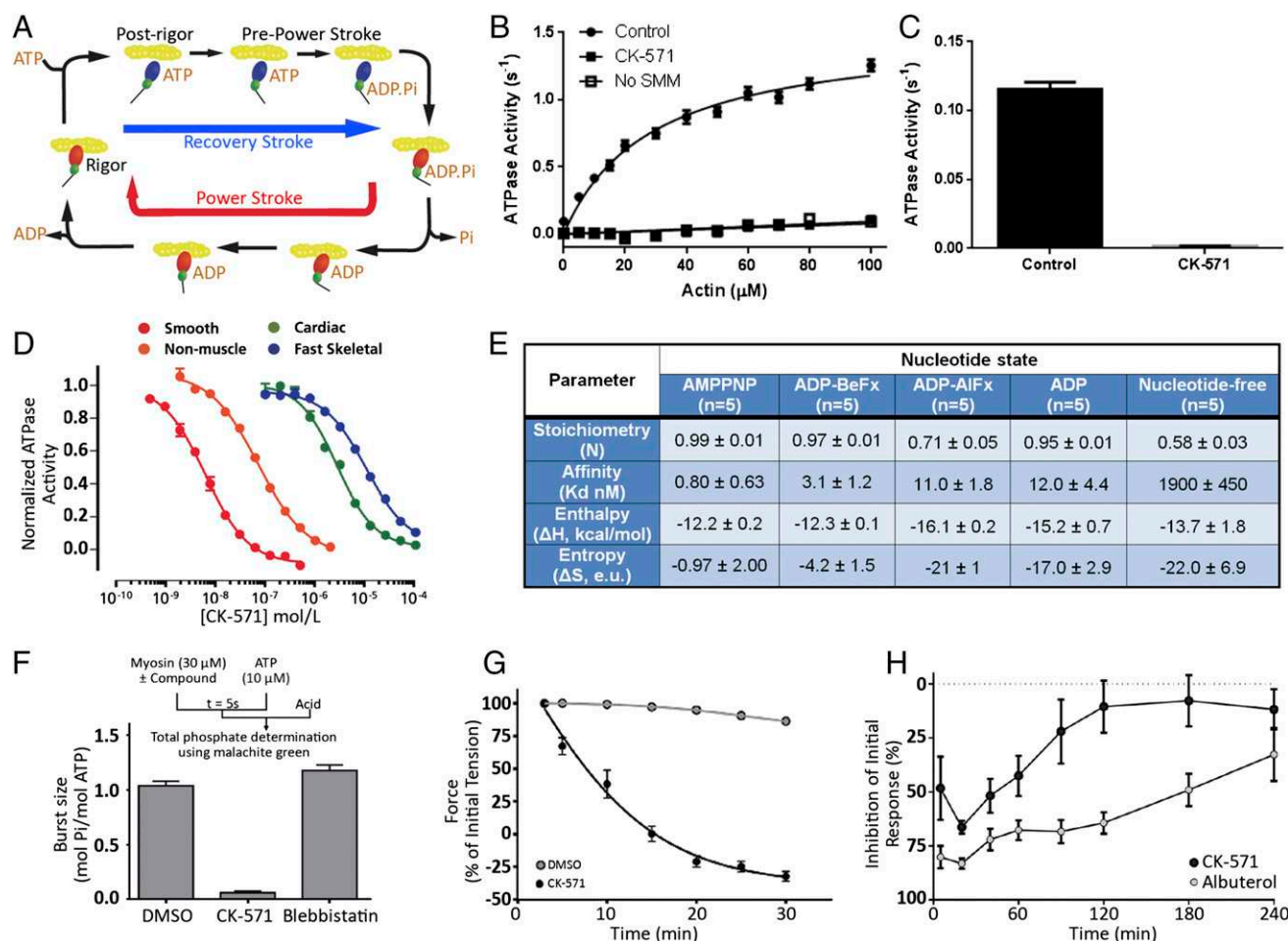


Fig. 1. Identification of a specific SMM inhibitor. (A) Chemo-mechanical cycle of myosin. Myosin motors generate force upon releasing hydrolysis products when attached to F-actin (Powerstroke, red arrow). A swing of the distal region of the motor, the lever arm, is associated with force generation. At the end of the stroke, nucleotide-free myosin is strongly attached to F-actin (Rigor). Myosin detaches from the filament upon ATP binding [Post-rigor (PR)] and then undergoes transitions that reprime the lever arm during the recovery stroke (blue arrow). Hydrolysis stabilizes the Prepowerstroke (PPS) state. Rebinding to F-actin in the PPS state triggers a series of conformational changes associated with force production that also trigger P_i and ADP release (Powerstroke, red arrow). (B) Inhibition of the actin-activated ATPase of chicken gizzard SMM S1 ($0.35 \mu\text{M}$) by $5 \mu\text{M}$ CK-571 ($n = 6$). Control reaction (2% DMSO) fit to a K_M of $29 \mu\text{M}$ and V_{Max} of 1.5 s^{-1} (data are mean $\pm$ SEM for $n = 6$). (C) The basal ATPase of chicken gizzard SMM S1 ($1.8 \mu\text{M}$) is reduced from 0.12 ± 0.0036 to 0.0013 ± 0.00032 (mean $\pm$ SD, $n = 6$) by $25 \mu\text{M}$ CK-571. (D) CK-571 specifically inhibits the steady-state actin-activated MgATPase activity of SMM over other Myosin II isoforms. ($\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ from triplicate samples: smooth, $9.0 \pm 4.8 \text{ nM}$; nonmuscle IIB, $76 \pm 4.9 \text{ nM}$; cardiac, $2,600 \pm 240 \text{ nM}$; fast skeletal, $11,300 \pm 840 \text{ nM}$). (E) CK-571 binding to SMM is nucleotide-dependent and is stronger in the presence of AMPPNP in the binding pocket. (F) CK-571 inhibits ATP hydrolysis as indicated by the reduced phosphate burst size in single turnover chemical quench experiments (mol P_i /mol myosin $\pm$ SD from 5 to 10 samples: DMSO, 1.04 ± 0.043 ; CK-571, 0.06 ± 0.016 ; blebbistatin, 1.18 ± 0.05). (G) CK-571 relaxes smooth muscle independent of calcium activation, as shown by the ability to relax skinned tail artery rings preactivated by thiophosphorylation ($n = 8\text{--}12$, plotted is mean $\pm$ SEM). (H) CK-571 relaxes airway smooth muscle in vivo, inhibiting MCh-induced bronchoconstriction in naïve dogs following dry powder insufflation ($100 \mu\text{g/kg}$). For comparison, the clinically relevant β_2 -adrenergic agonist albuterol was dosed by nebulization ($10 \mu\text{g/kg}$) (data are mean $\pm$ SEM, $n = 4$).

and striated muscle myosins, for which the IC_{50} is 280 and 1,255-fold lower, respectively (Fig. 1D). Notably, CK-571 also has a significantly lower affinity for nonmuscle myosin II (NMM, ~ 8.5 -fold less), which is remarkable given their high sequence homology to SMM (Fig. S1).

A major conformational change, the powerstroke, occurs when myosin is strongly bound to actin and drives the swing of the myosin lever arm during force production (Fig. 1A). The myosin motor cycle also has states (blue, Fig. 1A) of low affinity for actin when ATP is bound. While populating these states, the lever arm undergoes a recovery stroke to prepare the motor for producing force upon actin rebinding. A series of in vitro assays established that CK-571 traps myosin in one of the ATP-bound intermediates of the recovery stroke in which the motor is dissociated from actin. Indeed, we show that the drug binds to a state of low affinity for actin (Fig. S2A) with minimal effect on ATP binding to nucleotide-free actin-bound SMM (Fig. S2B).

CK-571 binds to myosin with the highest affinity in the presence of the nonhydrolyzable ATP analogs AMPPNP ($0.8 \pm 0.63 \text{ nM}$) or ADP.BeFx ($3.1 \pm 1.2 \text{ nM}$), with somewhat weaker binding observed in the presence of ADP ($12 \pm 4.4 \text{ nM}$) or the ADP. P_i analog ADP.AlFx ($11 \pm 1.8 \text{ nM}$) (Fig. 1E and Fig. S2B). The binding of nucleotide is critical for formation of a high-affinity drug–myosin complex, as the affinity is decreased $>2,000$ -fold in the absence of nucleotide ($1,900 \pm 450 \text{ nM}$) (Fig. 1E and Fig. S2G). AlFx, a P_i analog that promotes the formation of prepowerstroke (PPS) states (with ADP. P_i trapped), probably hinders CK-571 binding, as the observed stoichiometry is only 0.71 and the apparent K_d is similar to that measured for ADP alone (i.e., 11 nM) (Fig. 1E). Importantly, the drug also prevents ATP cleavage, as shown by quench flow experiments and reduced level of P_i burst (Fig. 1F and Fig. S2C). This inhibitor thus traps the motor in an ATP state that cannot cleave ATP. CK-571

prevents completion of the recovery stroke and precludes the motor from forming states that would rebind to F-actin and produce force. By preventing the population of force-generating states, CK-571 binding relaxes muscle *in vitro* and *in vivo* (Fig. 1 *G* and *H* and Fig. S2*D*). In summary, CK-571 binding traps myosin in a state that cannot strongly bind F-actin and which traps ATP rather than ADP·P_i in the active site (Fig. 1*F*). With CK-571, the absence of ATP cleavage and thus the absence of P_i possibly being released prevent productive actin association necessary for force production. This mechanism of myosin inhibition, which stops the motor before ATP cleavage, differs drastically from those previously described for modulators of myosin activity, such as blebbistatin (Fig. 1*F*) or *omecantiv mecarbil*, both of which are compatible with the recovery stroke. This mechanism is particularly efficient at preventing any productive interaction of the motor with the actin filament, precluding any force generation.

Relaxation of Smooth Muscle by CK-571. Therapeutically relevant SMM inhibitors must be able to promote tissue relaxation. Importantly, the inhibition of SMM-catalyzed ATP hydrolysis by CK-

571 effectively relaxes smooth muscle tissue *in vitro* and *in vivo*. CK-571 inhibits force production in detergent-permeabilized skinned artery rings stimulated to contract by increasing concentrations of calcium in a dose-responsive fashion (Fig. S2*D* and *E*). In addition, CK-571 promotes relaxation in thiophosphorylated skinned artery rings, demonstrating that the compound can relax precontracted tissue and supporting a direct effect on myosin rather than upstream signaling pathways acting through MLCK (Fig. 1*G*). CK-571 relaxes rat tracheal rings that have been precontracted with the muscarinic receptor agonist methacholine (MCh) with similar potency, highlighting the ability of CK-571 to penetrate and relax intact smooth muscle tissue (Fig. S2*F*). Relaxation of skinned and intact tissues requires higher concentrations (approximately 1 μ M), consistent with a need to inhibit >95% of the SMM to achieve relaxation. The therapeutic potential of this mechanism is further supported by the ability of CK-571 to inhibit MCh-induced bronchoconstriction in naïve dogs following dry powder delivery of CK-571 (achieved dose, 100 μ g/kg). The magnitude of the inhibition achieved is comparable to the clinically relevant short-acting β 2-adrenergic agonist albuterol

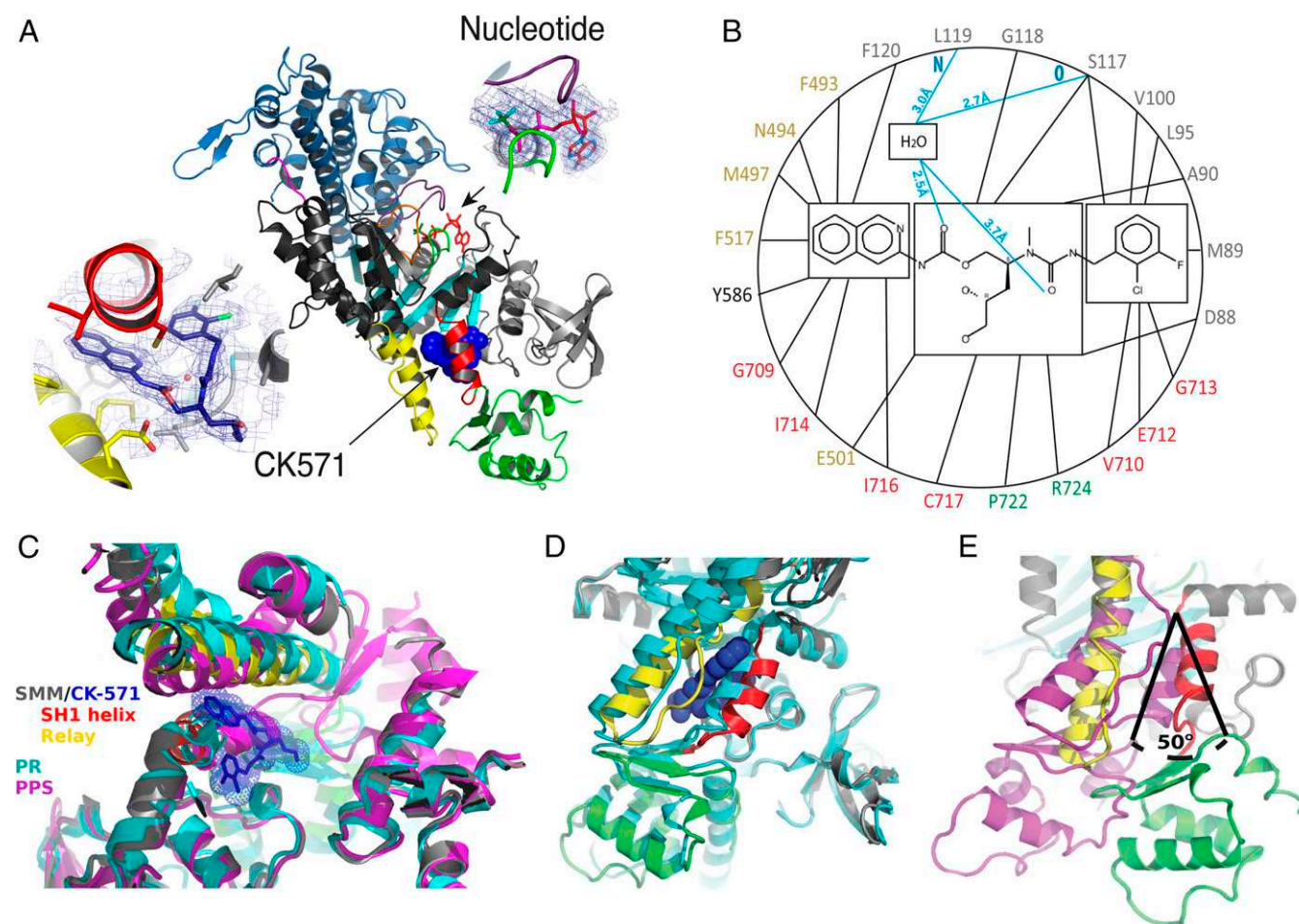


Fig. 2. An allosteric pocket opens to bind CK-571 during the recovery stroke. (A) Overall view of the myosin MD of the SMM/CK-571 structure in cartoon representation. CK-571 is shown in blue spheres and is located 22 Å away from the nucleotide (Right Inset: red sticks, ADP; green sticks, BeFx). CK-571 (Left Inset: 2Fo-Fc electron density) interacts with residues of the SH1 helix (red), Relay (yellow), and the Nter subdomain (light gray) as well as with Y586 from the L50 subdomain (dark gray). The other two subdomains of the motor are the U50 (blue) and converter (green). (B) Residues of the CK-571 binding site (black lines, apolar contacts; blue lines, polar contacts). Residues are indicated with the same color code as in A. (C) Comparison of the CK-571 binding pocket with the myosin PR (PDB ID code 3I5F, cyan) and PPS (PDB ID code 1BR1, magenta) states. Only the SH1 helix and the relay conformation in the SMM/CK-571 structure are compatible with the drug binding. (D) Comparison of the SMM/CK-571 structure with the myosin PR state (PDB ID code 3I5F, cyan). In the SMM/CK-571 structure, rearrangements of the Relay (yellow) and a 10° rotation of the SH1 helix (red) allow the formation of a cleft in the molecule that harbors the drug (blue spheres). (E) In the SMM/CK-571 structure, the converter is in a down position and is rotated by 50° with respect to the position it occupies in the PPS state (PDB ID code 1BR1, magenta). To compare the three structures, the proteins were aligned in C, D, and E using the N-ter domain as a reference.

(Fig. 1*H*). Given that CK-571 requires higher doses and has a shorter duration of action, potency and metabolic stability are key areas for further optimization.

Mechanism for This Efficient and Highly Selective Myosin Inhibitor.

The structural basis of CK-571 action and specificity was revealed by the crystal structure of the SMM motor domain (MD) bound to CK-571 [SMM/CK-571; Protein Data Bank (PDB) ID code 5T45] at 2.8 Å resolution (Table S1). The electron density shows unambiguously that the inhibitor binds in an unexpected pocket of the MD (Figs. 2*A* and 3*A*). CK-571 is held in between two structural elements that control the lever arm position, the Relay and the SH1 helix (Fig. 2*A* and Movie S1), burying 1,067 Å² of surface area in an internal pocket. It adopts a compact conformation in which the isoquinoline carbamate and the chloro-fluorophenyl moieties come close together via a ~60° bend in the central aliphatic chain of CK-571 (Fig. 2*A*, *Inset*). The inhibitor has a predominant hydrophobic character and interacts via a complex network of mostly apolar contacts (Fig. 2*B*). There are no direct H-bonds established with protein residues. Importantly, the drug binding site of CK-571 is not accessible in either the postrigor or the PPS states (Fig. 2*C* and *D*), as the Relay and the SH1 helix make strong interactions in these two structural states that correspond to the beginning and the end of the recovery stroke.

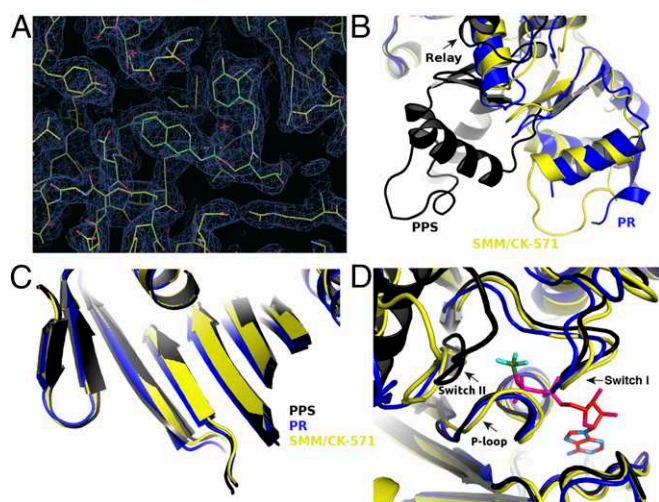


Fig. 3. Structural features of SMM2 MD in complex with CK-571 that traps an intermediate of the recovery stroke. (A) 2Fo-Fc electron density omit map, contoured at 0.7 σ , depicting the CK-571 binding site. (B) The SMM/CK-571 structure is an intermediate of the recovery stroke between the PR and PPS structures. Note in particular the difference in position of the converter in these structures. It is in a down position in the SMM/CK-571 structure (yellow), close to the position found in the PR state structures (blue), and differs greatly from the up position found in PPS structures (black). The position of the subdomains when CK-571 is bound differs from those found in previously described PR structures. Interestingly, the relay (shown in this figure) and L50 subdomain (see Movie S2) corresponds to an intermediary position between the PR and the PPS structures. (C) The central beta sheet conformation (which is part of the transducer) controls rearrangements between subdomains of the motor (1). Although the lever arm position in SMM/CK-571 is closer to the PR than the PPS position, the central beta-sheet conformation of SMM/CK-571 (yellow) differs from that of the PR state (blue), whereas its position is quite similar to that found in the PPS state (black) (Movie S2). (D) Nucleotide binding site in the SMM/CK-571, PR, and PPS structures. Note that the nucleotide binding elements switch I and P-loop are in position to bind MgATP tightly. However, in the SMM/CK-571 structure, the switch II position differs from the special PPS position necessary to promote ATP hydrolysis (black). This switch II position is far away from the nucleotide, in an intermediate position between the PR and PPS states (PPS, PDB ID code 1BR1, black; PR, PDB ID code 3I5F, blue; SMM/CK-571 is in yellow with the nucleotide in red sticks).

These structural insights and the functional studies presented previously (that show that ATP binding is not affected by CK-571 whereas ATP cleavage cannot occur) show that CK-571 binds a myosin-ATP intermediate that is populated during the recovery stroke. Thus, a pocket between the Relay and the SH1 helix must open during this transition. Once bound, CK-571 traps the motor in an intermediate state, which prevents the motor from exploring states at the end of the recovery stroke that are necessary for ATP hydrolysis. Small-angle X-ray scattering (SAXS) studies were performed to demonstrate that the X-ray SMM/CK-571 structure corresponds to the state populated by the drug in solution. The SMM motor with CK-571 and either ADP or ADP.BeFx bound adopts a similar conformation in solution that also fits the scattering curve calculated from the SMM/CK-571 structure (Fig. S3*A*). Note that we also solved the structure of SMM/CK-571 with ADP bound. The structure is the same as that described earlier with ADP.BeFx bound. The structure supports the findings that CK-571 stabilizes myosin in an actin-unbound state, as the actin-binding pocket is open and thus the actin interface is not adequate for strong binding to F-actin (Fig. S3*B*). The finding that both ATP analogs and ADP can allow drug binding in this intermediate state is consistent with the early stages of the recovery stroke being explored in the absence of F-actin when ADP is bound in the active site. In contrast, the scattering curve is quite different when SMM is in the PPS state (with ADP.VO4 bound), confirming that the drug prevents access to PPS. Details of the structure compared with previously characterized ATP states prior or after the recovery stroke are shown in Figs. 2*C–E* and 3. The intermediate state populated by CK-571 has similarities with the postrigor state (PR) populated at the beginning of the recovery stroke because of the position of its lever arm (in the down position). However, other MD elements are more similar to the conformation myosin motors adopt at the end of the recovery stroke. In particular, the intermediate state trapped by CK-571 differs substantially from the PR, as the central β -sheet of the MD in this intermediate adopts a conformation close to that found in states at the end of the recovery stroke (PPS; Fig. 3*C* and Movies S2 and S3). This β -sheet is a major part of the transducer (1) that coordinates several allosteric sites within the motor, in particular the actin-binding interface and the nucleotide-binding site. Moreover, the switch II element near the γ -phosphate of ATP has moved toward the conformation it adopts in the PPS state that allows direct interaction with the nucleotide necessary for hydrolysis. However, it remains far from this final conformation, as it adopts a position intermediate between the two end structures of the recovery stroke (PR and PPS; Figs. 1*A* and 3*D*). This result indicates that in contrast to what had been proposed from some Molecular Dynamics simulations (8), sensing the nucleotide via switch II does not correspond to the first event that would guide the repriming of the lever arm. The recovery stroke of the lever arm is not driven by keeping strong interactions between the Relay and SH1 helix, as previously proposed (8). Indeed, this mechanism (8) cannot explain how a pocket would open during the recovery stroke to allow CK-571 binding. Overall, the SMM/CK-571 structure reveals that CK-571 traps the motor in an intermediate state in which switch II stays too far from the nucleotide to stabilize the water near the γ -phosphate that allows cleavage of ATP.

Intriguingly, sequence analysis reveals that all 24 residues forming the inhibitor's binding site are strictly conserved among SMM, NMM, fast skeletal, and cardiac muscle myosin II, thus indicating that the inhibitor's selectivity is not based on specific sequence recognition at the drug site (Fig. 1*D* and Fig. S1). Furthermore, no sequence differences exist among the residues located along the putative pathways by which the compound would reach this site (Movie S4). In summary, comparison of the SMM/CK-571 structure with other myosin II structures (Table S2), SAXS data, and functional characterization of the motor inhibited by CK-571 demonstrate that the drug traps myosin in

an intermediate ATP state of the recovery stroke incapable of ATP hydrolysis and thus blocks the motor from cycling, killing force production (Fig. 4).

CK-571 Reveals the Existence of an Allosteric Pocket Adjacent to the Binding Site of the Myosin Activator, *Omecamtiv Mecarbil*. A structure of cardiac myosin II bound to the activator *omecamtiv mecarbil* (2) was recently solved (9) with the motor in the PR state (Fig. 1A). This activator of cardiac myosin increases force production by the heart by increasing the transition of cardiac myosin from a weakly to strongly actin-bound state, as evidenced by a faster rate of P_i release (2, 10), and by slowing down the following steps of the powerstroke. In the crystal structure, *omecamtiv mecarbil* binds to cardiac myosin (9) in a surface pocket accessible in the PR state (Fig. 1A). The *omecamtiv mecarbil* pocket only slightly overlaps with the CK-571 pocket. Indeed, most of the CK-571 site is not accessible in the PR state and opens up only during the recovery stroke (Fig. 2C and Fig. S4). The most deeply buried *omecamtiv mecarbil* groups (carboxymethyl-piperazine and fluoro-benzene rings) are located close to the SH1 helix where the CK-571 binding site opens during the transition (Fig. S44). The rest of the *omecamtiv mecarbil* groups (amino-carbamoyl and methyl-pyridinyl) are located closer to the surface of the molecule near the converter domain. In contrast, the binding site shown for CK-571 is much deeper and quite different from that of *omecamtiv mecarbil* (Fig. S4). It is unlikely that in fact *omecamtiv mecarbil* would occupy the CK-571 pocket during the recovery stroke. Unlike CK-571, *omecamtiv mecarbil* does not block the motor in an intermediate of the recovery stroke but increases the population of the end states of the recovery stroke (PPS), in which the lever arm is up. It must thus occupy a pocket that is accessible in the PPS state. This is not the case for the CK-571 pocket, which is non-existent in the PPS state. In contrast to CK-571, *omecamtiv mecarbil* is compatible with the recovery stroke, accelerates P_i release, and then slows the following steps of the powerstroke (10). Thus, cardiac muscle contracts more strongly when the drug is present (2) and *omecamtiv mecarbil* acts as an activator of force production. Together, the *omecamtiv mecarbil* and CK-571 binding sites on myosin thus highlight the potential of targeting the internal

pockets found near the SH1 helix and the Relay to design highly specific activators and inhibitors of myosin motors for the treatment of numerous diseases in which myosin motors are a target.

Discussion

The atomic structure of SMM/CK-571 reveals that the drug binds in an allosteric pocket of the myosin motor that opens up transiently during the recovery stroke of the myosin motor.

The drug introduces itself in a pocket that has not been found in the previously described structures of the motor. Furthermore, this pocket becomes available transiently when the ATP-bound motor explores states of the recovery stroke. The intermediate state of the recovery stroke is then stabilized and traps the motor in a structural state from which myosin cannot bind actin nor progress toward ATP hydrolysis. Drug binding blocks the recovery stroke transition via stabilization of an intermediate through interactions with two main connectors (Relay and SH1 helix) that link the motor and the lever arm. It thus prevents the motor from reaching the states at the end of the recovery stroke (PPS) that are required to allow ATP cleavage. This efficiently blocks the motor in a state that is inappropriate for force production upon interaction with actin, as ATP is not cleaved, affinity for F-actin is low, and the lever arm is not primed. Previously described myosin inhibitors, such as blebbistatin or pentabromopseudilin (3, 11, 12), trap the motor in the PPS state at the beginning of the force production event (Fig. S4E). These drugs do not prevent ATP cleavage and bind surface pockets available in the PPS state of cytoplasmic and muscle myosin II with lower affinity and specificity (13) compared with CK-571. In contrast, stabilization of an intermediate state during the recovery stroke by CK-571 blocks not only the motor rearrangements required for lever arm repriming but also those needed for the closure of the nucleotide binding site that are required for ATP hydrolysis. By keeping the myosin heads away from any possible interaction with F-actin, precluding ATP hydrolysis and repriming of the lever arm, CK-571 prevents these heads from participating in force production. CK-571 exemplifies an innovative and efficient mechanism to achieve complete relaxation of smooth muscle.

Interestingly, all of the residues of the CK-571 binding pocket are conserved among the different human myosin IIs (cytoplasmic, smooth, skeletal, and cardiac). Thus, the selectivity of CK-571 must result from residues outside the binding pocket that modulate the kinetics and energy landscape of the recovery stroke (Fig. S1). What differs among myosins is the ability of the drug to exploit a transient pocket formed during the recovery stroke. These differences may arise from small sequence changes between these molecular motors that influence the lifetimes and the nature of the intermediate states. CK-571 inhibits SMM2 with ~eightfold greater potency than its close homolog, NMM, despite the lack of any sequence differences within the drug-binding pocket or any of the surrounding amino acids. CK-571 provides a remarkable demonstration of the principle of allosteric modulation of enzyme function by a small molecule with high specificity and high affinity. The SMM/CK-571 structure reveals a way to achieving specificity by targeting transient pockets likely to have different lifetimes in different myosins with sequence differences even remote from the drug-binding site. Even highly homologous myosins can be specifically inhibited as long as they have kinetics that differ significantly from each other. The SMM/CK-571 structure provides important insights into the allosteric mechanism of the recovery stroke transition, the critical step in which the ATP-bound motor, detached from actin, primes its lever arm to prepare myosin for its powerstroke. During this isomerization, the lever arm undergoes a drastic reorientation while the SH1 helix and Relay connectors explore different conformations. The trapped intermediate in the SMM/CK-571 structure sheds light on the recovery stroke mechanism, refuting models supporting tight coupling between the

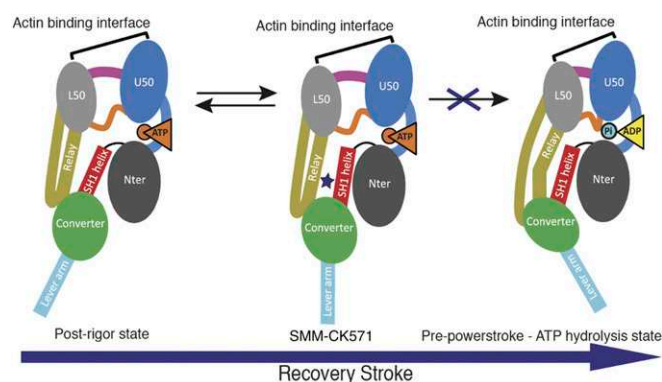


Fig. 4. MD rearrangements upon the recovery stroke. The myosin MD is functionally made up of four subdomains linked by connectors that rapidly change their conformation upon transitions in the motor cycle. In particular, switch II (orange) is found close to the nucleotide. The Relay (yellow) and the SH1 helix (red) connect the MD to the converter (green) and control its swing. The converter and the adjacent neck region constitute the lever arm that amplifies MD rearrangements linked to nucleotide or actin binding. Binding of CK-571 (blue star) blocks the motor isomerization in an intermediate of the recovery stroke. Thus, unlike prevailing models, lever arm repriming corresponds to an uncoupling of these connectors and leads to transducer rearrangements that are not initiated by a switch II closure. Lever arm swing in this step is not controlled by mechanical control of subdomain orientation by coupled connectors.

nucleotide binding site and the lever arm. Weak interactions between the Relay and SH1 helix are necessary for pocket opening and CK-571 binding. Models in which switch II interactions with the nucleotide direct the swing of the converter through a strong coupling mechanism between the Relay and SH1 helix cannot explain how CK-571 may bind. Rearrangements of the Relay and the SH1 helix during lever arm priming can allow the formation of a large pocket in between them, which traps the drug in place (Movies S1–S4). In the rigor, PR, and PPS states (Fig. 14), these two connectors interact directly, reducing the ability for this allosteric pocket to be formed in these states and thus resulting in poor affinity of these structural states for CK-571.

Molecular simulations have provided drastically different models for the recovery stroke. A coupling mechanism discussed earlier in which the active site (switch II closure) would trigger reorientation of the converter is not compatible with the SMM/CK-571 structure (8, 14). In contrast, the structure is consistent with a Targeted Molecular Dynamics approach, in which the converter rotates in the first stage of the transition before switch II closure (15, 16). Transient time-resolved FRET data are also compatible with this scenario (17), as are previous studies that indicate the potential melting of the SH1 helix in this transition (18, 19). Furthermore, the SMM/CK-571 structure shows that the lever arm repriming does not occur via switch II sensing of the γ -phosphate. This structure reveals that the recovery stroke (a large 9-nm movement) necessary to reprime the motor is likely to capture thermal energy to explore and populate uncoupled states that allow a lever arm swing. This differs from a mechanism in which such large movement would occur via the use of chemical energy linked to formation of bonds along a pathway from the active site to the lever arm that would trigger precise allosteric rearrangements to control lever arm movement. The emerging model of the recovery stroke thus differs greatly from current ones that suggest allosteric communication between the nucleotide binding site and a distal part of the motor to reprime the lever arm.

The recovery stroke is an essential step of the cycle of all myosins. Highly specific drugs that trap intermediates of this transition can thus be designed for other myosins on the basis of the SMM/CK-571 structure. Structural studies with several myosin isoforms, and in particular the reverse motor myosin VI, have shown that the conformation of the motor in the states prior and after the recovery stroke are similar, even when the direction of the lever arm swing differs (20). Selectivity among different myosin classes may be achieved by exploiting sequence differences in the CK-571 binding pocket (Fig. S5). This allosteric binding site has thus the potential to guide the design of novel class-specific myosin inhibitors. In particular, myosin VI and myosin X are interesting pharmaceutical targets due to their recently established role in cell migration and metastasis (21–24).

Methods

Crystal Structure Determination.

Chemicals. CK-571 was synthesized by the Medicinal Chemistry group of Cytokinetics. Other chemicals were from commercial sources and generally American Chemical Society (ACS) grade or higher.

High-throughput screens were conducted using chemically diverse libraries of commercially available small molecules, resulting in the identification of an initial hit with modest biochemical potency ($IC_{50} = 17 \mu M$) against SMM. Through extensive medicinal chemical optimization (>3,000 analogs in series), the intrinsic biochemical potency of the chemical series was greatly improved, resulting in an IC_{50} of ~ 9 nM for compound CK-571. Inhibitors with higher selectivity for SMM versus NMMs were sought during optimization.

Purification of myosins. Native chicken SMM was purified from cryoground gizzards (Pel-Freez Biologicals) using previously described methods (25). Soluble chicken gizzard subfragment 1 (S1) was obtained by limited papain digestion of filamentous myosin terminated with 1 mM iodoacetic acid. Recombinant chicken SMM MD (26) (residues Met1–790) and MD + essential light chain (MDE heavy chain residues Met1–Leu819, GenBank NP_990605.2; Essential Light Chain M15645.1) were expressed with a C-terminal FLAG tag

following a short linker (sequence, GSDYKDDDDK). The chicken MDE protein was prepared by coexpression of the untagged chicken essential light chain. Recombinant human SMM MDE (heavy chain residues Met1–Leu820, isoform SM-A, GenBank NP_002465) was expressed with a C-terminal 6XHis tag. Human NMM IIB and essential light chain (MDE, heavy chain residues Met1–Pro843, isoform 2, GenBank NP_005955.3) were expressed with a C-terminal FLAG tag (sequence, DYKDDDDK). The human MDE proteins were prepared by coexpression of the untagged human SMM essential light chain. The isoforms of the recombinant human SMM and NMMs both lacked the seven-amino acid insert in loop 1. FLAG-tagged recombinant proteins were purified from baculovirus-infected SF9 cells by ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography as described (26). Rabbit fast skeletal and bovine cardiac myosins were purified from native tissues (Pel-Freez Biologicals) and digested in their filamentous forms with chymotrypsin to produce S1 fragments (27). For measuring specificity and potency, soluble myosin fragments were covalently cross-linked to excess bovine cardiac actin using carbodiimides 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)/N-hydroxysuccinimide esters (NHS) (28, 29) and flash-frozen at $-80^\circ C$ before use in ATPase assays.

Crystallization and structure determination. Purified chicken SMM MD (residues 1–790) at $110 \mu M$ was incubated with 2 mM MgADP and 2 mM BeFx for 30 min on ice. The protein was mixed with CK-571 at a final concentration of $547 \mu M$ in the presence of 10% (vol/vol) DMSO, and then it was incubated for 1 h on ice. Samples were centrifuged at $11,000 \times g$ for 15 min before crystallization. Hanging drops of SMM/CK-571 were set up by mixing equimolar ratio of the complex and of the reservoir containing 5% (wt/vol) Peg8K, 50 mM Bicine (pH 8.2), and 10% (vol/vol) DMSO. First, crystals appeared after 10 d at $4^\circ C$ and were subsequently optimized using microseeding technique. The optimized crystals were cryo-cooled in a final solution containing 8% (wt/vol) Peg8K, 50 mM Bicine (pH 8.2), 10% (vol/vol) DMSO, 25% (vol/vol) glycerol, and $547 \mu M$ CK-571. Similarly, crystals were obtained with protein containing only MgADP bound in the active site.

X-ray datasets were collected at the Proxima 1 beamline at the Synchrotron SOLEIL at 100K and at a wavelength of $0.97857 \text{ \AA}$. The diffraction datasets were indexed and scaled with XDS (30). Molecular replacement solution was obtained with Phaser, CCP4 suite (31, 32), using PDB ID code 1BR1 (26) as the search model. The region of the converter, the Relay, and the SH1 helix were excluded from the search model. These regions were subsequently built in electron density using the ARP/wARP program (33, 34). The coordinate and geometry constraint files for the ligand were created with Sketcher of the CCP4 suite and Elbow of the Phenix suite (35, 36). Model building and refinement were carried out with the Coot (37) and Buster programs (38). In the final Ramachandran plot of the MgADP.BeFx structure, 96.29%, 3.28%, and 0.43% of residues were in the favored, allowed, and outliers regions, respectively. Figures and movies were made using PyMol (Version 1.5.0.4; www.pymol.org).

Note that crystals with CK-571 bound can be obtained in the presence of MgADP as well as other ATP analogs, and the structure solved with ADP bound is essentially the same as that we report here with MgADP.BeFx bound (see Fig. S3 and statistics on Table S1).

SAXS experiments. SAXS data were collected on the SWING beamline (synchrotron SOLEIL). Purified SMM S1 fragment was incubated with 2 mM MgADP for 30 min on ice. The protein was then incubated with either 5 mM CK-571 or 10% DMSO for 1 h on ice, followed by the incubation with 2 mM vanadate or 2 mM BeFx for 30 min on ice when necessary. All samples were centrifuged at $20,000 \times g$ for 10 min at $4^\circ C$ before the analysis. We injected $40 \mu L$ of the protein at 3 mg/mL between two air bubbles using the autosampler robot. We averaged 35 frames of 1.5-s exposure, and buffer scattering was subtracted from the sample data. The SMM/CK-571 S1 model was built using the SMM/CK-571 MD and the helix and ELC from previous smooth myosin structures (PDB ID code 1BR1) using the converter position as a reference. The theoretical SAXS curve of this model was calculated with CRYSOLO (39) and compared based on the quality of their fits against the different experimental curves.

Biochemical Assays.

ATPase assays. Steady-state ATPase assays were performed at $22^\circ C$ in PM12 buffer (12 mM K-Pipes, 2 mM $MgCl_2$, pH 6.8) containing $250 \mu M$ ATP. Basal and actin-stimulated ATPase activities were measured using a spectrophotometric ATPase assay that couples ADP production to the oxidation of NADH using pyruvate kinase and lactate dehydrogenase (2). SMM S1 concentration was estimated by OD_{280} in 6 M guanidine HCl using a molar absorption coefficient of $95,793 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ calculated based on the sequence of chicken MYH11 (1–843) and light chain MYL6. Specificity and intrinsic potency of CK-571 was determined using EDC/NHS-cross-linked Acto-S1 proteins (see Crystal Structure Determination, Purification of myosins) as

well as a highly sensitive spectrofluorometric ATPase assay that couples ADP production to the conversion of Amplex Red into resorufin using pyruvate kinase, pyruvate oxidase, and horseradish peroxidase while regenerating ATP. Hydrolysis rates were normalized using reactions containing an equivalent concentration of DMSO (activity, 100%) and fit with a four-parameter logistic curve (GraphPad Prism) without additional background subtraction or data manipulation.

Actin cosedimentation assay. Myosin binding to actin was measured by depletion of soluble myosin from binding reactions using 3 μ M recombinant chicken SMM MDE (1–819) and 6 μ M bovine cardiac actin in PM12 buffer. ATP and ADP were present at 1 mM where indicated, and hexokinase (10 U/mL) and glucose (2 mM) were added to nucleotide-free and ADP reactions to deplete residual ATP. Phalloidin (6 μ M) was included to stabilize actin filaments. Reactions were allowed to equilibrate at 22 °C for 10 min before centrifugation (540,000 $\times$ g, 30 min), with ATP added just before centrifugation to minimize hydrolysis. Supernatants were analyzed by SDS/PAGE followed by staining with Coomassie brilliant blue.

Transient kinetics. Chemical hydrolysis of ATP was measured in PM12 buffer at 25 °C by rapid mixing quench-flow (Biologic SFM/400, Bio-logic Inc.) under multiple turnover conditions and by manual quench in single turnover conditions (as shown in Fig. 1F). Native chicken gizzard SMM S1 (15 μ M) was preincubated with DMSO or CK-571 in DMSO (25 μ M) before rapid mixing with ATP (150 μ M), aging, and quenching with 0.6 M perchloric acid. ATP hydrolysis was monitored using malachite green to quantify total acid-labile phosphate (40). The effect of CK-571 on ATP hydrolysis was further verified by measuring the burst size under single turnover conditions. Myosin (30 μ M) was preincubated with DMSO (2%) or CK-571 in DMSO (50 μ M), manually mixed 1:1 with ATP (10 μ M), aged for 5 s, and then quenched by addition of perchloric acid (0.3 M final) before phosphate detection using malachite green.

Mant-ATP binding was measured in PM12 buffer at 25 °C by rapid mixing stopped flow (SF61DX2, TdK Scientific) (Fig. S2C). Mant-ATP fluorescence was monitored by excitation at 360 nm while monitoring emission through a 400-nm long pass filter. We mixed 2 μ M SMM S1 and 6 μ M F-actin to form the rigor state, and 6 μ M CK571 or DMSO was also mixed before addition of Mant-ATP at different concentrations.

Isothermal titration calorimetry. Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were carried out using a Micro-Cal Auto ITC HT microcalorimeter (Microcal Inc., now Malvern, Inc.) at 10 °C. A solution of 125 μ M CK-571 in 12 mM Pipes (pH 6.8), 2 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoethanol, and 3% DMSO (pH 6.8) was titrated into the sample cell, which contained 8 μ M chicken gizzard SMM S1 in the same buffer. SMM S1 concentration was estimated by OD₂₈₀ in 6 M guanidine HCl using a molar absorption coefficient of 95,793 M⁻¹cm⁻¹ calculated based on the sequence of chicken MYH11 (1–843) and light chain MYL6. Injections (10 μ L) were made every 300 s. To correct for the heats of dilution and slight buffer mismatches between the titrant and sample, the average heat signal from the last three injections at the end of the experiment (when binding was saturated) was subtracted from all values. Data collection and analysis was performed using the modified Origin software included with the instrument, using a single binding-site model. Nucleotides and nucleotide analogs were present at 2 mM. To measure affinity in the absence of nucleotide, apyrase (Sigma A-6535) was included in the myosin sample at 17 μ g/mL.

Tissue and in Vivo Assays.

Animal care and welfare. Animals used in this study were maintained in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute* (National Research Council) (42) and under the supervision of the Institutional Animal Care and Use Committee of Cytokinetics for rodent studies or Lovelace Respiratory Research Institute for canine studies.

Skinned ring contractility. Endothelium-denuded rat tail artery segments were cut into 3-mm helical rings, mounted on an isometric force transducer with a resting tension of 0.5 g, and incubated for 30 min at room temperature in normal Hepes–Tyrode buffer [135 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 12 mM Hepes, 2.5 mM CaCl₂, 0.21% glucose (wt/vol), pH 7.4]. Tissues were skinned by incubation with skinning solution [30 mM TES, 50 mM KCl, 5 mM K₂EGTA, 5.1% sucrose (wt/vol), 0.5 mM DTE, 1% Triton X-100, pH 6.9] for 1 h at room temperature. Tissues were preincubated in assay buffer (30 mM TES, 5.6 mM MgCl₂, 75 mM K-propionate, 3.8 mM ATP, 16 mM creatine phosphate, 15 U/mL creatine phosphokinase, 0.5 mM DTT, 4 mM K-EGTA, and sufficient calcium to yield the desired free calcium concentrations, pH 6.9) containing DMSO or CK-571 in DMSO for 15 min before the addition of calcium. The force generated at the plateau of each calcium condition was recorded, and data were presented as a percent change from the baseline values (41). Dose–response data were fit with a three-parameter equation (assumed Hill slope, 1).

Thiophosphorylation assay. Triton-permeabilized endothelium-denuded rat tail artery preparations (see *Skinned ring contractility*) were prepared and mounted as above and then incubated in rigor solution containing ATP- γ -S (1 mM) for 10 min. Tissues were preincubated with CK-571 for 15 min before the addition of ATP. ATP-induced contraction was measured for 60 min, and the relaxation was expressed as percentage of the maximum force.

Intact tracheal ring contractility. Rat trachea were dissected and placed into cold Krebs–Henseleit buffer (117.5 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucose) equilibrated with 95% O₂/5% CO₂. Trachea were cut into 2-mm rings and mounted in a tissue bath (Radnoti LLC) containing Krebs–Henseleit buffer equilibrated with 95% O₂/5% CO₂ at 37 °C. Rings were stretched to a baseline isometric tension of 2 g and then induced to contract with a sub-maximal dose of MCh (3 μ M). Rings were relaxed by treatment with ascending doses of CK-571 in DMSO. Force values were normalized to the initial MCh-induced value for each ring. Dose–response data were fit with a four-parameter equation.

Bronchoconstriction measurements in naïve dogs. Naïve beagles (10.5–14 kg, 2.6–3 y of age) were used for this study. The response of naïve beagles ($n = 8$, 10.5–14 kg, 2.6–3 y of age) to increasing 1/2 log doses of inhaled MCh (0.3, 1, 3, 5, 10, 30, 50, 100, etc. mg/mL), was characterized to determine the concentration that induced a 200–250% increase in pulmonary resistance. A subset of four animals (two male, two female) were selected for further study. An abbreviated MCh dose–response (up to 3 doses) was performed to confirm the dose of MCh that induces a 200–250% increase in pulmonary resistance. Fifteen minutes later, a single dose of MCh was again given to reconfirm the response. The response to this challenge was used to compare all subsequent MCh challenges following test article treatment. Treatment with inhaled CK-571 (100 μ g/kg via insufflator) or albuterol (10 μ g/kg via nebulizer) was given 15 min following the single MCh challenge. MCh challenge was repeated at 5, 20, 40, 60, 90, 120, 180, and 240 min posttest article treatment. The repeated MCh challenges were aimed at evaluating the duration of action of the test article. The dogs were rested at least ~7–14 d in between each dose to allow time for washout of the previous dose.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Pierre Legrand and Andrew Thompson, as well as beamline scientists of Proxima 1 (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du Lure synchrotron) for excellent support during data collection. A.M.H. was supported by grants from Fondation de la Recherche Médicale, Agence Nationale de la Recherche, Association Française Contre les Myopathies, and Ligue Contre le Cancer. The A.M.H. team is part of Laboratoire d'Excellence CeTisPhyBio:11-LBX-0038, which is part of the Initiative d'Excellence Paris Science Lettres (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL).

- Sweeney HL, Houdusse A (2010) Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys* 39:539–557.
- Malik FI, et al. (2011) Cardiac myosin activation: A potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science* 331(6023):1439–1443.
- Bond LM, Tumbarello DA, Kendrick-Jones J, Buss F (2013) Small-molecule inhibitors of myosin proteins. *Future Med Chem* 5(1):41–52.
- Green EM, et al. (2016) A small-molecule inhibitor of sarcomere contractility suppresses hypertrophic cardiomyopathy in mice. *Science* 351(6273):617–621.
- Berair R, Hollins F, Brightling C (2013) Airway smooth muscle hypercontractility in asthma. *J Allergy (Cairo)* 2013:185971.
- Dowell ML, Lavoie TL, Solway J, Krishnan R (2014) Airway smooth muscle: A potential target for asthma therapy. *Curr Opin Pulm Med* 20(1):66–72.
- Wedzicha JA, Decramer M, Seemungal TA (2012) The role of bronchodilator treatment in the prevention of exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 40(6):1545–1554.
- Koppole S, Smith JC, Fischer S (2007) The structural coupling between ATPase activation and recovery stroke in the myosin II motor. *Structure* 15(7):825–837.
- Winkelmann DA, Forgacs E, Miller MT, Stock AM (2015) Structural basis for drug-induced allosteric changes to human β -cardiac myosin motor activity. *Nat Commun* 6:7974.
- Liu Y, White HD, Belknap B, Winkelmann DA, Forgacs E (2015) Omecamtiv Mecarbil modulates the kinetic and motile properties of porcine β -cardiac myosin. *Biochemistry* 54(10):1963–1975.
- Allingham JS, Smith R, Rayment I (2005) The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol* 12(4):378–379.
- Fedorov R, et al. (2009) The mechanism of pentabromopseudinin inhibition of myosin motor activity. *Nat Struct Mol Biol* 16(1):80–88.
- Limouze J, Straight AF, Mitchison T, Sellers JR (2004) Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil* 25(4-5):337–341.
- Elber R, West A (2010) Atomically detailed simulation of the recovery stroke in myosin by Milestoning. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(11):5001–5005.
- Yu H, Ma L, Yang Y, Cui Q (2007) Mechanochemical coupling in the myosin motor domain. I. Insights from equilibrium active-site simulations. *PLOS Comput Biol* 3(2):e21.

16. Daily MD, Yu H, Phillips GN, Jr, Cui Q (2013) Allosteric activation transitions in enzymes and biomolecular motors: Insights from atomistic and coarse-grained simulations. *Top Curr Chem* 337:139–164.
17. Nesmelov YE, et al. (2011) Structural kinetics of myosin by transient time-resolved FRET. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(5):1891–1896.
18. Houdusse A, Kalabokis VN, Himmel D, Szent-Györgyi AG, Cohen C (1999) Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: A novel conformation of the myosin head. *Cell* 97(4):459–470.
19. Himmel DM, et al. (2002) Crystallographic findings on the internally uncoupled and near-rigor states of myosin: Further insights into the mechanics of the motor. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(20):12645–12650.
20. Sweeney HL, Houdusse A (2010) Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* 141(4):573–582.
21. Dunn TA, et al. (2006) A novel role of myosin VI in human prostate cancer. *Am J Pathol* 169(5):1843–1854.
22. Yoshida H, et al. (2004) Lessons from border cell migration in the Drosophila ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(21):8144–8149.
23. Knudsen B (2006) Migrating with myosin VI. *Am J Pathol* 169(5):1523–1526.
24. Arjonen A, Kaukonen R, Ivaska J (2011) Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adhes Migr* 5(5):421–430.
25. Sellers JR, Pato MD, Adelstein RS (1981) Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin. *J Biol Chem* 256(24):13137–13142.
26. Dominguez R, Freyzon Y, Trybus KM, Cohen C (1998) Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: Visualization of the pre-power stroke state. *Cell* 94(5):559–571.
27. Margossian SS, Lowey S (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* 85(Pt B):55–71.
28. Mornet D, Bertrand R, Pantel P, Audemard E, Kassab R (1981) Structure of the actin-myosin interface. *Nature* 292(5821):301–306.
29. Bonafé N, Chaussepied P (1995) A single myosin head can be cross-linked to the N termini of two adjacent actin monomers. *Biophys J* 68(4, Suppl):355–435.
30. Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 2):125–132.
31. Collaborative Computational project, Number 4 (1994) The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 5):760–763.
32. McCoy AJ (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst* 40:658–674.
33. Langer G, Cohen SX, Lamzin VS, Perrakis A (2008) Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat Protoc* 3(7):1171–1179.
34. Winn MD, et al. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67(Pt 4):235–242.
35. Adams PD, et al. (2011) The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods* 55(1):94–106.
36. Moriarty NW, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD (2009) electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): A tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65(Pt 10):1074–1080.
37. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 4):486–501.
38. Bricogne G, et al. (2011) *BUSTER version 2.10.1* Cambridge (Global Phasing Ltd., United Kingdom).
39. Svergun DI, Barberato C, Koch MHJ (1995) CRY SOL—A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Cryst* 28:768–773.
40. Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem* 171(2):266–270.
41. National Research Council (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academies Press, Washington, DC), 8th Ed.
42. Wilson DP, Sutherland C, Walsh MP (2002) Ca²⁺ activation of smooth muscle contraction: Evidence for the involvement of calmodulin that is bound to the triton insoluble fraction even in the absence of Ca²⁺. *J Biol Chem* 277(3):2186–2192.
43. Cremo CR, Geeves MA (1988) Interaction of actin and ADP with the head domain of smooth muscle myosin: implications for strain-dependent ADP release in smooth muscle. *Biochemistry* 37:1969–1978.
44. Kovács M, Wang F, Hu A, Zhang Y, Sellers JR (2003) Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem* 278:38132–38140.
45. Rosenfeld SS, Xing J, Chen L, Sweeney HL (2003) Myosin IIb is unconventionally conventional. *J Biol Chem* 278:27449–27455.

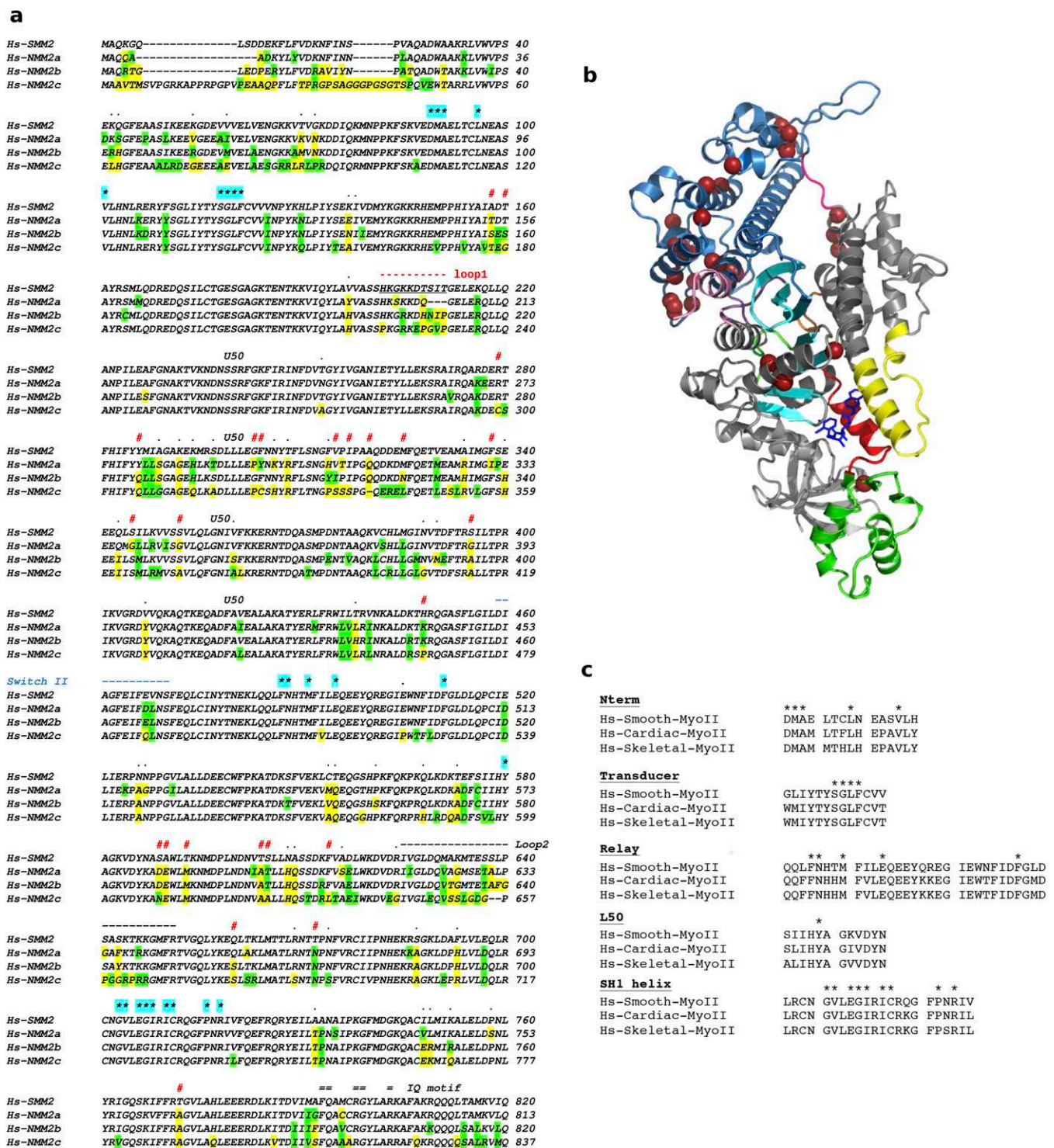


Fig. S1. (A) Sequence alignment of the heavy chain of Hs-SMM2 and Hs-NMM2a, -b, and -c. Residues that are not conserved are shown in yellow; similar residues that are not conserved are green. Residues involved in the binding of CK-571 are labeled with a star highlighted cyan: none of these residues are different in sequence between SMMs and NMMs. Human SMM2 and NMM2a, NMM2b, and NMM2c share, respectively, 83%, 84%, and 75% sequence identity and 91%, 91%, and 88% sequence similarity in their MD. Note the main sequence differences noted with the symbol # and the sequence for loop1 and switch II indicated, respectively, in red and blue. In between these two elements, the sequence corresponds to residues of the U50 subdomain. The kinetics of the allosteric rearrangements occurring in the recovery stroke depends on the full sequence of the myosin motor and determines the specific kinetic rates of ATP hydrolysis. In transient kinetic studies, the rate that measures both the recovery stroke isomerization and hydrolysis ($k_{+3} + k_3$) is faster for SMM2 (43) ($k_{+3} + k_3 = 50 \text{ s}^{-1}$) compared with NMM2A (44) ($k_{+3} + k_3 = 14 \text{ s}^{-1}$) and NMM2B (45) ($k_{+3} + k_3 = 16.7 \text{ s}^{-1}$). Differences in the U50 subdomain or the loop1 sequence are the most likely candidates to influence the overall dynamics in this transition, in particular by controlling the rearrangements necessary in the transducer for this transition (Fig. S4C). Thus, specificity in the inhibition depends on the dynamics of this reversible transition that is modulated by residues that are far from the drug binding site. (B) Residues that are not conserved between Hs-SMM2 and NMM2 and are likely candidates to modulate the recovery stroke are shown with brown spheres on the SMM/CK-571 structure (see also Movie S4). (C) Sequence alignment of Human Skeletal, Cardiac, and Smooth Myosin II. Residues involved in CK-571 binding are labeled with a star. Note that they are all identical in these different myosins.

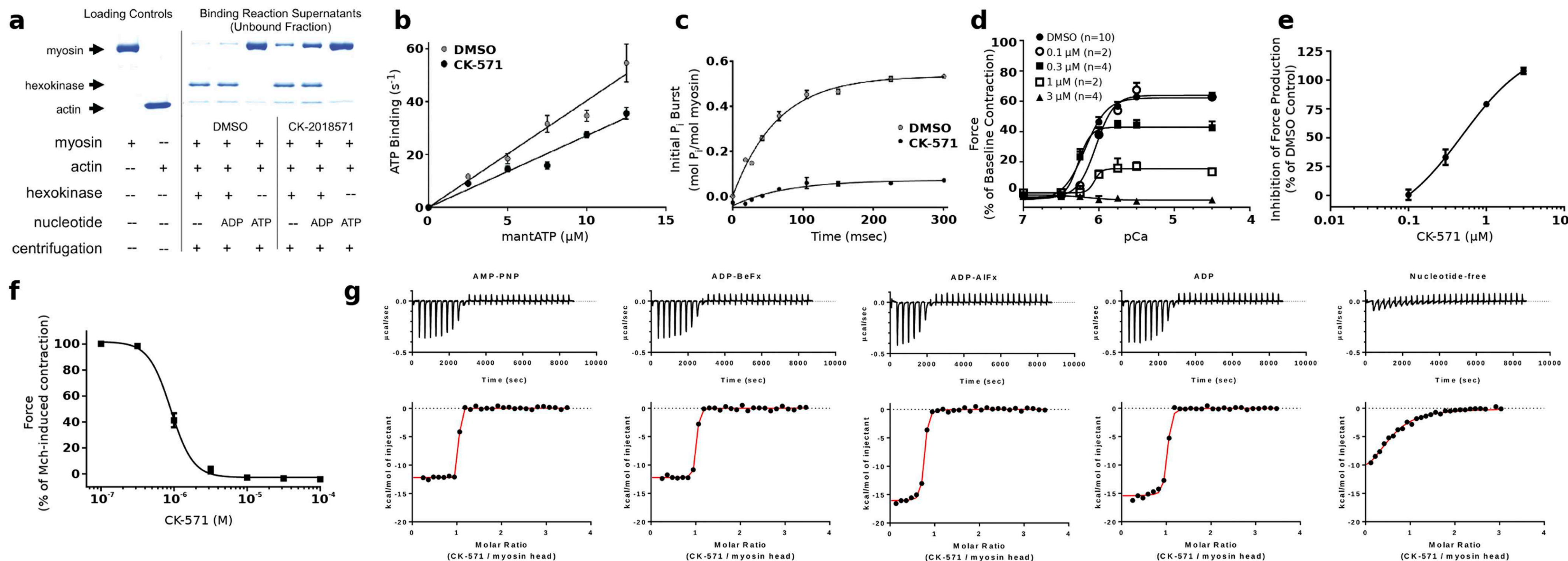


Fig. S2. Characterization of the mechanism of CK-571 in vitro. (A) CK-571 (50 μM) inhibits SMM in a weak actin-binding state, as indicated by the presence of equal or greater quantities of SMM in the supernatants from actin-binding reactions containing CK-571 compared with DMSO. This is most obvious for the motor bound with ADP, which allows strong binding to F-actin in the absence of drug but not in its presence. In the presence of ATP and saturating CK-571, essentially all SMMs are dissociated. The drug binding site is not as easily reachable when no nucleotide is bound and to a lesser extent when ADP is bound. This limits the degree to which drug binding prevents actin binding in these states. (B) CK-571 has minimal effects on the rate of ATP binding to nucleotide-free actin-bound SMM (CK-571 = $2.8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; DMSO = $4.0 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) as measured using mantATP (plotted is mean $\pm$ SEM for five replicates). (C) CK-571 slows the rate of ATP hydrolysis (CK-571 = 4 s^{-1} ; DMSO = 16 s^{-1}) and reduces the size of the phosphate burst (CK-571 = 0.1 ; DMSO = 0.53) as measured by chemical quench flow using a 10-fold excess of ATP (plotted is mean $\pm$ SD for four replicates). (D) CK-571 inhibits Ca^{2+} -dependent force production in skinned rat caudal artery rings (plotted is mean $\pm$ SEM). (E) Dose-response of CK-571 inhibition in skinned rat caudal artery rings at pCa 4.5 (plotted is mean $\pm$ SEM; EC_{50} = $0.49 \mu\text{M}$). (F) CK-571 dose-dependently relaxes intact rat tracheal rings precontracted with $3 \mu\text{M}$ MCh (plotted is mean $\pm$ SEM; n = 12; EC_{50} = $0.90 \mu\text{M}$; Hill slope = 2.9). (G) ITC experiments in the presence of AMP-PNP, ADP-BeFx, ADP-AIFx, and ADP and in the absence of nucleotide.

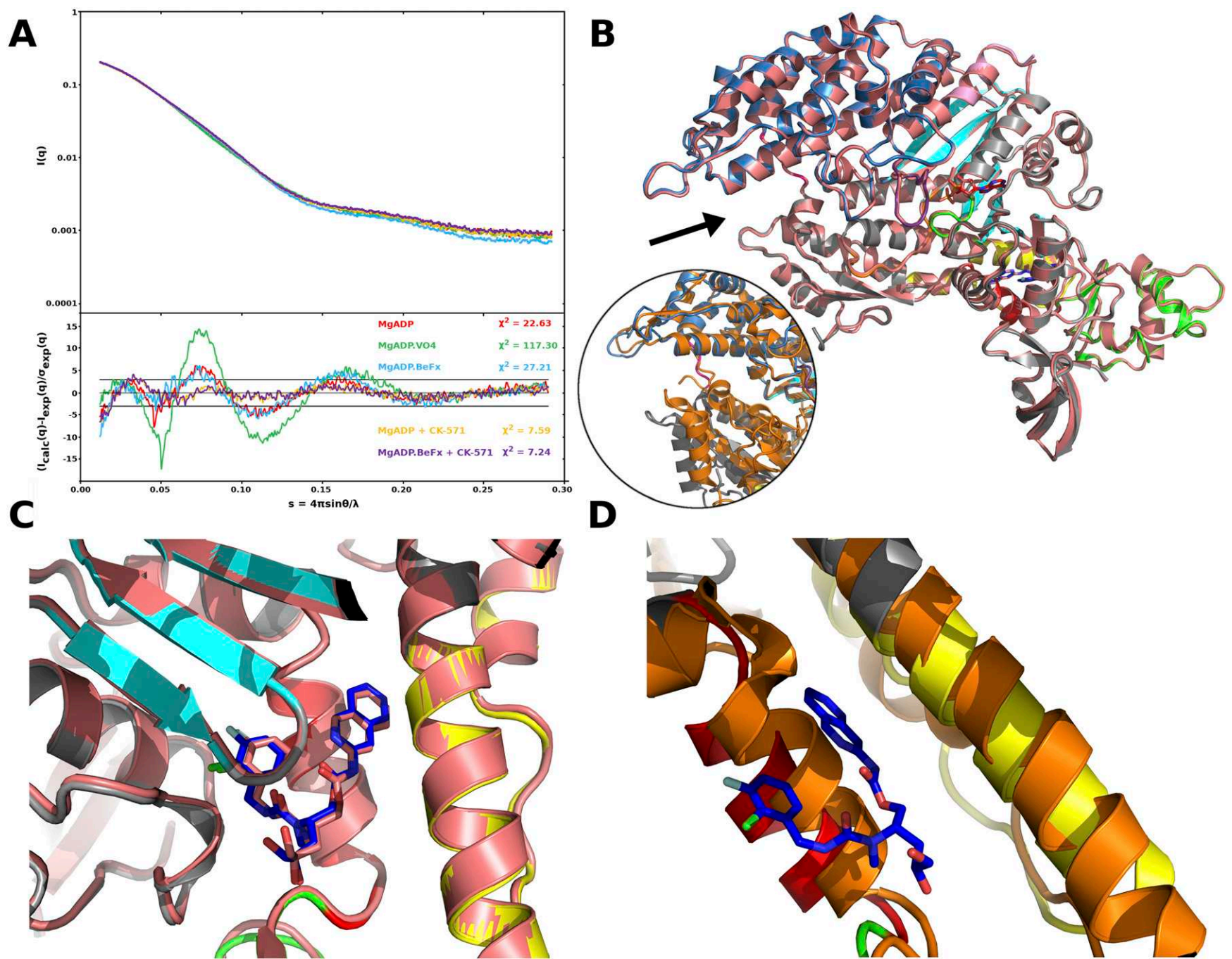


Fig. S3. CK-571 stabilizes myosin in an actin-unbound state. (A) SAXS analysis of the SMM/CK-571 structure. The SMM S1 fragment was analyzed by SAXS in several nucleotide-bound conditions (MgADP, MgADP.VO4, MgADP.BeFx, MgADP + CK-571, and MgADP.BeFx + CK-571) that allow population of different states of the motor cycle. The scattering pattern of the SMM S1 fragment that corresponds to the SMM/CK-571 crystal structure we have obtained was calculated and fit against the experimental scattering curves. (Upper) Experimental scattering intensities. (Lower) Reduced residuals of the least-squares fits on a linear scale. Two horizontal lines define the $\pm 3\sigma$ range. The χ^2 value reflects the discrepancy between theoretical and experimental curves. Note how similar the MgADP + CK-571 and MgADP.BeFx + CK-571 curves (purple, yellow) are and how they differ from that of MgADP.VO4 (green). (B) Comparison between the SMM/CK571 structures bound to MgADP.BeFx (colored) and MgADP (salmon). The two structures can be superimposed with an overall root-mean-square deviation (rmsd) of 0.32 Å for 674 Cα atoms. Both structures have an open actin-binding cleft (black arrow). This actin-binding cleft is compared with that found in the rigor-like state in which the cleft is closed (Inset, orange, PDB ID code 3I5G), after superimposition of the U50 subdomains. Note the difference in position of the L50 subdomain (gray/orange). (C) Detail of the CK-571 binding pocket for both SMM/CK-571 structures with either ADP or ADP.BeFx bound. (D) The CK-571 binding pocket in the rigor state (orange) is closed, lowering the affinity of the drug for this state.

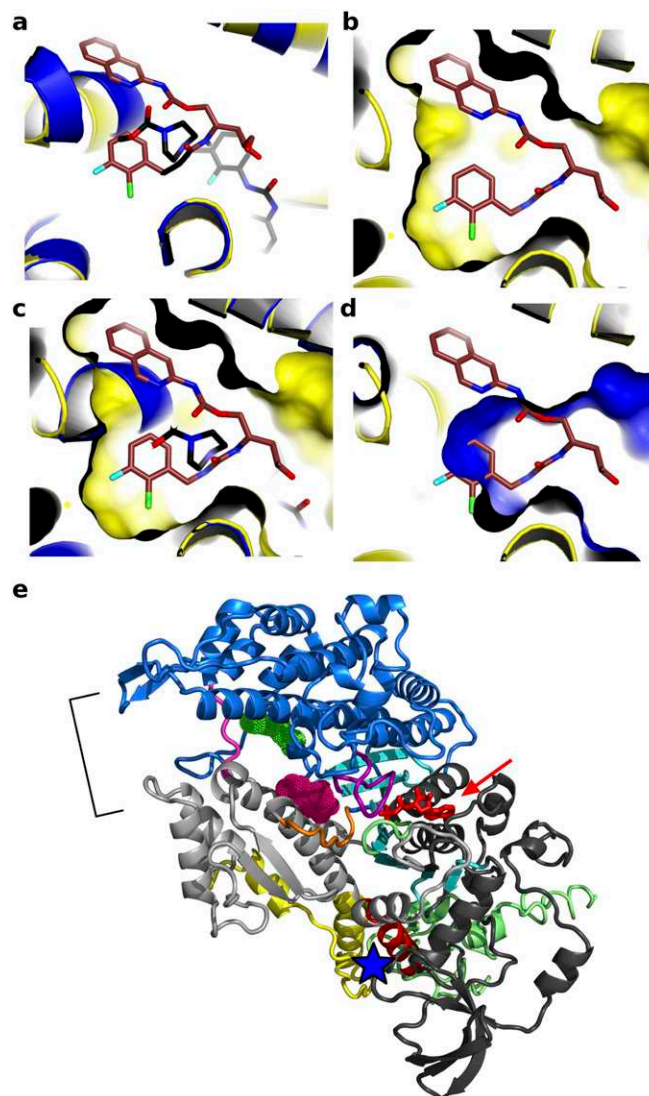


Fig. S4. Modulators of myosin activity differently influence the recovery stroke and its ability to produce force. Shown is a representation of the CK-571 (brown) and *omecamtiv mecarbil* (PDB ID code 4PA0, black) binding pockets. The binding site for CK-571 (orange) is distinct from that of myosin activator *omecamtiv mecarbil* (blue). Note that there is poor superimposition between the structural elements that surround the ligand binding pockets (A) and none of the rings of CK-571 fit in the pocket in which *omecamtiv mecarbil* binds (B–D). Note in particular how the binding surface of CK-571 (B) differs from that of *omecamtiv mecarbil* (D). (E) Representation of the *Dictyostelium discoideum* myosin II structure (PDB ID codes 2JHR and 1YV3) in a PPS state showing that blebbistatin (pink) and pentabromopseudilin (green) occupies surface pockets of the PPS state that are close to the ATP (red arrow) or the actin binding site (bracket), respectively. These sites are distant from the CK-571 site (blue star). Note that no pocket is available for CK-571 binding in the PPS state.

<u>Nterm</u>		***	*	*	
Hs-Smooth MyoII	DMAE	LTCLN	EASVLH		88-102
Hs-Myo VI	DNCS	LMYLN	EATLLH		61-75
Hs-Myo VIIa	DMR	LGDLN	EAGLLR		69-83
Hs-Myo XVIIIa	DLAS	LVYLN	ESSVLH		409-423
Hs-Myo Va	DLTA	LSYLH	EPAVLH		73-87
Hs-Myo X	DMAS	LTELH	GGSTMY		67-81
<u>Transducer</u>		****			
Hs-Smooth MyoII	GLIYTTYSGLF	CVV		112-124	
Hs-Myo VI	DRITYTY VANILIA			84-96	
Hs-Myo VIIa	HLIYTY TGSILVA			92-104	
Hs-Myo XVIIIa	SLLHTTY AGPSLLV			432-444	
Hs-Myo Va	KLIYTY YCGIVLVA			97-109	
Hs-Myo X	NQIYTY IGSILAS			90-102	
<u>Relay</u>		***	*	*	*
Hs-Smooth MyoII	QQLFNHTM	FLEEQEEYQREG	IEWNFIDFGLD		491-521
Hs-Myo VI	QQFFNERI	LKEEQELYQKEG	LGVNEVH-YVD		481-510
Hs-Myo VIIa	QQFF VVRHV	FKLEQEEYDLES	IDWLHIE-FTD		462-491
Hs-Myo XVIIIa	QRLF HERT	FVQELERYKEEN	IELAFDDLEPP		820-850
Hs-Myo Va	QQQFNMHV	FKLEQEEYMKEG	IPWTLID-FYD		462-491
Hs-Myo X	QEYFNKHI	FSLEQLEYSREG	LVWEDID-WID		459-489
<u>L50</u>		*			
Hs-Smooth MyoII	SIIHYA	GKVDY		583-593	
Hs-Myo VI	IIRH FPA	GAVCY		578-588	
Hs-Myo VIIa	GINH FPA	GIVVY		550-560	
Hs-Myo XVIIIa	GHS HGT	NMVEY		930-940	
Hs-Myo Va	IIQH FPA	DKVEY		549-559	
Hs-Myo X	GVKHYA	GEVQY		545-555	
<u>SH1 helix</u>		***	***	*	*
Hs-Smooth MyoII	LRCN	GVLEGIRICRQG	FPNRIV		706-727
Hs-Myo VI	LQCS	GM VSVL DL LM QGG	YPSRAS		689-710
Hs-Myo VIIa	LRYS	GM MT TIRIRRAG	YPIRYS		656-678
Hs-Myo XVIIIa	LRGS	RLLD AMR MYR QQ	Y PDH MV		1096-1118
Hs-Myo Va	LRAC	GV LE TIRIS AAG	FPSRWT		680-702
Hs-Myo X	LRYS	GM LE T VR IRKAG	YAVRRP		657-678

Fig. S5. Sequence alignment of Hs-Smooth Myosin II (Hs-SMM) and different human myosins. Out of 24 residues that directly interact with CK-571, 10 are not conserved in HsMyoVI, 10 are not conserved in MyoXVIIIa, 7 are not conserved in MyoVIIa, 5 are not conserved in MyoVa, and 7 are not conserved in MyoX. Residues involved in CK-571 binding are labeled with a star. Residues that are similar but not identical are in blue; residues that are not conserved are in yellow.

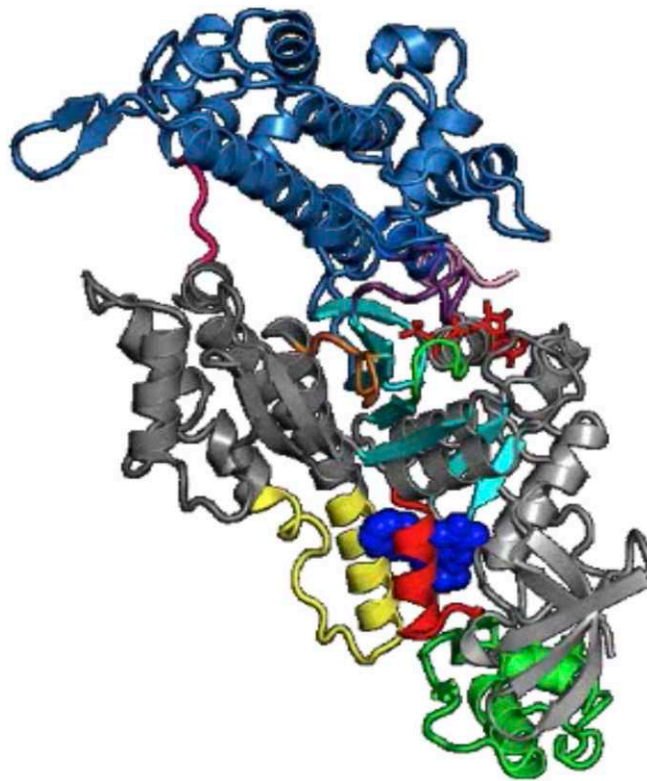
Table S1. Data collection and refinements statistics

Crystal	SMM/CK-571 MgADP.BeFx	SMM/CK-571 MgADP
Data collection		
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å	72.94, 202.17, 67.02	73.19, 202.97, 67.56
α , β , γ , °	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolution, Å	50.00–2.65 (2.74–2.65)	49.68–2.67 (2.77–2.67)
No. reflections		
Total	202,529	202,527
Unique	29,002	29,000
Completeness, %	99.0 (93.8)	99.0 (91.0)
Redundancy	6.98 (6.95)	7.0 (6.6)
<i>R</i> _{sym}	10.2 (76.2)	10.2 (80.72)
<i>I</i> / σ	14.23 (2.17)	14.23 (1.97)
Refinement		
Resolution, Å	44.35–2.80 (2.91–2.80)	49.68–2.67 (2.77–2.67)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} , %	21.89/27.11 (29.56/37.05)	18.47/24.40 (25.86/33.85)
rmsd		
Bond lengths, Å	0.010	0.009
Bond angles, °	1.18	1.243
Number of atoms		
Nonhydrogen, protein	5,800	5,781
Drug	35	35
Water	84	54
Nucleotide	31	27
PDB ID code	5T45	5M05

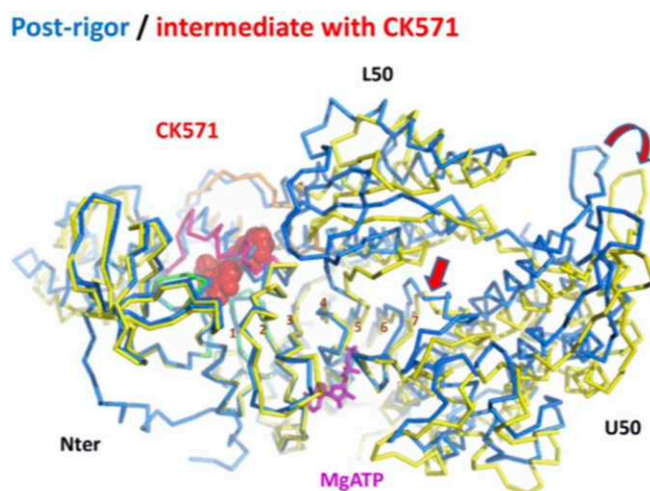
Values in parentheses are for highest resolution shell. The structures were solved by molecular replacement with data from a single crystal.

Table S2. Myosin II structures used for analysis and comparison

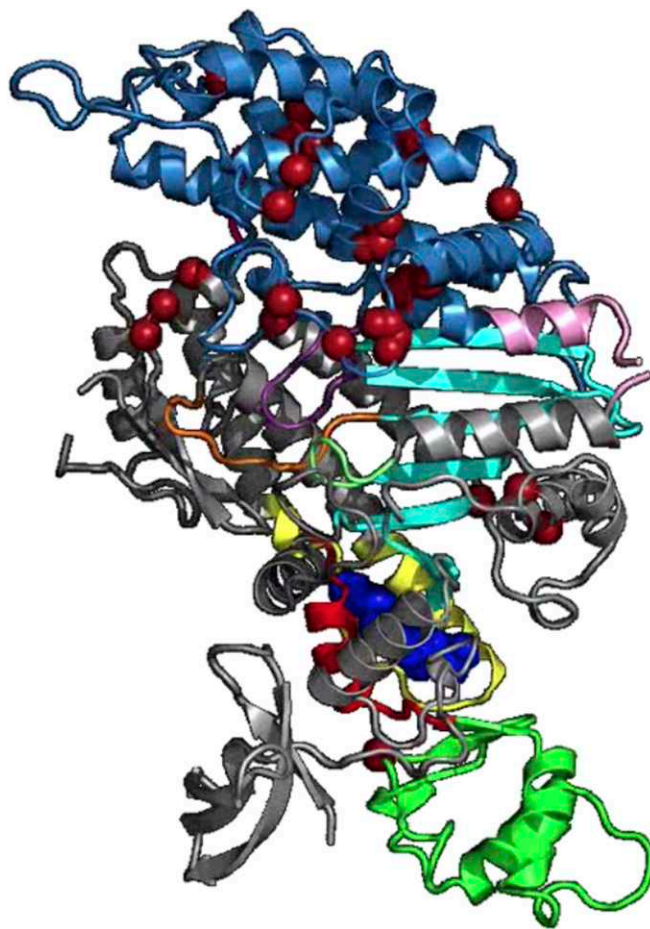
PDB code	Myosin structure
PR, before the recovery stroke	
3I5F	Squid skeletal muscle myosin II in postrigor
1SR6	<i>Argopecten</i> skeletal muscle myosin II in postrigor
2OTG	<i>Placopecten</i> skeletal muscle myosin II in postrigor
2MYS	Chicken skeletal muscle myosin II in postrigor
4DB1	Human beta cardiac muscle myosin II in postrigor
4P7H	Human beta cardiac muscle myosin II in postrigor
PPS, after the recovery stroke	
1QVI	<i>Argopecten</i> skeletal muscle myosin II in PPS
1BR1	Chicken smooth muscle myosin II in PPS
2YCU	Human non muscle myosin IIC in PPS

**Movie S1.** Structure of the SMM II MD bound to the CK-571 inhibitor (blue). The nucleotide is indicated in red sticks. Movie is related to Fig. 2A.[Movie S1](#)

Movie S2



Movie S3



Movie S4. Sequence differences between SMM and NMM are far from the CK-571 binding site (based on Fig. 2 and Fig. S1). Sequence differences between Hs-SMM2 and Hs-NMM2 are indicated with firebrick colored balls. Note that none of these differences are close to the path or the pocket that the drug will follow or occupy to act as an inhibitor.

[Movie S4](#)

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-00176-5

OPEN

Mechanistic and structural basis for activation of cardiac myosin force production by omecamtiv mecarbil

Vicente J. Planelles-Herrero ^{1,2}, James J. Hartman ³, Julien Robert-Paganin¹, Fady I. Malik³
& Anne Houdusse ¹

Omecamtiv mecarbil is a selective, small-molecule activator of cardiac myosin that is being developed as a potential treatment for heart failure with reduced ejection fraction. Here we determine the crystal structure of cardiac myosin in the pre-powerstroke state, the most relevant state suggested by kinetic studies, both with (2.45 Å) and without (3.10 Å) omecamtiv mecarbil bound. Omecamtiv mecarbil does not change the motor mechanism nor does it influence myosin structure. Instead, omecamtiv mecarbil binds to an allosteric site that stabilizes the lever arm in a primed position resulting in accumulation of cardiac myosin in the primed state prior to onset of cardiac contraction, thus increasing the number of heads that can bind to the actin filament and undergo a powerstroke once the cardiac cycle starts. The mechanism of action of omecamtiv mecarbil also provides insights into uncovering how force is generated by molecular motors.

¹Structural Motility, Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 144, F-75005 Paris, France. ²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris06, Sorbonne Universités, IFD, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France. ³Research and Development, Cytokinetics, Inc., South San Francisco, CA 94080, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.H. (email: anne.houdusse@curie.fr)

Hearth failure is a common human condition and is the most frequent cause of hospitalization in people over the age of 65¹. Once hospitalized for heart failure, mortality rates at 30 days, 1 year, and 5 years were as high as 10%, 22%, and 42% in patients from four United States communities². Decreased cardiac contractility is a central feature in systolic heart failure also known as heart failure with reduced ejection fraction (HF-rEF), and yet there exist no medications that directly enhance cardiac contractility and simultaneously improve survival.

Targeting cardiac myosin may be a promising approach for the treatment of systolic heart failure, increasing cardiac contractility in the absence of deleterious adverse effects such as tachycardia, hypotension, and cardiac arrhythmias³. Omecamtiv mecarbil (OM) is a selective, small-molecule cardiac myosin activator that binds to the catalytic domain of myosin and increases cardiac contractility in preclinical models without affecting cardiac myocyte intracellular calcium concentrations or myocardial oxygen consumption^{4, 5}. The effects of OM on cardiac function have been studied extensively in humans^{3, 6, 7}. Currently, OM is being studied in a Phase 3 clinical trial of ~8000 patients to determine if treatment with OM, when added to standard of care, reduces the risk of cardiovascular death or heart failure events in patients with chronic heart failure and reduced ejection fraction (GALACTIC-HF, www.clinicaltrials.gov identifier, NCT02929329).

Several studies have characterized how OM influences the transitions of the motor ATPase cycle^{4, 8, 9}. However, the structural basis that reveals how it enhances force generation is currently unknown. Understanding its precise mechanism of action could shed light on critical questions regarding force generation by the myosin motor and the function of the sarcomere that are still a matter of debate.

The force produced by myosin motors is generated by coupling the sequential release of the products of ATP hydrolysis (Phosphate (P_i) and ADP) to a series of strong actin-binding states and the swing of a distal elongated domain of myosin called the lever arm. The powerstroke is the displacement produced by the lever arm swing that in muscle allows the motor to pull on the actin track and causes shortening of the sarcomere (Fig. 1a). According to a recent unifying model, the powerstroke occurs via at least four strongly actin-bound states that occur in sequence: P_i Release, Intermediate, Strong-ADP, and Rigor¹⁰. The rest of the motor cycle corresponds to structural states of the motor that have weak affinity for the actin filament. First, the post-rigor (PR) state is populated upon detachment from the actin filament following ATP binding. Next, the recovery stroke begins, corresponding to the transition that reprimers the lever arm, ending up in the pre-powerstroke state (PPS) during which ATP hydrolysis occurs. In the PPS, the hydrolysis of ATP is reversible, that is the nucleotide freely interconverts between ATP and ADP· P_i in an approximate equilibrium. Finally, rebinding of the PPS-ADP· P_i state to the actin filament triggers the transition from the PPS to the P_i Release state that promotes stronger binding to the actin filament. During this transition, the active site opens to allow for phosphate (P_i) release^{10, 11}, making the step irreversible. The motor then proceeds through the strongly bound states during which the powerstroke occurs, generating tension on the actin filament to which it is bound.

The kinetic steps in the motor ATPase cycle that OM influences have been identified. OM shifts the equilibrium of the recovery stroke and the myosin ATP hydrolysis step toward the ADP· P_i -bound state, thus increasing the population of heads in the PPS state ready to bind to the actin filament⁸. Upon attachment to the actin filament, the rate and amplitude of phosphate release from myosin increases if OM is bound since

more myosin heads can bind to the actin filament. In contrast, the rate of ADP release by myosin attached to the actin filament is not changed whether OM is present or not^{4, 9}.

A structure of OM bound to cardiac myosin has recently been determined in the PR state without nucleotide bound¹²—a state myosin populates only after detaching from the filament (Fig. 1a). However, the PR state is not the step in the myosin cycle that appears important for the action of OM as an activator based on the enzymology. Moreover, this previously reported binding site does not provide a rationale for the selectivity of OM for cardiac myosin, as compared to other muscle myosins.

Here, we describe a previously unseen conformation of the bovine cardiac myosin motor in the PPS state that OM stabilizes and binds to with high affinity. The drug location differs from the previously reported binding site¹². This specific allosteric site for OM binding not only accounts for the selectivity of the drug for cardiac myosin, but it also provides a strong rationale for the mechanism of cardiac myosin activation.

Results

OM binds to a specific pocket to stabilize the PPS state.

To reveal the basis of the mechanism of activation by OM and its specificity, it is critical to visualize the drug in the myosin transition states that are directly affected by OM during the acto-myosin cycle. The previously reported pocket for the OM-binding site in the PR structure¹² is closed and thus unavailable in the PPS state of myosins (Supplementary Fig. 1a, b). Binding at this PR site therefore does not account for the stabilization of the motor at the end of the recovery stroke (in the PPS ADP· P_i state, Fig. 1a). Kinetic studies have shown that stabilization of this state is an essential property of OM to function as an activator of force production in the sarcomere⁸.

To visualize how OM stabilizes states of myosin at the end of the recovery stroke, we co-crystallized the bovine β -cardiac myosin S1 fragment in the PPS state with OM bound (OM-S1-PPS structure) at 2.45 Å resolution (using vanadate as a P_i analog; Fig. 1b, c and Table 1). We were also successful in crystallizing the bovine β -cardiac muscle myosin in the PPS state without drug bound (APO-MD-PPS structure) at 3.10 Å resolution, from crystals obtained after proteolysis in situ in the presence of MgADP and inorganic phosphate (P_i ; Fig. 1d and Table 1).

Comparison of these two cardiac PPS structures reveals that drug binding does not significantly alter the structure of the motor domain (Fig. 2a). The two motor domains of OM-S1-PPS and APO-MD-PPS structures can be superimposed overall with a root-mean-square deviation (r.m.s.d.) of 0.88 Å for 557 C α atoms between the OM bound and APO structures and with a r.m.s.d. of 1.33 Å for 593 C α atoms if the relay and converter are also taken into consideration. Comparison with other myosin II isoforms in the same structural state reveals that the cardiac myosin PPS state is also very similar to that of *Argopecten* (scallop)-striated muscle myosin II (1QVI¹³, r.m.s.d. of 0.75 Å for 582 C α atoms; Fig. 2b) and chicken smooth muscle myosin (SMM) II (1BR1¹⁴, r.m.s.d. of 0.95 Å for 547 C α atoms). When the β -cardiac OM-S1-PPS and the APO-MD-PPS structures are compared, the major differences are observed surrounding the OM-binding pocket (Fig. 2c, d), which directly account for the stabilization of a primed position for the lever arm (Fig. 1b, c).

OM favors states with a lever arm primed. In the OM-S1-PPS structure, OM binds in a previously unseen pocket of the motor, which we call the “PPS” allosteric site. This “PPS” pocket is not only separated by more than ~18 Å from the previously described site in the PR state¹² (“PR” pocket), but also its environment is completely different (Fig. 1e). The high quality of the electron

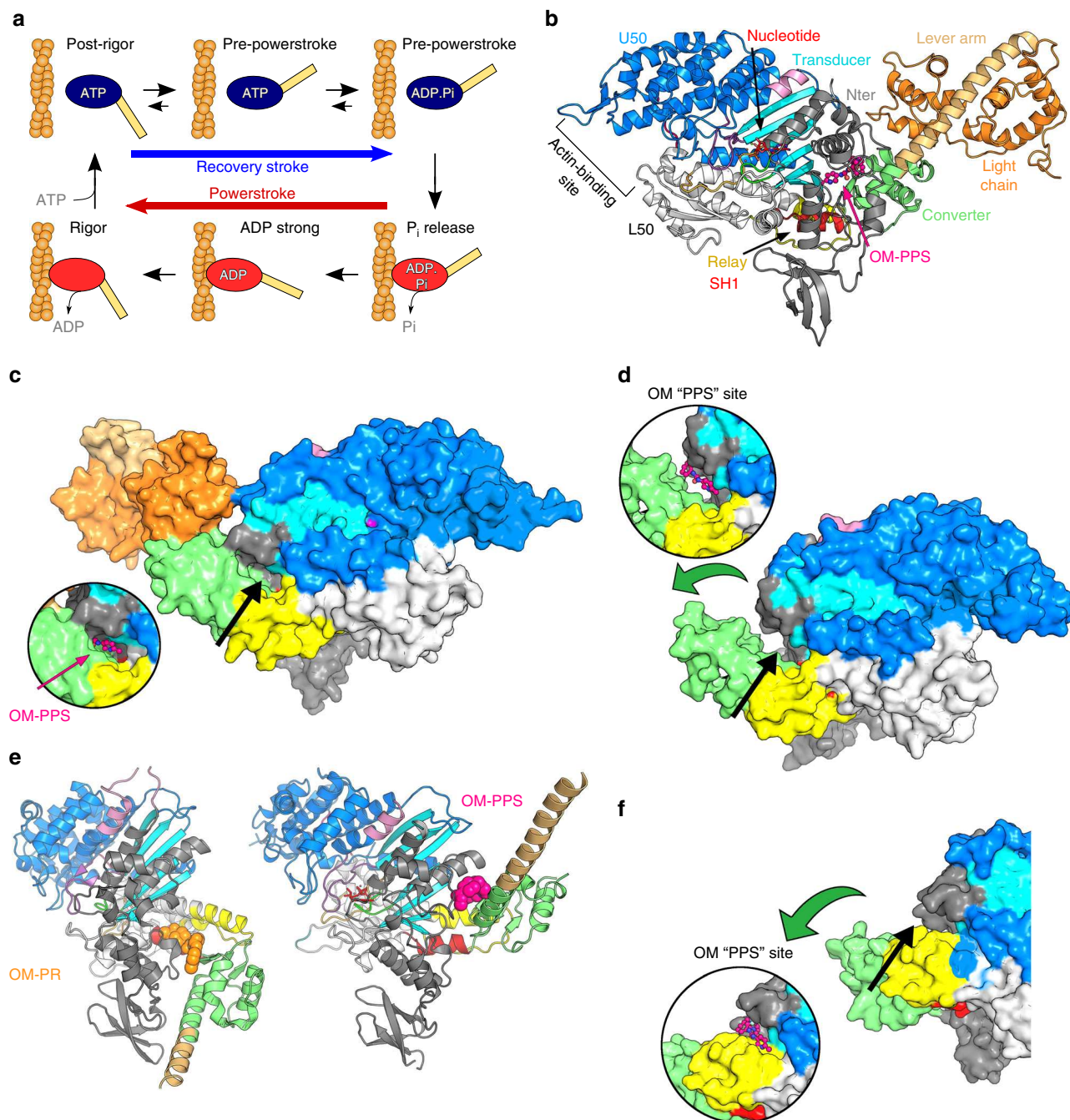


Fig. 1 OM binds to a specific pocket of the PPS that stabilizes the lever arm primed position. **a** Myosin chemomechanical cycle. Myosin motors generate force upon releasing ATP hydrolysis products when attached to F-actin (orange filament). The swing of the lever arm (yellow) is associated with force generation (Powerstroke) when myosin is strongly bound to F-actin (myosin states in red). At the end of the stroke, nucleotide-free myosin is strongly attached to F-actin (Rigor). Myosin detaches from F-actin upon ATP binding and adopts the PR state. It then undergoes transitions that reprime the lever arm during the recovery stroke (blue arrow). ATP hydrolysis stabilizes the PPS. F-actin triggers a series of conformational changes within the motor associated with force production. The motor first populates the P_i Release state without major changes in the lever arm position (PPS to P_i Release transition). Then a series of conformational changes occur associated with force production (Powerstroke) and ADP release. **b** Overall view of the cardiac myosin motor domain (OM-S1-PPS structure). In the PPS state, OM (pink) introduces itself in a buried pocket between the N-terminal domain (grey), the transducer (cyan), the relay helix (yellow), and the converter (green). This color code is used in all figures except when indicated. **c** Surface representation of the cardiac OM-S1-PPS structure. Most of the OM molecule (pink) is not accessible to solvent. **d** Surface representation of the cardiac APO-MD-PPS structure. The inset represents the position of OM in the PPS state. Note that the OM-PPS site is not completely closed as in **c**: the converter (green) orientation is less primed. **e** The “PR” allosteric binding pocket for OM (orange) and the “PPS” binding site for OM (pink) are quite distant from one another. See also Supplementary Movie 1. **f** Surface representation of myosin IIb in the rigor state (4PD3³⁴). The OM-PPS site is completely open and unable to bind OM strongly since the converter is unprimed. (The green arrow indicates the swing compared to the primed position as found in **c**). The inset shows the location of the OM “PPS” site. No bond can occur between OM and the converter (green) when it has swung in a post-stroke position

Table 1 Data collection and refinement statistics		
Data collection	OM-S1-PPS MgADP.VO ₄	APO-MD-PPS MgADP.P _i
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	C222 ₁
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	98.3, 122.5, 187.4	87.7, 149.8, 154.3
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolution (Å)	50–2.45 (2.54–2.45)*	50–3.02 (3.21–3.02)
R _{sym}	0.30 (1.73)	0.28 (0.94)
I/σ	5.41 (0.96)	8.35 (1.62)
CC _{1/2} (%)	98.6 (38.3)	99.6 (60.2)
Completeness (%)	99.3 (95.9)	98.0 (80.0)
Redundancy	8.6 (8.0)	13.4 (4.0)
Refinement		
Resolution (Å)	24.22–2.45	43.39–3.10
No. of reflections	710,243 (total), 82,904 (unique)	19,862 (total), 1585 (unique)
R _{work} /R _{free} (%)	18.12/22.34	24.67/31.98
No. of atoms		
Protein	14,851	5,404
Ligand/ion	295	45
Water	857	72
B factors		
Protein	56.83	85.87
Ligand/ion	65.22	56.97
Water	55.71	61.48
r.m.s.d.		
Bond lengths (Å)	0.010	0.010
Bond angles (°)	1.12	1.23
PDB code	5N69	5N6A

*Values in parentheses are for highest-resolution shell

density map for the OM-S1-PPS structure allows unambiguous placement and orientation of the drug in the PPS site (Supplementary Fig. 2). OM occupies a pocket that can form only in states of the motor with a primed lever arm. In this buried pocket, OM is at the center of a network of interactions between the N terminus, the relay helix, and the converter domain (Fig. 3). By interacting with all these elements that contribute to control the lever arm swing, OM stabilizes the PPS state, in which the lever arm is primed.

In order to confirm that the PPS state is favored by OM, small-angle X-ray scattering (SAXS) studies were performed to demonstrate that the state populated by the drug in solution is indeed the OM-S1-PPS structure we crystallized. The quality of the fit ($\chi^2 = 1.69$) agrees with the conclusion that the OM-S1-PPS structure is the conformation adopted in solution (Fig. 4a). The scattering curves indicate that the cardiac S1 fragment with OM and MgADP.VO₄ bound exists in a similar conformation to that adopted by the myosin motor with MgADP.VO₄ bound and no drug (PPS state; Fig. 4b). In contrast, the scattering curve is quite different when MgADP alone is bound to the motor. In the absence of actin, MgADP favors states with the lever arm down at the beginning of the recovery stroke such as the PR state. However, it is likely that these myosin MgADP heads can transiently explore conformations with the lever arm primed, which would allow OM binding and shift the population of conformations toward states with the primed lever arm. Thus, OM binding to the myosin motor when MgADP is present in the active site stabilizes a new conformation close to the PPS state even in the absence of the phosphate analog, VO₄ (Fig. 4b).

OM thus clearly stabilizes states in which the lever arm is primed (Fig. 5). These results are in full agreement with the

finding that OM slows the rate of the reverse recovery stroke that unprimes the lever arm⁸. The “PPS” pocket in which OM binds requires the contribution of a primed converter (Fig. 1c). The drug pocket can only form in states at the end of the recovery stroke (PPS) or at the beginning of force generation (P_i Release state (P_iR), Supplementary Fig. 1c), in which the converter adopts a primed position (Figs. 1c; 5). OM binding to this “PPS” site cannot occur in states of the motor with a lever arm down (Rigor and PR, Fig. 1f and Supplementary Fig. 1c) that are populated after the powerstroke or upon detachment of the motor from its track (Fig. 1a). Taken together, these findings explain how prior to the start of cardiac systole, OM increases the number of heads with the lever arm primed, which can produce force upon actin binding once calcium binds to the troponin–tropomyosin complex (Fig. 5).

The PPS OM-binding site. In the PPS state, OM binding involves extensive interactions with the N-terminal subdomain (K146, R147, N160, Q163, Y164, T167, and D168), the relay helix (H492), the extremity of the third beta-strand of the transducer (H666), and the converter (P710, N711, R712, I713, R721, Y722, F765, L770, and E774), as depicted in Fig. 3. The nature of the interactions is predominantly hydrophobic, although the methyl-pyridinyl ring forms a polar contact and the carbamoyl-amino moiety makes five polar contacts with both side chains and main chain atoms of the surrounding residues. Most of the OM molecule is buried in the structure, and only the methyl-pyridin-3-yl ring is partially exposed to the solvent (Fig. 1c), which is consistent with the tolerance to substitutions made at this site during the optimization effort that produced OM¹⁵. The characteristics of this “PPS”-binding pocket are compared to that of the previously reported “PR”-binding site for OM in Supplementary Table 1. In particular, the OM drug is more tightly bound in the “PPS” site, as indicated by the electron density map (Supplementary Fig. 2), and the fact that apo crystals can’t be grown spontaneously in conditions where OM-S1-PPS crystals grow, arguing in favor of a full occupancy of the PPS site by OM. In contrast, the occupancy of the “PR” site by OM is lower as shown by local ligand density fit (LLDF) values (Supplementary Table 1) and this correlates with isothermal titration calorimetry (ITC) measurements (Table 2 and Supplementary Fig. 3). The K_d for OM binding to cardiac myosin is 0.29 μM when the motor is bound to nucleotide analogs that favor the PPS state. In contrast, no binding is detected when the motor is depleted of nucleotide, in which case the motor mostly explores PR and rigor-like states.

Upon binding to the cardiac motor domain, OM adopts a crescent shape with a sharp bend (Fig. 2). Interestingly, comparison of the two OM-S1-PPS molecules present in the asymmetric unit reveals that both OM molecules are in the exact same position and interact similarly, consistent with the fact that the drug is tightly and specifically bound. Comparison of the structures with and without drug bound reveals that the OM-binding pocket is actually not completely formed in the APO-MD-PPS structure (Fig. 1c, d). Tight binding of OM in the “PPS” pocket stabilizes a specific position of the primed lever arm among those explored by cardiac myosin in the PPS state (Figs. 1b, c and 2). Interestingly, in the presence of OM, the lever arm adopts a primed lever arm position that is close to that previously observed for scallop myosin II (Fig. 2b), while the cardiac apo PPS structure has a lever arm position slightly less primed, with concerted changes in the relay and the converter position (Fig. 2c, d). In summary, the drug binds into a pocket via induced fit and consequently stabilizes the lever arm in a fully primed position.

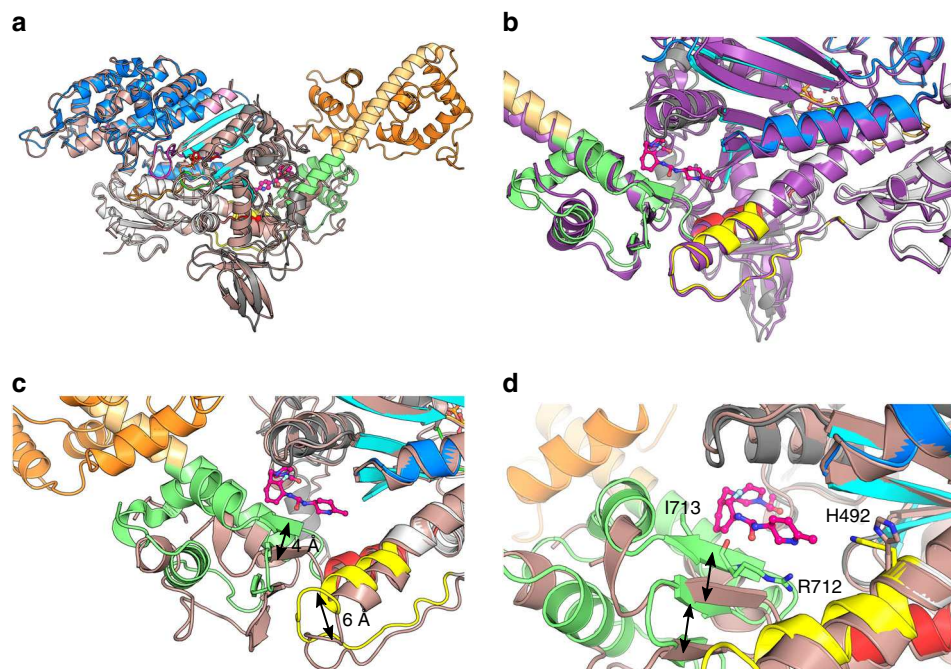


Fig. 2 Binding of OM stabilizes a specific primed position of the myosin lever arm and does not affect the motor domain conformation. **a** The features of the motor domain including the position of the subdomains (Nter (grey), U50 (blue), L50 (white)) and key connectors are similar for the OM-S1-PPS (multi-colored) and the APO-MD-PPS (pink) structures. **b** Superimposition of the OM-S1-PPS (multi-colored) structure with the *Argopecten* skeletal myosin II in the PPS state (1QVI¹³, purple). **c** Comparison of the relay and the converter in the APO-MD-PPS structure (pink) and the OM-S1-PPS (multi-colored). The relay (yellow) is displaced by ~6 Å, and the converter subdomain (green) is rotated (15°) and translated (~4 Å). Overall, OM binding stabilizes a conformation of the converter that forms a specific “PPS” allosteric binding site for OM and maintains the converter in a primed position. **d** Detail of the OM “PPS” binding pocket. Closure of the allosteric site (black arrows) stabilizes interactions between OM and converter residues, such as Arg712 and Ile713 as well as His492 which adopts a new conformation to interact with OM

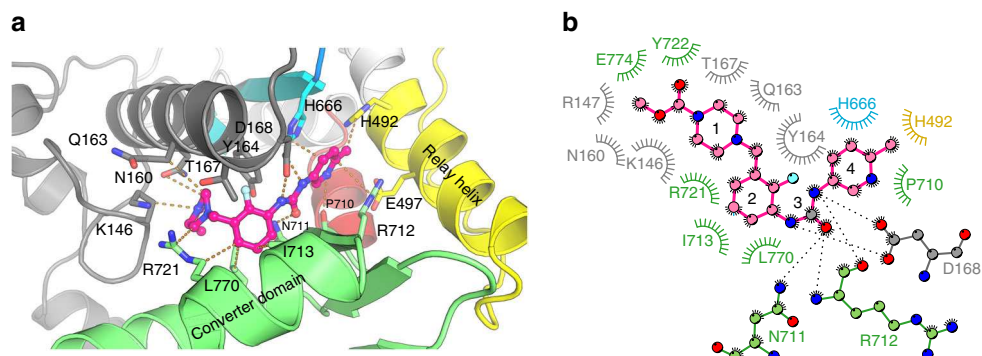


Fig. 3 The OM PPS binding site in the cardiac myosin motor domain. Ribbon **a** and diagram **b** representations of the most extensive interactions found in the OM “PPS” binding pocket. The different regions of the OM molecule are indicated with numbers: 1 carboxymethyl-piperazine; 2 fluoro-benzyl ring; 3 carbamoyl-amino linker; 4 methyl-pyridinyl ring

The PPS binding site of OM accounts for its specificity. The “PPS” allosteric OM-binding site found in OM-S1-PPS agrees with the previously reported OM-binding site identified using a photo-reactive benzophenone derivative of OM that crosslinked to Ser148⁴ (Supplementary Fig. 1d). The orientation and position of the drug described in the “PR”-binding site¹² (Supplementary Fig. 1d) are not compatible with crosslinking of this OM derivative to Ser148. Together, this analysis strongly supports the conclusion that the “PPS”-binding site revealed with the OM-S1-PPS structure is the critical location OM occupies to increase the force produced by β -cardiac myosin.

Additionally, the network of interactions between the drug and the motor in the “PPS”-binding site readily explains the specificity of OM action toward cardiac myosin and not other

closely related myosins, such as SMM and skeletal muscle myosin⁴ (Table 3). The most important packing interactions with OM are accomplished with residues Y164, D168, H492, H666, N711, R712, and I713, which are strictly conserved between bovine and human cardiac myosin (Table 3). Interestingly, the majority of these residues are not conserved in the sequence of other myosin II isoforms (Table 2). In particular, four main residues vary in these sequences: Y164 (Ser in SMM, Phe in Skeletal), H666 (Thr in SMM), N711 (Ser in Skeletal), and I713 (Val in Skeletal). These important differences plainly account for the selectivity of OM for cardiac muscle myosin II. In contrast, most of the residues found in the “PR” pocket are conserved among myosin II isoforms (Supplementary Table 2).

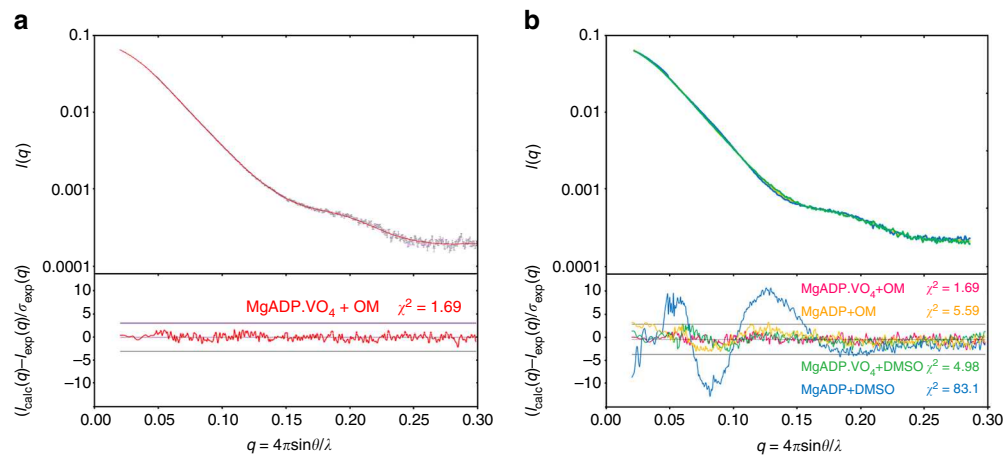


Fig. 4 SAXS data show that, in solution, OM populates a myosin conformational state similar to PPS. **a** (Upper panel) Experimental scattering intensities of the MgADP.VO₄+OM condition in black (with associated error bars) superimposed on the calculated scattering patterns of the OM-S1-PPS structure is shown as a continuous red line. (Lower panel) Reduced residuals of the least-squares fits shown on a linear scale ($\pm 3\sigma$ indicated with horizontal lines). The quality of the fit ($\chi^2 = 1.69$) reveals that the crystal structure corresponds to the conformation adopted in solution. **b** (Upper panel) Experimental scattering intensities of the MgADP+OM (yellow), MgADP.VO₄+DMSO (green), and MgADP+DMSO (blue). (Lower panel) The χ^2 -value reflects the discrepancy between the different experimental curves and the theoretical scattering of the OM-S1-PPS structure. Note how similar are the curves with MgADP.VO₄ or bound to OM, and how they differ from that of MgADP in the absence of OM (blue)

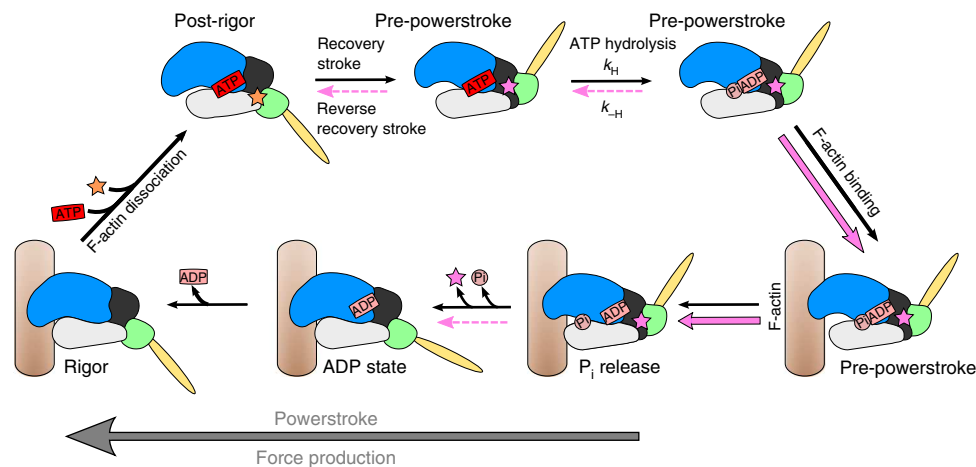


Fig. 5 Effect of OM on the chemomechanical actomyosin ATPase cycle. The motor cycle is presented, highlighting the conformational changes that the motor domain undergoes along the motor cycle as well as the states to which OM can bind in either the “PR” site (orange star¹²) or the “PPS” site (pink star). ATP hydrolysis stabilizes the Pre-powerstroke state, as does the binding of OM to the “PPS” site, which greatly slows the reversal of the recovery stroke (dotted pink lines). Rebinding to F-actin (brown filament) in this PPS state triggers a series of conformational changes associated with force production (Powerstroke). OM increases the number of heads ready to produce force (red square). OM binding in the “PPS” site increases the rate of the transition that allows the release of P_i (pink arrows) since this step occurs while the lever arm stays primed. The following transition destabilizes the “PPS”-binding pocket since it requires the swing of the lever arm. Time-resolved FRET studies¹⁸ have shown that this step is slowed (dotted pink arrow). OM thus increases force production by increasing the number of myosin heads bound to F-actin in the early stages of force production

OM dissociates from myosin during the recovery stroke. The two “PR”-binding sites and “PPS”-binding sites of OM are far away from one another in the pre-recovery and post-recovery stroke structural states (Fig. 1d). This raises the question of whether the drug could remain bound while the motor undergoes the recovery stroke as some binding interactions may not be maintained. In fact, a number of observations indicate that the relocation of the drug from the “PR” to the “PPS” site may involve drug dissociation. First, the residues that are common in the two binding sites (P710, N711, R712, and L770) make drastically different interactions with the drug in the two binding sites (Supplementary Fig. 1d). Moreover, the orientation of the drug is opposite in the two sites (Supplementary Figs. 1d and 4).

If the OM concentration is sufficient to bind in the “PR” pocket, the 180° rotation required for the drug in such a narrow pocket indicates that detachment from the site is likely upon the recovery stroke.

PPS structure sheds light on the mechanism of action of OM. As the “PPS” OM-binding pocket closes, it buries the drug allowing OM to act as a bridge between the converter domain, the relay helix, and the N-terminus subdomain near the third beta-strand of the transducer. By doing this, OM stabilizes the PPS and thus favors ATP hydrolysis, increasing the number of heads with ADP.P_i at the end of the recovery stroke, ready to

Table 2 ITC-binding experiments

Parameter	Nucleotide state				
	AMPPNP (n = 5)	ADP-BeFx (n = 5)	ADP-VO ₄ (n = 5)	ADP (n = 5)	Nucleotide-free (n = 5)
Stoichiometry (N)	0.81 ± 0.01	0.79 ± 0.02	0.80 ± 0.01	0.37 ± 0.06	ND
Affinity (K _d μM)	2.80 ± 0.37	1.80 ± 0.21	0.29 ± 0.04	5.3 ± 1.8	ND
Enthalpy (ΔH, kcal mol ⁻¹)	9.40 ± 0.63	8.40 ± 0.46	-3.50 ± 0.12	7.4 ± 2.9	No heat signal
Entropy (ΔS, e.u.)	59.0 ± 2.0	56.0 ± 1.4	17.0 ± 0.5	50.0 ± 9.8	ND

OM binding to cardiac myosin is nucleotide-dependent and is stronger in the presence of MgADP.VO₄ in the binding pocket. The ability for myosin to adopt states with a primed lever arm depends on the nucleotide in the following order (Nucleotide free < ADP < AMPPNP < ADP.BeFx < ADP.VO₄), which is the same as that found for the affinity of OM to cardiac myosin. Averaged means for five technical replicates ± SD are shown

commit to binding the actin filament once cardiac systole begins. Interestingly, the stabilization of this PPS state with ADP.P_i bound by OM also enhances the trapping of P_i in this state as shown by the reduced ATPase activity in the absence of F-actin when OM is bound^{4,8,9}. This trapping of P_i until F-actin binds is absolutely essential for motor activity¹⁶. In contrast, once these primed PPS myosin heads bind to the actin filament, P_i is rapidly released^{4,8}, indicating that OM binding in the “PPS” pocket is compatible with the PPS to P_i release transition (Supplementary Fig. 1c).

Discussion

Myosin motors are complex machines that must undergo a series of precise and timely controlled transitions for their activity. In cardiac muscle, cardiac myosin comprises, in part, the thick filament of the cardiac sarcomere and powers cardiac contractility. To test the hypothesis that directly increasing cardiac performance might benefit patients with HF-rEF, selective, direct activators of cardiac myosin were identified by high-throughput screening of a synthetic small-molecule library using a reconstituted cardiac sarcomere assay⁴. Several chemical classes that directly activate cardiac myosin force production in the sarcomere were discovered, and one compound class was optimized extensively using an iterative process. OM, a selective, small-molecule cardiac myosin activator is the most advanced exemplar of this novel mechanistic class and, after extensive preclinical and clinical study, is now being tested in a large Phase 3 cardiovascular outcomes trial in patients with HF-rEF (GALACTIC-HF, www.clinicaltrials.gov identifier, NCT02929329).

Unlike small-molecule inhibitors of motor function, an activator must interact with the motor, cardiac myosin in this case, in a manner that does not stop the motor from cycling. While the manner in which OM affects the ATPase cycle of cardiac myosin has been described, to date, no study has revealed the precise structural mechanism that allows this activator to increase the contractile force generated by the cardiac sarcomere. Considering the complexity of the rearrangements that the myosin motor undergoes through the ATPase cycle, the mode of action of an activator to increase the force generated by the sarcomere is not straightforward.

In cardiac muscle, the myosin motor cycles at a rate that allows it to undergo only one or two crossbridge cycles during the contractile period of a single heartbeat¹⁷. Further, during systole only about 10–30% of the cardiac myosin heads engage the actin filament to produce force¹⁷. It is clear that a cardiac myosin activator must not significantly slow down several steps of the motor cycle (such as hydrolysis, motor attachment to F-actin, and detachment from F-actin), otherwise the ability of the motor to progress through its cycle would likely be impaired. On the other

hand, speeding up the motor sufficiently to allow it to undergo more crossbridge cycles during a single heartbeat is probably not feasible, given that one would need to accelerate the cycle substantially to do so. OM appears to take advantage of another means of increasing contractile force; it increases the number of myosin heads that engage the actin filament during the cardiac contraction.

The cardiac structure with OM bound presented here has elucidated the main principles that allow OM to increase the force generated by the cardiac sarcomere (Fig. 5). Prior to the start of contraction, the myosin head can exist in a number of states, some of which cannot bind to the actin filament. OM stabilizes the PPS state of the motor in which the lever arm is primed and ready to bind to actin filament. Thus, there is a larger population of heads with a primed lever arm ready to bind to the actin filament and contribute to force once calcium binds to the troponin-tropomyosin complex to initiate the contractile cycle. Further, by stabilizing this PPS state, OM slows the non-productive turnover of ATP, meaning the release of ADP and P_i in the absence of a force producing interaction with the actin filament.

The mechanism revealed here for OM based on the visualization of its binding site is in agreement with the current model we have proposed in which P_i is released from a state with the lever arm still primed^{10,11}. This mechanism explains why OM increases the rate of P_i release for myosin when OM is bound. The structural data also suggest that OM is released from the motor when the lever arm swings, since the “PPS” pocket opens as the powerstroke proceeds; consistent with this model is the finding that the binding affinity of OM is highest for the PPS state (0.29 ± 0.04 μM) and more than 20-fold lower for states in which the lever arm is down. The fact that OM would not be associated with the motor at the end of the powerstroke is consistent with the fact that the last step of the powerstroke (namely ADP release) is not affected by OM^{4,8,9}.

Recent time-resolved Förster resonance energy transfer (FRET) studies¹⁸ under high OM concentrations indicate that after fast P_i release, OM slows the next transition, which is associated with the lever arm swing, resulting in an increase of the duty ratio⁹. Our model predicts that OM binding to the “PPS” pocket could indeed slow the transitions that result in opening this site, in particular those that require a lever arm swing. Higher duty ratio also leads to the increase in calcium sensitivity and slow force development in cardiac muscle that have been reported upon experiments with high OM concentrations (10 μM)⁹. However, given that at clinical doses the effective unbound concentration of OM in human plasma^{3,15} (<200 nM) is similar to the K_d for heads with MgADP.VO₄ bound and lower than the binding affinity of OM to any other nucleotide state, the findings at high concentrations of OM may not be relevant to its effect on myocardial contractility. Further, since only a fraction of the myosin

Table 3 Sequence variability for myosin residues found in the OM PPS binding pocket

			N-ter cavity			Relay helix		Transd.	Converter domain			
Residue number #	Gene	Uniprot	143	148	160	170	492	497	666	710	722	770
Hs-βCar-Myo2	MYH7	P12883	GKKR	NAYQYMLTDRE			HMFVLE		H	PNRIILYGDFRQRY		L
Bt-βCar-Myo2	MYH7	Q9BE39							.			.
Hs-αCar-Myo2	MYH6	P13533							.			.
Hs-Sm-Myo2	MYH11	P35749		T..RS..Q..			T.....		T	VFQE.....		.
Gg-Sm-Myo2	MYH11	P10587		T..RS..Q..			T.....		N	VFQE.....		.
Rb-Sk-Myo2	MYH4	Q28641		F.....					S	.S....A..K...		.
Rb-Sk-Myo2	MYH13	Q9GJP9		F.....D					.	.S....A..K...		.
Gg-Sk-Myo2	N116	P13538		F.....					.	.S.V..A..K...		.
Hs-NMM2a	MYH9	P35579		T..RS.MQ..			T..I..		N	...VVFQE.....		.
Hs-NMM2b	MYH10	P35580		S..RC..Q..			T..I..		N	VFQE.....		.
Hs-NMM2c	MYH14	Q7Z406		G..RS..Q..			T.....		N	FQE.....		.
Hs-Myo5a	MYO5A	Q9Y411	.QNM	E..KQ.AR.ER			.V.K..		T	.S.WT.QE.FS..		V
Hs-Myo6	MYO6	Q9UM54	..SL	K.FR.D.KVLKM			RILKE.		G	.S.ASFHELYNM.		F
Hs-Myo10	MYO10	Q9HD67	RRHL	EC.RCLWKRHD			.I.S..		N	AV.RPFQ..YK..		E

Sequence comparison of the residues found in the OM “PPS”-binding site in different myosin family members. The residues directed toward the OM-binding site are highlighted in red and differ in sequence among myosin IIs. Dots (.) indicate identical residues. The Hs, Bt, Gg, and Rb abbreviations stand for human, bovine, chicken and rabbit myosins, respectively. Note that OM does not influence the activity of chicken gizzard smooth muscle myosin, *Myh17*⁴, rabbit psoas muscle fast skeletal myosins, *Myh4* and *Myh13*⁴, and chicken skeletal muscle myosin, *N116*¹².

heads in the sarcomere are bound to OM, the structure of the thick filaments could allow OM-free heads to accelerate the lever arm swing of OM-bound heads, thus minimizing any change to the kinetics of the lever arm swing. Importantly, our structures indicate that OM does not change the conformations that the motor domain explores during the motor cycle but acts by increasing the stability of the states with lever arm primed. The motor mechanism per se is unchanged (see also Supplementary Note 1). Thus, it seems likely that OM modulates force production mainly by increasing the number of heads ready to undergo a powerstroke during systole.

Structural studies of myosin motors with allosteric drugs provide an elegant approach to gain new insights on the powerstroke mechanism itself as well as its specific modulation. While molecular motors are particularly complex machines, the principles that distinguish activators from inhibitors certainly apply to other molecular machines. In the coming years, new modes of action to alter the force produced by these motors may emerge¹⁹. Specific modulators of myosin have great potential to result in new treatments against diseases of human muscle^{3, 19, 20} as is now being tested in patients with heart failure.

Methods

Purification of cardiac myosin. Full-length cardiac myosin was prepared from bovine hearts (Pel-freez Biologicals) via the method of Margossian et al.²¹, drop-frozen in liquid nitrogen, and stored at −80 °C. Subfragment-1 was prepared by limited chymotryptic digestion based upon the method of Weeds and Taylor²². Full-length myosin was precipitated by >10-fold dilution in low-salt buffer (12 mM K-Pipes, 2 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT), pH 6.8), pelleted by centrifugation (5000 × g, 30 min, 4 °C), and the resulting myosin filaments were resuspended in digestion buffer (20 mM K-Pipes, 10 mM K-EDTA, 1 mM DTT, pH 6.8). Myosin was digested in a filamentous form by addition of tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride (TLCK)-treated α-chymotrypsin (Sigma), followed

by incubation at 22 °C for 30 min with occasional mixing. Digestion was terminated by addition of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (1 mM final), and the soluble S1 fraction was separated from insoluble myosin rods by centrifugation (29,000 × g, 30 min, 4 °C). Cardiac S1 was precipitated using ammonium sulfate (60% w/v final) and isolated by centrifugation (29,000 × g, 30 min, 4 °C). The resulting S1 pellet was resuspended and dialyzed against two to three changes of low-salt buffer (12 mM K-Pipes, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH 6.8) before being clarified by centrifugation (142,000 × g, 2.5 h, 4 °C). This intermediate S1 fraction was stabilized by addition of sucrose (10% w/v) before being drop-frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C. For crystallography experiments, this intermediate S1 fraction was further purified by anion-exchange chromatography on Mono-Q (GE Healthcare) in 20 mM Tris, 0.8 mM NaN₃, pH 8.0 (at 4 °C) using a 0–350 mM gradient of NaCl. Target fractions were pooled and buffer-exchanged into crystallization buffer (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM NaN₃, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM ATP, 1 mM TCEP, pH 7.5) by repeated concentration using 15 kDa MWCO Amicon Ultra centrifugal concentrators (EMD Millipore). The final S1 (20–30 mg ml^{−1}) was supplemented with MgADP to a final concentration of 2 mM, aliquoted into cryotubes, and flash-frozen in liquid nitrogen prior to storage at −80 °C for later use.

Isothermal titration calorimetry. Isothermal titration calorimetry experiments were carried out using a Micro-Cal Auto ITC HT microcalorimeter (Microcal Inc., now Malvern, Inc.) at 10 °C. A solution of 300 μM OM in 12 mM PIPES (pH 6.8), 2 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoethanol, and 3% v/v dimethyl sulfoxide (DMSO) (pH 6.8) was titrated into the sample cell, which contained 20 μM bovine cardiac myosin S1 in the same buffer. Nucleotides and nucleotide analogs were included in both titrant and myosin sample at 2 mM. For the nucleotide-free condition, myosin sample contained 17 μg ml^{−1} apyrase (Sigma). The S1 concentration was determined by ultraviolet absorbance (280 nm) in 6 M guanidine-HCl using a calculated extinction coefficient of 95,000 M^{−1} cm^{−1} based on the sequence of bovine cardiac myosin (Uniprot Q9BE39, AA 1–840) and bovine MYL3 (Uniprot P85100). Injections (10 μl) were made every 300 s. To correct for the heats of dilution and slight buffer mismatches between the titrant and sample, the average heat signal from the last three injections at the end of the experiment (when binding was saturated) was subtracted from all values. Data collection and analysis was performed using the modified Origin software included with the instrument, using a single binding site model.

Crystallization and structure determination. The APO-MD-PPS crystals were obtained using the hanging drop vapor diffusion method at 290 K by mixing purified bovine Cardiac Myosin S1 fragment at 20 mg ml⁻¹ (170 µM) pre-incubated with 2 mM MgADP for 30 min on ice. Drops were set up by mixing 1 µl of the protein and 1 µl of the reservoir solution containing 13% PEG 3350 (w/v), 5% Tacsimate pH 6.0, 5 mM TCEP, 10% Glycerol, and 3.3% DMSO. The crystals appeared after 21 days using the micro-seeding technique. Note that the crystals are hard to reproduce as they require spontaneous/in situ proteolysis to grow (likely by the α-chymotrypsin used in the purification step) to produce a MD fragment (cleavage of the heavy chain after the converter). Crystals were cryo-cooled in liquid nitrogen in a final solution containing 15% (w/v) PEG 3350, 5% Tacsimate pH 6.0, 5 mM TCEP, 25% Glycerol, and 3.3% DMSO. X-ray data sets were collected at 100 K at the Proxima 2 A (λ = 0.9762 Å, SOLEIL synchrotron, France).

The OM-S1-PPS crystals were obtained using the same technique. The same protein was incubated at 5 mg ml⁻¹ (43 µM) with 2 mM MgADP for 30 min, 5 mM OM for 1 h, and 2 mM vanadate for 30 min at 298 K. Crystals were obtained in 24% (w/v) PEG 3350, 5% Tacsimate pH 6.0, 5 mM TCEP, 20% Glycerol, and 10% DMSO at 298 K. The optimized crystals appeared overnight using micro-seeding approaches (note that in this case, the whole S1 (without proteolysis) crystallizes). Crystals were flash-frozen in the crystallization condition. X-ray data sets were collected at 100 K at the ID23-2 beamline (λ = 0.8729 Å, ESRF synchrotron, France).

The diffraction data sets were indexed and scaled with XDS²³. Molecular replacement solution was obtained with Molrep^{24,25}, using the *Argopecten*-striated muscle myosin II PPS structure (1QV1¹³) as a search model. The region of the converter and the lever arm were excluded from the search model. These regions were subsequently built in electron density using buccaneer²⁶. Model building and refinement were carried out with Coot²⁷ and BUSTER²⁸, respectively. The statistics for favored, allowed and outlier Ramachandran angles are 99.24, 99.67, and 0.33% for the OM-S1-PPS structure, and 82.12, 96.28, and 3.72% for the APO-MD-PPS structure, respectively. Before deposition to the PDB, the structure were submitted to the PDB-REDO server²⁹. The coordinate and geometry constraints files for the ligand were created with Coot and phenix.elbow³⁰. Note that the bovine and human MYH7 motor domains share 95.9% identity and 98.2% similarity. Out of 830 residues included in the motor domain, the main differences in sequence are found for 13 solvent-exposed residues. On the basis of this, no difference is to be expected in the structure of human and bovine cardiac myosins and this is supported by the similarity of their kinetic properties as previously reported (Deacon et al.³¹—see Table 1; Liu et al.⁸—see Table 2) in which human and bovine myosins were directly compared. Figures and movies were made using PyMol³².

SAXS experiments. SAXS data were collected on the SWING beamline (synchrotron SOLEIL, France). Purified bovine Cardiac Myosin S1 was extensively dialyzed against 10 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM Na₂S₂O₃, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM ADP, 1 mM TCEP (without any ATP) in order to remove all the P_i present in the solution. The protein was then subsequently incubated with either 5 mM OM or 10% DMSO for 1 h on ice, and then with 2 mM vanadate when necessary. All samples were centrifuged at 20,000 × g for 10 min at 4 °C prior to the analysis. 40 µl of the protein at 2 and 5 mg ml⁻¹ (17 and 43 µM, respectively) were injected between two air bubbles using the auto-sampler robot. Thirty-five frames of 1.5 s exposure were averaged and buffer scattering was subtracted from the sample data. As both 2 and 5 mg ml⁻¹ curves displayed no traces of aggregation, only the 5 mg ml⁻¹ curve was used for further analysis because of the higher signal/noise ratio. As the APO-PPS-MD structure lacks the converter and the light chain, a chimeric model was built using the motor domain from the APO-PPS-MD structure, and building the lever arm helix and the light chain from the OM-S1-PPS structure using the converter position as a reference to position the lever arm. The theoretical SAXS curves were calculated with CRYSOLOG³³ and compared based on the quality of their fits against the different experimental curves.

Data availability. The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org, with accession numbers 5N69 (OM-S1-PPS) and 5N6A (APO-MD-PPS). The SAXS data with OM has been deposited in the Small Angle Scattering Biological Data Bank (SASBDB), www.sasbdb.org, with accession numbers SAS299 (MgADP.VO₄+OM) and SAS300 (MgADP+OM).

Received: 21 February 2017 Accepted: 7 June 2017

Published online: 04 August 2017

References

- Bui, A. L., Horwath, T. B. & Fonarow, G. C. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**, 30–41 (2012).
- Loehr, L. R., Rosamond, W. D., Chang, P. P., Folsom, A. R. & Chambless, L. E. Heart failure incidence and survival (from the Atherosclerosis risk in communities study). *Am. J. Cardiol.* **101**, 1016–1022 (2008).
- Teerlink, J. R. et al. Chronic oral study of myosin activation to increase contractility in heart failure (COSMIC-HF): a phase 2, pharmacokinetic, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **388**, 2895–2903 (2016).
- Malik, F. I. et al. Cardiac myosin activation: a potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science* **331**, 1439–1443 (2011).
- Shen, Y.-T. et al. Improvement of cardiac function by a cardiac myosin activator in conscious dogs with systolic heart failure. *Circ. Heart Fail.* **3**, 522–527 (2010).
- Teerlink, J. R. et al. Dose-dependent augmentation of cardiac systolic function with the selective cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil: a first-in-man study. *Lancet* **378**, 667–675 (2011).
- Cleland, J. G. F. et al. The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *Lancet* **378**, 676–683 (2011).
- Liu, Y., White, H. D., Belknap, B., Winkelmann, D. A. & Forgacs, E. Omecamtiv mecarbil modulates the kinetic and motile properties of porcine β-cardiac myosin. *Biochemistry* **54**, 1963–1975 (2015).
- Swenson, A. M. et al. Omecamtiv mecarbil enhances the duty ratio of human beta cardiac myosin resulting in increased calcium sensitivity and slowed force development in cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* **292**, 3768–3778 (2017).
- Houdusse, A. & Sweeney, H. L. How myosin generates force on actin filaments. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 989–997 (2016).
- Llinas, P. et al. How actin initiates the motor activity of myosin. *Dev. Cell* **33**, 401–412 (2015).
- Winkelmann, D. A., Forgacs, E., Miller, M. T. & Stock, A. M. Structural basis for drug-induced allosteric changes to human β-cardiac myosin motor activity. *Nat. Commun.* **6**, 7974 (2015).
- Gourinath, S. et al. Crystal structure of scallop myosin S1 in the pre-power stroke state to 2.6 Å resolution: flexibility and function in the head. *Structure* **11**, 1621–1627 (2003).
- Dominguez, R., Freydon, Y., Trybus, K. M. & Cohen, C. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell* **94**, 559–571 (1998).
- Morgan, B. P. et al. Discovery of omecamtiv mecarbil the first, selective, small molecule activator of cardiac myosin. *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 472–477 (2010).
- Pylypenko, O. et al. Myosin VI deafness mutation prevents the initiation of processive runs on actin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 1201–1209 (2015).
- Spudich, J. A. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy: four decades of basic research on muscle lead to potential therapeutic approaches to these devastating genetic diseases. *Biophys. J.* **106**, 1236–1249 (2014).
- Rohde, J. A., Thomas, D. D. & Muretta, J. M. A heart failure drug changes the mechano-enzymology of the cardiac myosin powerstroke. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E1796–E1804 (2017).
- Sirigu, S. et al. Highly selective inhibition of myosin motors provides the basis of potential therapeutic application. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, E7448–E7455 (2016).
- Green, E. M. et al. A small-molecule inhibitor of sarcomere contractility suppresses hypertrophic cardiomyopathy in mice. *Science* **351**, 617–621 (2016).
- Margossian, S. S. & Lowey, S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **85**, 55–71 (1982).
- Weeds, A. G. & Taylor, R. S. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature* **257**, 54–56 (1975).
- Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
- Collaborative Computational Project, N. Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**, 760–763 (1994).
- Vagin, A. & Teplov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025 (1997).
- Cowan, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 1002–1011 (2006).
- Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
- Bricogne, G. et al. BUSTER version 2.10.2 (Cambridge, United Kingdom Global Phasing Ltd., 2016) <https://www.globalphasing.com/buster/wiki/index.cgi?BusterCite>.
- Joosten, R. P., Long, F., Murshudov, G. N. & Perrakis, A. The PDB-REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCr* **1**, 213–220 (2014).
- Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W. & Adams, P. D. Electronic ligand builder and optimization workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **65**, 1074–1080 (2009).

31. Deacon, J. C., Bloemink, M. J., Rezavandi, H., Geeves, M. a. & Leinwand, L. a. Identification of functional differences between recombinant human α and β cardiac myosin motors. *Cell Mol. Life Sci.* **69**, 2261–2277 (2012).
32. The PyMOL Molecular Graphics System. *Schrödinger LLC* <http://www.pymol.org> (2002).
33. Svergun, D., Barberato, C. & Koch, M. H. CRYSOLO—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768–773 (1995).
34. Münnich, S., Pathan-Chhatbar, S. & Manstein, D. J. Crystal structure of the rigor-like human non-muscle myosin-2 motor domain. *FEBS Lett.* **588**, 4754–4760 (2014).

Acknowledgements

We thank beamline scientists of PX2A (SOLEIL synchrotron) for excellent support during data collection. V.J.P.-H. is the recipient of a fourth year PhD fellowship from Ligue contre le cancer. J.R.-P. is the recipient of an Association Française contre les Myopathies (AFM) fellowship 18423. A.H. was supported by grants from CNRS, FRM DBI20141231319, ANR 13-BSV8-0019-01, AFM 17235, and Ligue Contre le Cancer RS16. The A.H. team is part of the Labex CeTisPhyBio:11-LBX-0038, which is part of the IDEX PSL (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL).

Author contributions

A.H. designed research; V.J.P.-H. crystallized, solved the crystal structures, and performed SAXS studies; J.J.H. performed in vitro functional assays; all authors discussed and analyzed the data; A.H. and F.I.M. wrote the manuscript with the help of the other authors.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at doi:10.1038/s41467-017-00176-5.

Competing interests: J.J.H. and F.I.M. are current employees and shareholders of Cytokinetics Inc. The remaining authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

File name: Supplementary Information

Description: Supplementary figures, supplementary tables, supplementary note and supplementary references.

File name: Supplementary Movie 1

Description: Comparison between the PR and PPS OM binding sites. Superimposition of the cardiac PR and PPS structures containing OM. The 'PR' allosteric binding pocket (orange) is quite distant from the 'PPS' binding site (bright pink) for OM. Both structures are compared using the N-ter subdomain (dark grey) as a reference.

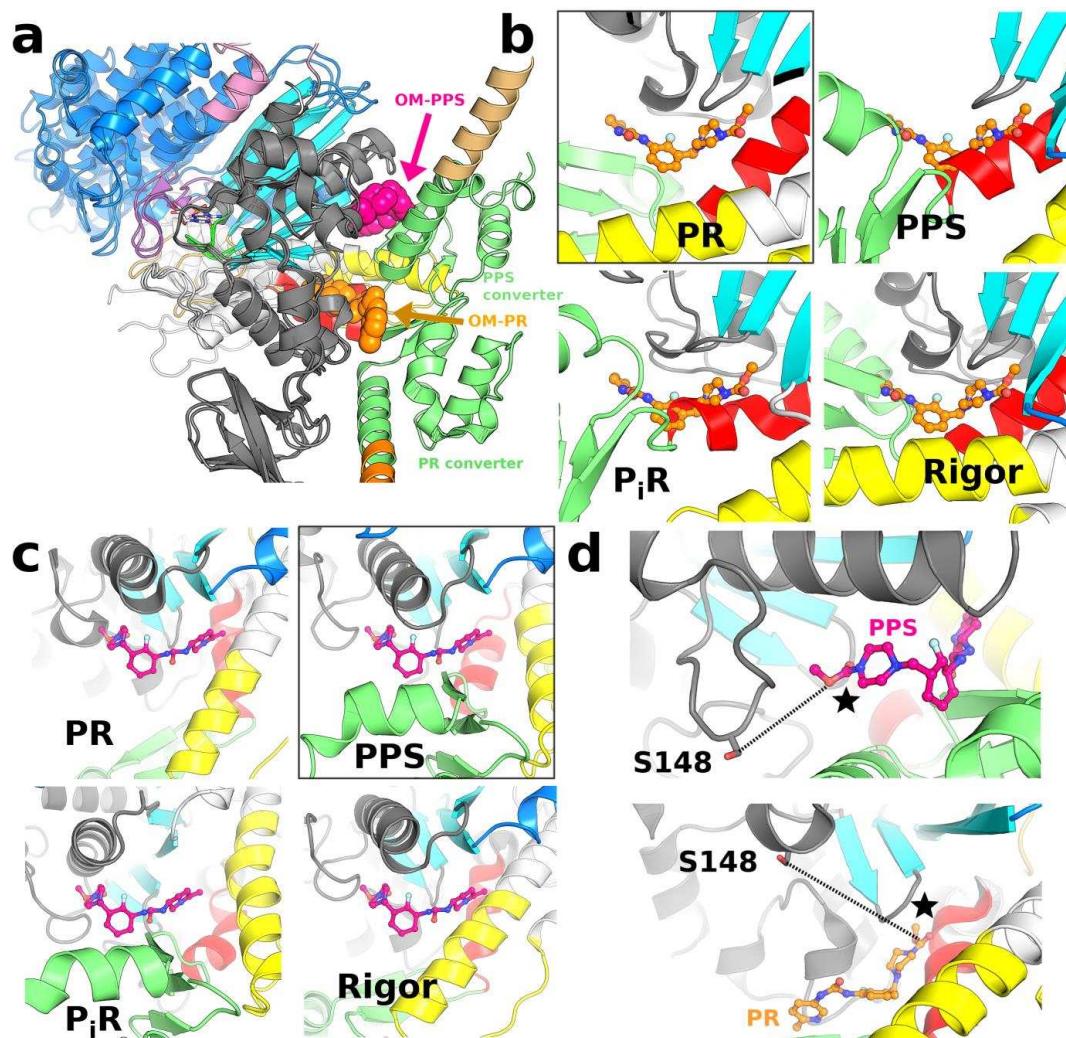
File name: Peer review file

Description:

Supplementary Note 1

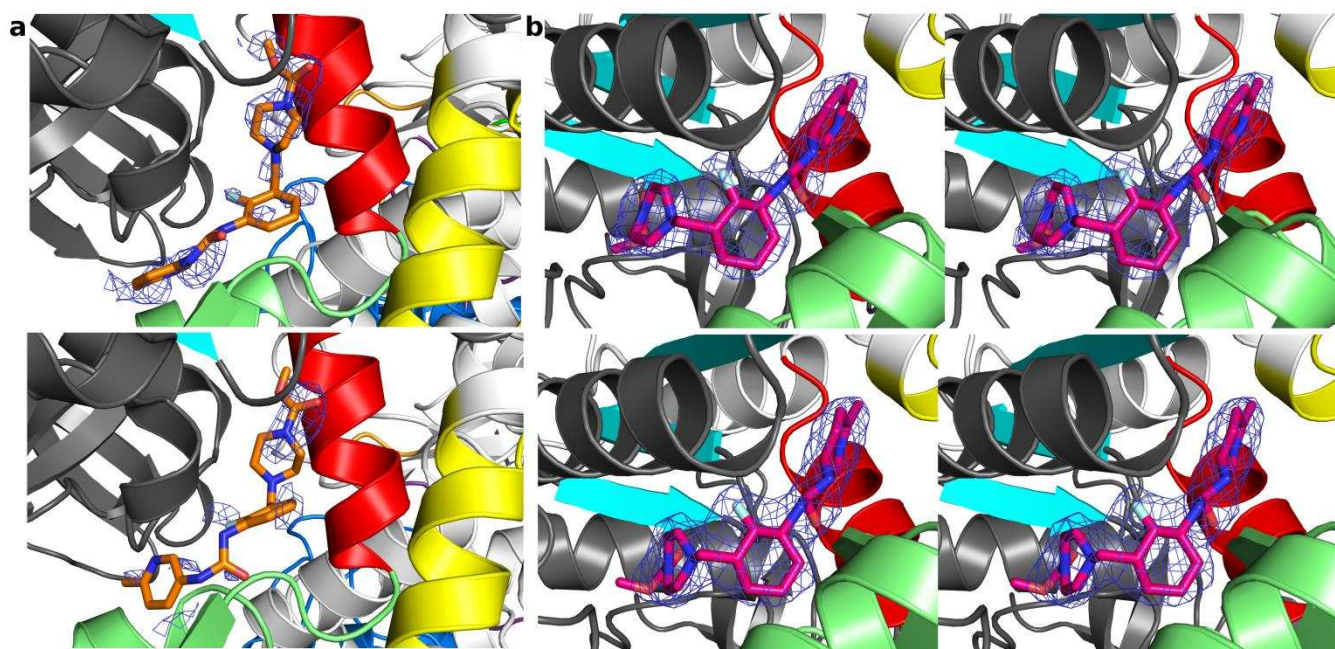
The loops and linkers of the transducer are compliant and can be influenced by crystal packing

The transducer corresponds to structural elements at the center of the motor domain, in particular the central beta-sheet, that undergo important conformational changes along the transitions that produce force¹⁻⁴ (Fig. 1b). It has been proposed by Winkelmann et al⁵ that OM binding could allosterically influence the transducer conformation and thus modulate force production. However, our analysis of this region in different cardiac crystal structures shows that this hypothesis is unlikely. Indeed, there is no conformational difference in the residues that connect the drug binding site (either the 'PR' or the 'PPS' sites) and this transducer region. In fact the twist of the central beta-sheet itself is unchanged whether OM is bound or not in the PR state (Supplementary Fig. 5a). Only distal rearrangements are observed in transducer loops and linkers when PR cardiac structures are compared⁵ but they occur independently of drug binding and reflect rather local influence on the conformation of these regions which are involved in contacts with other molecules in the crystal. The study of the inter-molecular interactions of the transducer residues show that the differences observed among the two molecules of the asymmetric unit in the PR state (4PA0) are well accounted for by the contacts these residues make in the crystal packing (Supplementary Fig. 5b). They are not linked to differences in the occupancy of the drug binding site. This is corroborated by the fact that the transducer in molecule B (4PA0)⁵ in which OM is bound adopts a similar conformation than those found for the apo structure (4P7H)⁵. Moreover, in the states myosin populates at the beginning of the powerstroke, the OM-S1-PPS and *Argopecten* striated muscle (scallop) myosin II PPS (1QVI⁶) structures indicate that the transducer is not much affected by drug binding. In addition to these structural arguments, a recent CryoEM structure⁴ revealed that the ADP release step corresponds to major changes in the transducer. However, ADP release is unaffected by OM which does not support a direct influence of OM binding on the transducer conformation. Moreover, the P_i release transition occurs without much change in the transducer⁷ while OM clearly accelerates the rate of this step. These results indicate that OM is not likely to modulate force production via a direct control on the transducer structural rearrangements during force generation.

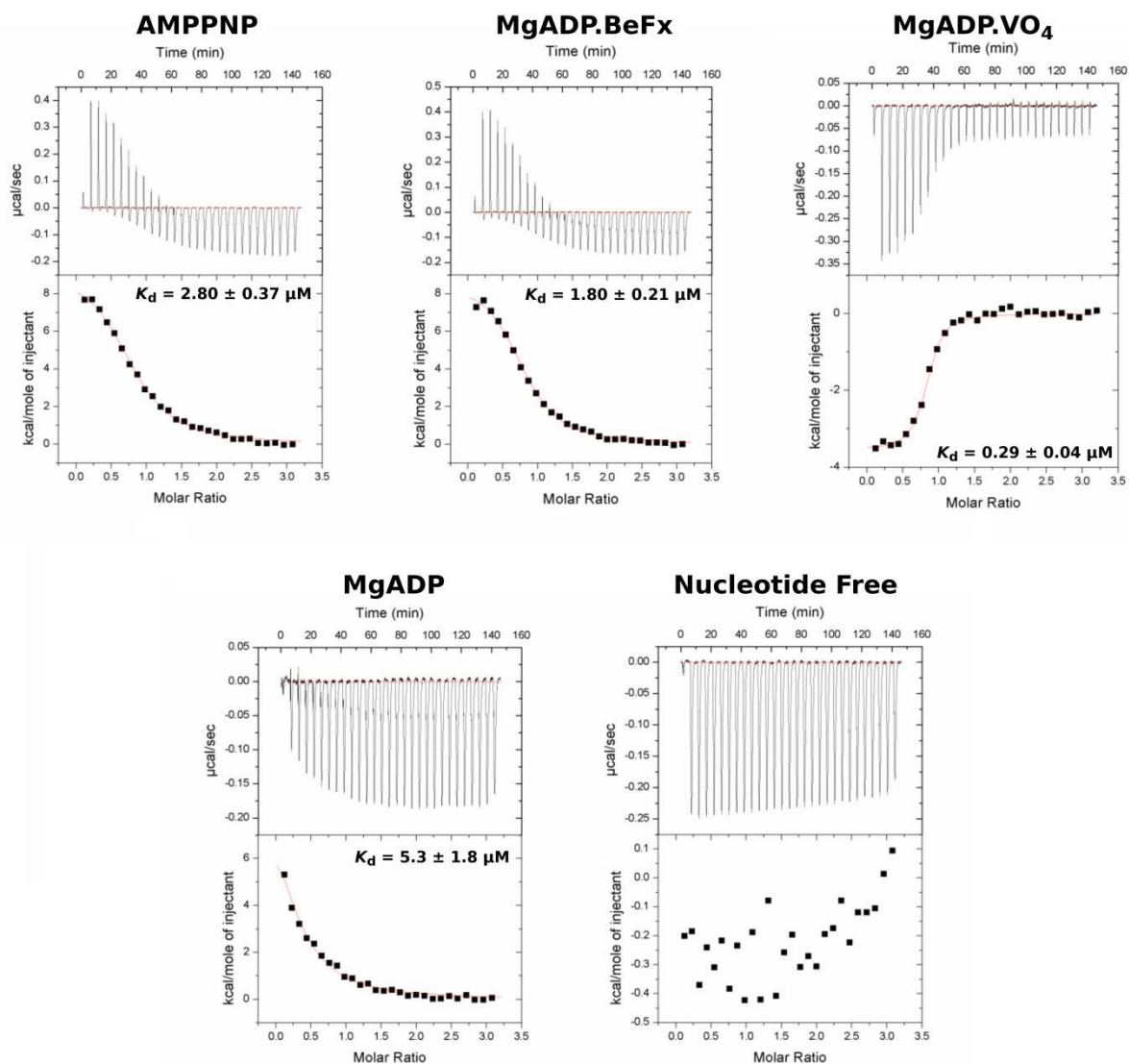


Supplementary Figure 1 – Comparison of the OM binding pockets

(a) The 'PR' allosteric binding pocket for OM (orange) and the 'PPS' binding site for OM (bright pink) are quite distant from one another. Superimposition of the cardiac PR (4PA0) and PPS structures using the N-terminal subdomain as a reference (dark grey). See also Supplementary movie 1. (b) Detail of the 'PR' binding pocket. OM is found near the SH1 helix (red) and the converter (green). The structural elements surrounding the 'PR' OM binding pocket as found in the OM-MD-PR structure (4PA0)⁵ (black contour) are shown for four states of the myosin motor: **PPS** (pre-powerstroke, **OM-S1-PPS** structure), **P_iR** (myosin VI P_i release, 4PFO⁷) and **Rigor** (myosin IIb, 4PD3⁸). Note that the 'PR' OM pocket is closed in all states except in the PR state. All the structures were aligned using the N-terminal subdomain as a reference. (c) Detail of the 'PPS' pocket as found in the OM-S1-PPS structure (black contour) and using the same structures as in (b). In this case, the 'PPS' allosteric site is formed in the PPS and the P_iR states for which the converter (green) is in position to make specific contacts with OM. In the Rigor and PR states, the relay and converter are found in an unprimed position and cannot participate in closing the OM 'PPS' pocket, in agreement with the fact that OM cannot bind strongly in these states. (d) The benzophenone derivative of OM shown to react with Ser148⁹ has the reactive group attached on the carboxymethyl-piperazine moiety of OM (black star). Interestingly, this group is found near Ser148 in the PPS state (8.4 Å) but it is too far (16 Å) from Ser148 in the 'PR' allosteric pocket to account for the observed reactivity. The dotted lines represent the distance between the serine and the part of the OM molecule to which the benzophenone is attached.

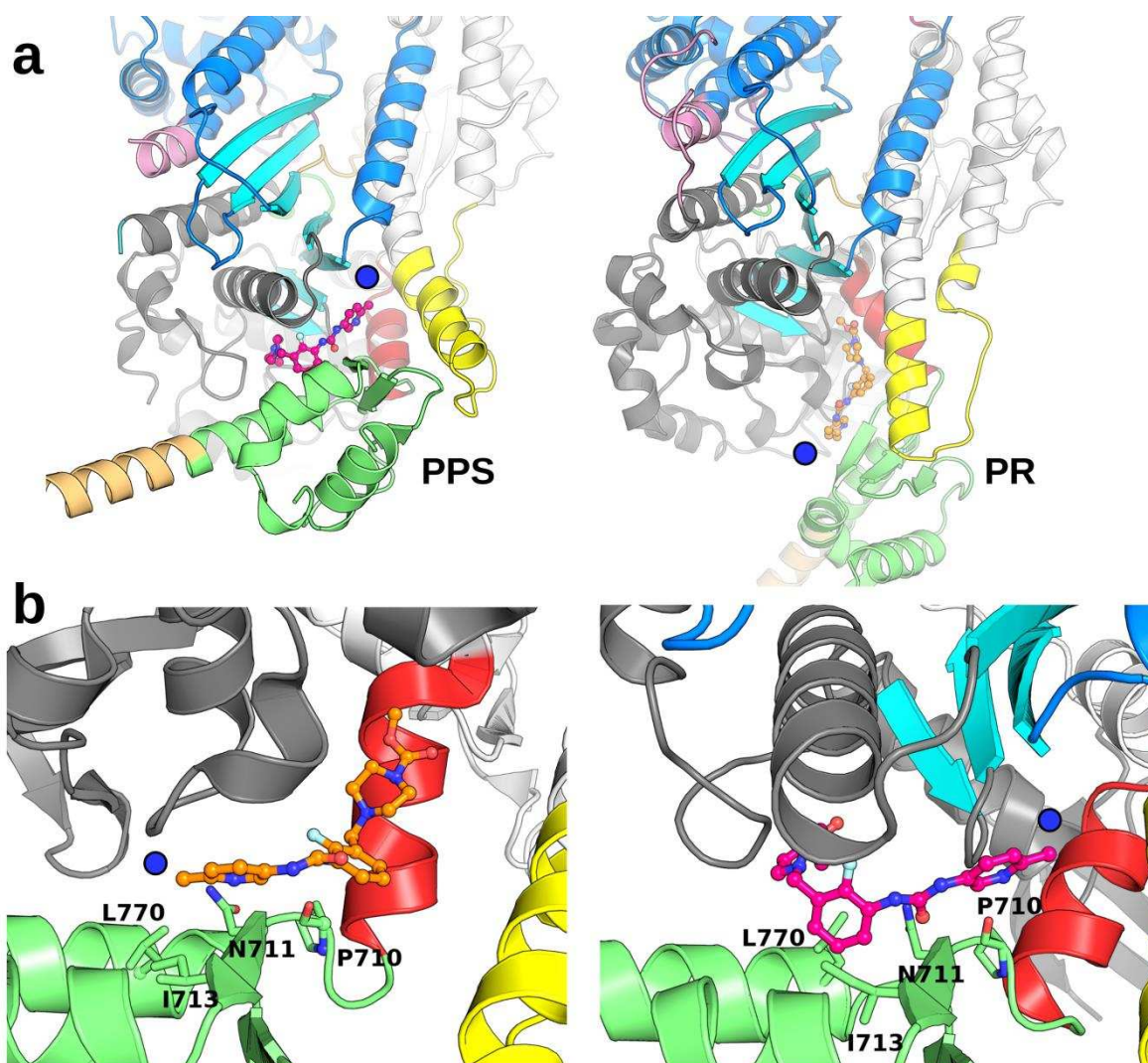


Supplementary Figure 2 - Composite 2mFo-DFc omit maps at 1 σ showing the quality of the OM densities. (a) OM density near the OM 'PR' binding site calculated from the 4PA0 structure which contains two molecules per asymmetric unit (upper panel, molecule A; lower panel, molecule B). The electron density for OM bound to the cardiac myosin motor domain in the PR state is fragmented likely due to the partial occupation of the site. (b) Stereo-image of the OM density bound to the motor domain in the PPS state from the OM-S1-PPS structure that contains two molecules per asymmetric unit (upper panel, molecule A; lower panel, molecule B). In order to minimize the phase bias, the composite omit maps were calculated with the annealing method, using the same parameters in both cases.



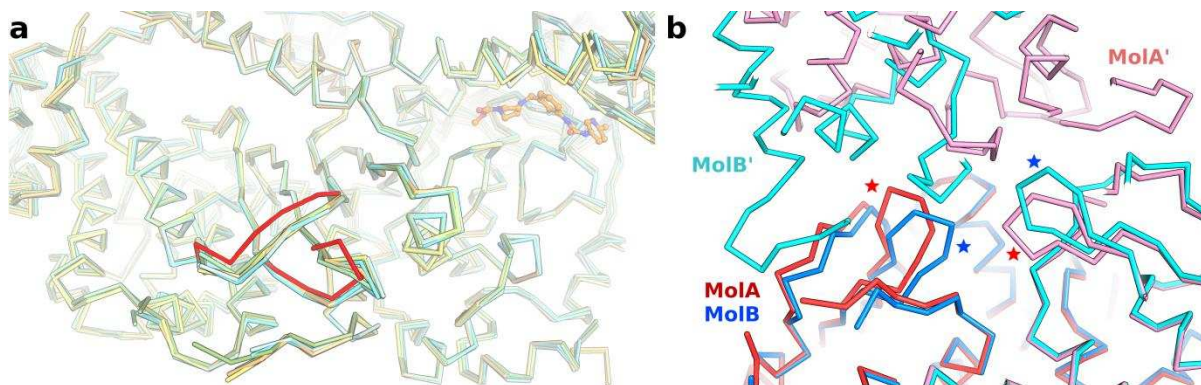
Supplementary Figure 3: ITC binding experiments.

The raw data for ITC experiments presented in Table 2 is shown here. The affinity for OM binding to cardiac myosin is evaluated depending on the nucleotide-bound to the motor domain.



Supplementary Figure 4 – Orientation of the OM molecule in the 'PR' and the 'PPS' binding sites.

(a) In the PPS state (left), the converter (green) traps and stabilizes OM binding. In the PR state (right), the drug binds in a different pocket and makes limited contacts with the converter. Note in addition that the OM molecules have an opposite polarity when bound in these two sites (the blue dot highlights the position of the methyl-pyridinyl ring group of the OM molecule). **(b)** Only four common residues are found interacting with OM in both structures. Detailed analysis of the pocket reveals that these common residues (P710, N711, I713 and L770) belong to the converter and interact with different parts of the OM molecule in these two structures: **(1)** the carbonyl oxygen of Pro710 interacts with the carbamoyl-amino linker in the PR, and with the methyl-pyridinyl ring in PPS; **(2)** Asn711 interacts with the methyl-pyridinyl N1 in PR, while in PPS it makes an hydrogen bond with O1 in the carbamoyl central linker; **(3)** Ile714 and **(4)** Leu770 both interact with the methyl-pyridinyl ring in the PR structure, while they interact with the carboxymethyl-piperazine and the fluoro-benzyl ring in PPS, respectively.



Supplementary Figure 5 – OM does not allosterically influence the transducer conformation

(a) 4PA0 (PR-OM), 4P7H (PR-APO without nucleotide) and 4DB1 (PR-APO with Mn-AMPPNP) molecules are superimposed using the N-terminal and the U50 subdomains as a reference. There are no differences in all the molecules from the OM pocket until the transducer loops (shown in red for 4PA0 molA), indicating that drug binding doesn't influence the conformation of these distal loops.

(b) In 4PA0, both molecules (molA and molB) have different environments surrounding the transducer loops (red and blue stars) linked to the crystal packing. These differences account for the loop conformations observed in the crystal. MolA' and MolB' are the crystal mates of MolA and MolB, respectively. It is clear that MolB' is not compatible with the conformations of the loop found in MolA. This study of the packing thus supports the statement that these loops are easily influenced by inter-molecular interactions that occur in the crystal.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1 – Comparison of the reported Omecamtiv Mecarbil binding sites

	‘PR’ binding site (4PA0)	‘PPS’ binding site (5N69)
Global contact area	422-444 Å ² (MoIb and MoIa)	470-483 Å ² (MoIb and MoIa)
Drug conformation	elongated with two small bends variable in the two molecules 4PA0	sharp 90° bend both molecules
Properties of the pocket	surface pocket of the PR structure hydrophobic + 2 H-bonds Drug is buried in a hydrophobic site	formed and stabilized by induced fit, which primes the lever arm position hydrophobic + 5 H-bond Drug is buried in a hydrophobic cavity
Residues involved in binding	N-ter (A91, M92, L96, S118, G119, F121) SH1 helix (V698, I702, C705) converter (P710, N711, R712, L770)	N-ter (K146, R147, N160, Q163, Y164, T167, D168) relay helix (H492) converter (P710, N711, R712, I713, R721, L770, Y722, E774)
Specificity of the pocket	not specific – 3 homologous changes	highly specific – not conserved among Myo2s
Electron density map	missing density for some drug atoms possibly lower occupation of the drug	very good density for all drug atoms Full occupation
LLDF^(*)	10.75 (MoIa), 7.52 (MoIb)	-0.54 (MoIa), -0.66 (MoIb)
Photo-crosslinking results	Drug too far away and not in the correct orientation to allow crosslinking with Ser148	Drug position and orientation is coherent with reactivity with Ser148
Influence on the myosin structure	binds without much change OM has little influence upon binding	binding induces priming of the lever arm upon cleft closure. Not much influence for the motor domain conformation

(*) The Local Ligand Density Fit value (LLDF) represents the quality of the electron density of the ligand with respect to its neighboring residues. A bigger LLDF value represents a worse ligand electron density. It is calculated by comparing the Real-Space R value (RSR) of the ligand to mean and standard deviation of the RSR of neighboring residues within 5 Å. RSR is calculated as following^{10,11} (ρ_{calc} and ρ_{obs} refer model and experimental electron density respectively):

$$RSR = \frac{\sum |\rho_{obs} - \rho_{calc}|}{\sum |\rho_{obs} + \rho_{calc}|}$$

Supplementary Table 2 - Sequence conservation in the OM 'PR' binding pocket

Residue number #	Gene	Uniprot	N-ter cavity				Relay helix		SH1		Converter	
			91	96	118	121	493	497	698	707	708	713
Hs-βCar-Myo2	MYH7	P12883	AMLTFL		SGLF		MFVLE		VLEGIRICRK		GFPNRI	
Bt-βCar-Myo2	MYH7	Q9BE39										
Hs-αCar-Myo2	MYH6	P13533										
Hs-Sm-Myo2	MYH11	P35749	.E..C.				..I..		Q			
Gg-Sm-Myo2	MYH11	P10587	.E..C.				..I..		Q			
Rb-Sk-Myo2	MYH4	Q28641	..M.H.								...S..	
Rb-Sk-Myo2	MYH13	Q9GJP9	..M.H.								...S..	
Gg-Sk-Myo2	N116	P13538	..M.H.								...S.V	
Hs-NMM2a	MYH9	P35579	.E..C.				..I..		Q		V	
Hs-NMM2b	MYH10	P35580	.E..C.				..I..		Q			
Hs-NMM2c	MYH14	Q7Z406	.E..C.						Q			
Hs-Myo5a	MYO5A	Q9Y4I1	TA.SY.		C.IV		V.K..		...T...SAA		...S.W	
Hs-Myo6	MYO6	Q9UM54	CS.MY.		VANI		ILKE.		MVSVLDLMQG		.Y.S.A	
Hs-Myo10	MYO10	Q9HD67	AS...E.		I.SI		IFS..		M..TV..RKA		.YAV.R	

Sequence comparison of related myosin II family members and some unconventional myosins. The residues directly involved in OM binding in the PR pocket⁵ are highlighted in red. Dots (.) represent identical residues. The Hs, Bt, Gg and Rb abbreviations stand for human, bovine, chicken and rabbit myosins, respectively.

Supplementary References

1. Coureux, P.-D. *et al.* A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature* **425**, 419–23 (2003).
2. Coureux, P.-D., Sweeney, H. L. & Houdusse, A. Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J.* **23**, 4527–4537 (2004).
3. Sweeney, H. L. & Houdusse, A. Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 539–57 (2010).
4. Wulf, S. F. *et al.* Force-producing ADP state of myosin bound to actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1844–E1852 (2016).
5. Winkelmann, D. A., Forgacs, E., Miller, M. T. & Stock, A. M. Structural basis for drug-induced allosteric changes to human β -cardiac myosin motor activity. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
6. Gourinath, S. *et al.* Crystal Structure of Scallop Myosin S1 in the Pre-Power Stroke State to 2.6 Å Resolution: Flexibility and Function in the Head. *Structure* **11**, 1621–1627 (2003).
7. Llinas, P. *et al.* How Actin Initiates the Motor Activity of Myosin. *Dev. Cell* **33**, 401–412 (2015).
8. Münnich, S., Pathan-Chhatbar, S. & Manstein, D. J. Crystal structure of the rigor-like human non-muscle myosin-2 motor domain. *FEBS Lett.* **588**, 4754–4760 (2014).
9. Malik, F. I. *et al.* Cardiac Myosin Activation: A Potential Therapeutic Approach for Systolic Heart Failure. *Science* **331**, 1439–1443 (2011).
10. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard. Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta. Crystallogr. A.* **47**, 110–119 (1991).
11. Brändén, C.-I. & Jones, T. A. Between objectivity and subjectivity. *Nature* **343**, 687–689 (1990).