Unité de RMN des Biomolécules
Institut Pasteur
28, rue du Docteur Roux
75724 PARIS Cedex 15

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Biophysique moléculaire
Ecole doctorale ED515 Complexité du vivant

Présentée par

M. Pierre MAISONNEUVE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE – Paris VI

Sujet de la thèse :

Etude structurale et fonctionnelle de la phosphatase humaine PTPN4

soutenue le 20 Mai 2014

devant le jury composé de :

Dr. Nicolas WOLFF	Directeur de thèse
Pr Michel L. TREMBLAY	Rapporteur
Dr Françoise OCHSENBEIN	Rapporteur
Dr Malcolm BUCKLE	Examinateur
Pr Olivier LEQUIN	Examinateur
Dr Daniel LADANT	Examinateur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs, Michel L. Tremblay et Françoise Ochsenbein ainsi que les examinateurs Malcolm Buckle, Olivier Lequin et Daniel Ladant d'avoir bien voulu prendre le temps de juger mon travail.

Je remercie également Muriel Delepierre de m'avoir accueilli au sein de son unité et de m'avoir apporté son soutien lors de ces quelques années. Tu as su instaurer au sein de ton laboratoire une ambiance composée de respect et d'entraide qui permet de travailler dans les meilleures conditions.

Je tiens à témoigner de ma plus profonde reconnaissance et gratitude envers Nicolas Wolff qui fut mon mentor ces dernières années. Merci pour m'avoir accordé ta confiance alors que j'étais en master puis lorsque, quelques années plus tard, je suis venu chercher des conseils et que tu m'as permis d'entamer cette très belle aventure à tes côtés. Au-delà de tes capacités et de ton habileté d'encadrant remarquables, je tiens à féliciter l'homme que tu es par ta bonté et ta générosité.

Merci à Elouan de m'avoir supporté (dans tout les sens du terme !) dans la première partie de ma thèse. Ton courage et ton audace restent pour moi un exemple et me permettent de me rappeler que le plus important reste encore nos ambitions et les moyens qu'on se donne pour les atteindre. Bravo à toi et encore désolé pour le montant de la porte…

Un grand merci à Célia pour son soutien, son énergie et sa détermination lors de la deuxième partie de ma thèse. Ce fut important de savoir que je pouvais toujours compter sur ta disponibilité. De même, merci à Florent (Touffic, pour les intimes) pour sa gentillesse et sa disponibilité à tout moment. Je te souhaite une bonne continuation et de profiter au maximum des belles années de thèse à venir. Aussi, merci à Florence pour m'avoir initié à la RMN et pour la patience dont tu as fait preuve pour répondre à mes nombreuses questions.

Merci à Nicolas Babault pour ses conseils qui m'ont permis de commencer ma thèse dans les meilleures conditions.

L'ensemble des membres, présents ou passés, du laboratoire de RMN ont toujours été disponibles et à l'écoute. Vous participez tous à l'ambiance conviviale et chaleureuse de ce laboratoire. Pour cela Nadia, Inaki, Anne, Ada, Catherine, Alain, Gisèle, François, Idir, Bruno, Ariane, Régine, Halina je vous remercie.

À Noémie et Mathieu, les deux stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer, merci pour votre indulgence et votre sérieux. Vous m'avez beaucoup apporté et j'espère avoir de vos nouvelles régulièrement.

À tous mes collaborateurs Marie-Christine, Henri, Monique, Bertrand, Patrick W, Ahmed, Patrick E, Sylviane, Bruno, Jacques, Pascale, Bernard, Sophie qui ont tous participé à ma culture scientifique, vous avez ma reconnaissance pour votre bienveillance à mon égard.

À toutes les rencontres heureuses qui m'ont conduit jusqu'à aujourd'hui, je tiens à vous consacrer ces quelques lignes. Aux étudiants de l'association IDoc, de la Stapa, aux membres du Conseil d'administration de feu l'école doctorale IViv, ainsi qu'à ceux du département de biologie structurale et de chimie.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mon admiration envers Germain Trugnan pour l'humanisme dont il fait preuve.

À mes professeurs de licence pour m'avoir donné goût à la biochimie.

À Amandine, qu'elle est loin cette soirée où nous nous imaginions stagiaires à Pasteur ! Un grand merci pour toutes ces pauses café et pour ta bonne humeur (et ta bonne foi !). J'espère que nos chemins ne cesseront de se croiser.

À Fanny qui partage ma vie, à qui appartient une partie du mérite de cette thèse pour m'avoir supporté et m'avoir apporté un soutien indéfectible au cours de ces années. Un grand merci pour sa compréhension des sacrifices que demande une thèse. Et ma plus

profonde admiration pour sa résistance et sa patience face à mon humour (beaucoup lui reconnaitront ce mérite !).

À mon frère ma plus profonde gratitude pour sa présence, son amour et son soutien. Il reste et restera mon phare et mon gouvernail grâce à qui je continue de garder le cap.

Mille mercis à mes parents sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Leur soutien sans faille et leur amour sont les fondations de mon équilibre mental et physique. Vous êtes les maîtres d'œuvre de ma joie de vivre et cela n'a pas de prix. Je ne vous remercierai jamais assez.

À tout mes proches d'Angoulême, de la Rochelle et d'ailleurs... Pas de noms pas de jaloux, et vous citer tous serait bien trop long. Chacun d'entre vous se reconnaîtra. Votre amitié et l'une des plus belles choses que je possède. C'est toujours un plaisir et une joie immenses de vider quelques godets en votre compagnie.

À vous tous, un grand merci. Que ces quelques lignes me paraissent bien légères en comparaison de ce que j'ai dans mon cœur.

À la mémoire de Tony Soranzo.

Etude structurale et fonctionnelle de la phosphatase humaine PTPN4

RÉSUMÉ

La fonction des protéines de signalisation est déterminée par la nature des domaines qui les composent. Une meilleure compréhension des voies de signalisation passe par l'étude de ces domaines et de leur régulation.

PTPN4 est une tyrosine phosphatase qui joue un rôle anti-apoptotique. Lors de l'infection par une souche atténuée du virus de la rage, sa fonction est perturbée, conduisant à la mort des cellules. Cette perturbation est due à l'interaction du motif de reconnaissance au domaine PDZ (PBM) de la glycoprotéine virale avec le domaine PDZ de PTPN4.

Nous avons montré que ce domaine PDZ a un rôle d'inhibiteur allostérique de l'activité catalytique de la phosphatase de PTPN4. Ceci représente la première description de la régulation d'une phosphatase par un domaine PDZ. Cette inhibition est levée lors de la fixation d'un ligand au domaine PDZ, tel que le PBM de la glycoprotéine virale. Notre étude structurale révèle que la fixation d'un PBM perturbe les interactions transitoires entre les deux domaines et rétablit ainsi les propriétés catalytiques de la phosphatase.

Nous avons par ailleurs identifié un ligand endogène de PTPN4, la MAP Kinase p38γ qui, à travers son interaction avec PTPN4, participerait à la régulation de l'homéostasie cellulaire. La formation du complexe implique le recrutement du PBM de p38γ par le domaine PDZ de PTPN4. Ainsi, en plus d'avoir une fonction de régulation du domaine phosphatase, le domaine PDZ permet également le recrutement de partenaires et la présentation de substrats au site actif de la phosphatase de PTPN4. Cette étude contribue ainsi à améliorer notre connaissance du rôle des domaines PDZ dans les voies de signalisation cellulaires.

Mots clés : mort cellulaire, PTPN4, domaine PDZ, phosphatase, régulation allostérique, MAP Kinase

Adresse du laboratoire : Unité de RMN des Biomolécules
Institut Pasteur
25-28 Rue du Dr. Roux
75724 Paris Cedex 15

Structural and functional study of the human phosphatase PTPN4

SUMMARY

The function of signaling proteins is determined by the nature of the domains from which they are made up. A better understanding of cell signaling pathways will result from the study of these domains and their regulation. PTPN4 is a non-receptor tyrosine phosphatase with an anti-apoptotic function. Upon infection with an attenuated rabies virus, its function is hijacked, which subsequently leads to cell death. This phenotype is arises from the interaction of the PDZ binding motif (PBM) of the viral glycoprotein with the PDZ domain of PTPN4.

In this study, we show that this PDZ domain is an allosteric inhibitor of the catalytic activity of the PTPN4 phosphatase domain. This is the first description of the regulation of a phosphatase by a PDZ domain. This inhibition is released by the interaction of a ligand to the PDZ domain, such as the viral glycoprotein PBM. Our structural study revealed that the PBM recognition disrupts the transient inter-domain interactions and restores the complete phosphatase catalytic properties.

As well, we identified a PTPN4 endogenous ligand, the MAP Kinase p38γ, which may participate in the regulation of the cellular homeostatic through its interaction with PTPN4. Thus, in addition to its phosphatase regulatory role, the PDZ domain also allows the recruitment of partners and the introduction of substrates to the PTPN4 phosphatase active site. This study contributes to our understanding of the role played by PDZ domains in cell signaling pathways.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements 1
Résumé 5
Summary 7
Table des matiéres 9

Introduction 13

Chapitre I - Les outils moléculaires de la signalisation cellulaire 15
1) Les interactions protéiques au cœur des voies de signalisation 15
2) Architecture en domaines des protéines de signalisation 16
A. Définition d'un domaine 16
B. Modularité des protéines de signalisation 16
3) Les domaines protéiques 18
A. Les enzymes 18
B. Les domaines d'interaction 19
a. Fonction 19
b. Spécificité 21
c. Polyvalence d'interaction 22
C. Les motifs de reconnaissance 23
4) Du réseau à la fonction 25
A. L'établissement d'un réseau 25
B. Le détournement du réseau 28
a. Les pathogènes 28
b. Phénotypes pathologiques 29
5) De la régulation des domaines à la complexification des voies de signalisation 29
A. Les associations intramoléculaires de domaines 30
B. La régulation inter-domaines 30
C. La régulation des voies de signalisation 33
D. La perturbation des régulations intramoléculaires 34

Chapitre II - Les Protéines Tyrosine Phosphatases 37
1) Les outils de la phosphorylation des protéines 37
2) Classification des Tyrosine Phosphatases 40
3) Structure des Tyrosine Phosphatases « classiques » 42
A. Le domaine PTP 43
B. Caractéristiques structurales 44
a. La boucle PTP (Motif n°9) 44
b. Le motif de reconnaissance des phospho-tyrosines (Motif n°1) 44
c. La boucle WPD (Motif n°8) 44
d. La boucle Q (Motif n°10) 45
e. Et bien d'autres motifs … 45
4) Mécanisme catalytique 45
5) Spécificité et régulation des PTP classiques 46
A. Spécificité intrinsèque du domaine PTP 47
a. Surface électrostatique 47
b. Deuxième poche de fixation au pTyr 48
c. Modifications post-traductionnelles des NRPTP 51
B. Rôle des séquences adjacentes 52
a. Localisation cellulaire 54
b. Recrutement de partenaire 54
c. Régulation directe 55
6) Vers une nouvelle vision des phosphatases 58

Chapitre III - Les domaines PDZ ____ 59
1) Structure ____ 60
2) Mode d'interaction ____ 61
A. Interactions canoniques des domaines PDZ ____ 61
a. Description de l'interaction canonique PDZ-ligand ____ 62
b. Classification des interactions PDZ-ligand ____ 63
c. Prédiction des interactions PDZ-PBM ____ 65
B. Modes d'interactions alternatifs ____ 66
a. Motif interne ____ 66
b. Dimérisation ____ 67
c. Motif lipidique ____ 69
3) Régulation des interactions ____ 71
A. Affinité des interactions ____ 72
B. Modifications post-traductionnelles ____ 72
C. Facteurs environnementaux ____ 73
D. Allostérie des domaines PDZ ____ 74
E. Structures additionnelles ____ 75
a. Extensions stabilisatrices ____ 76
b. Assemblage macromoléculaire ____ 76
c. Intégrité structurale multi-domaine ____ 77
d. Augmentation de la surface d'interaction ____ 77
4) Assemblage multi-domaines ____ 78
A. Les tandems PDZ-PDZ ____ 78
B. Les Supramodules de PDZ ____ 79
a. Supramodules de reconnaissance ____ 81
b. Supramodules à activité catalytique ____ 82
5) Vers une nouvelle vision des domaines PDZ ____ 82

Chapitre IV - Protein Tyrosine Phosphatase - Megakaryocyte 1 (PTP-MEG1 ou PTPN4) __ 85
1) Organisation structurale de PTPN4 ____ 85
A. Les motifs de reconnaissance ____ 87
a. Site de protéolyse ____ 87
b. Sites de phosphorylation ____ 88
c. Motifs riches en proline ____ 89
d. Site 14-3-3 ____ 90
B. Les domaines de PTPN4 ____ 90
a. Le domaine FERM ____ 90
b. Le domaine PDZ ____ 95
c. Le domaine PTP ____ 96
2) Les fonctions cellulaires de PTPN4 ____ 97
A. Régulation des récepteurs des cellules T (TCR) ____ 99
B. Plasticité synaptique - Dépression à long terme ____ 100
a. Interaction avec la sous-unité GluN2A ____ 101
b. Interaction avec la sous-unité GluD2 ____ 101
C. Contrôle de l'homéostasie cellulaire ____ 104
a. Mutations tumorales ____ 104
b. Oxydation de PTPN4 dans les cellules tumorales ____ 104
c. Profil d'expression ____ 105
d. Détournement de la fonction cellulaire par le virus de la Rage ____ 105
3) Implication des domaines PDZ et PTP dans les fonctions biologiques de PTPN4 ____ 109
A. Le cas de la phosphatase PTPN4 ____ 109
B. Modèle des homologues PTPN3 et PTPN13 ____ 109

Problématique 111

Résultats 113

Résultats I : Régulation intramoléculaire de l'activité catalytique de la phosphatase humaine PTPN4 par son domaine PDZ 115

1) Résumé 115
2) Article 1 – Maisonneuve *et al* 117
3) Commentaires 157
4) Résultats complémentaires 157
5) Perspectives 161

Résultats II : Étude de l'interaction de la phosphatase PTPN4 avec la MAPK kinase p38γ 165

1) Résumé 165
2) Article 2 – Maisonneuve *et al* 167
3) Perspectives 195

Discussion & perspectives générales 197

ANNEXES 205

Annexe I - Alignement de séquences des PTP classiques humaines 207

Annexe II - Classement des deuxièmes poche de fixation au pTyr des phosphatases humaines classiques 213

Liste des figures 217

Liste des tableaux 218

Liste des abréviations 219

Références 223

INTRODUCTION

CHAPITRE I - LES OUTILS MOLECULAIRES DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE

1) Les interactions protéiques au cœur des voies de signalisation



a nécessité de communiquer avec l'environnement extérieur est une caractéristique commune à l'ensemble des organismes vivants. Cette communication a pour fonction de maintenir l'organisme en vie, d'établir et maintenir l'homéostasie cellulaire, de fournir des sources en énergie par la détection de nutriments ou de se protéger par l'identification de toxines. Si les organismes unicellulaires possèdent la capacité de communiquer entre eux, les systèmes de communication entre cellules ont drastiquement évolué avec l'apparition d'organismes multicellulaires complexes. Celle-ci a permis au sein d'un organisme de contrôler le nombre de cellules, leur division, leur croissance, leur morphologie, leur localisation, leur différenciation, ou encore le maintien de leurs fonctions spécialisées (1). Ces propriétés sont essentielles pour l'organisation des cellules en tissus ou organes.

Les outils de cette communication sont les récepteurs qui captent les signaux extérieurs (*e.g.* hormones, ions, nutriments, toxines, signaux sensoriels) et les transmettent au sein des cellules. Ces signaux sont alors acheminés jusqu'à des protéines effectrices qui, une fois activées, vont modifier l'état physiologique de la cellule. Ces protéines sont au cœur des fonctions biologiques de la cellule en assurant notamment des fonctions métaboliques, des fonctions de transcription de gènes, de modification du cytosquelette ou de maintien de la polarisation membranaire. L'ensemble de ces processus biologiques qui permettent de recevoir, d'interpréter, de propager et de convertir un signal extracellulaire en une réponse biologique intracellulaire répond au terme de « transduction du signal » ou encore « signalisation cellulaire » (1).

Cette signalisation implique une cascade d'interactions de protéines à travers lesquelles la transmission de l'information s'effectue. Ces protéines de signalisation sont ainsi liées de manière fonctionnelle pour former un réseau d'interactions complexes capable de

transduire un signal. Elles sont composées de domaines fonctionnels dont la nature va déterminer leur fonction.

2) Architecture en domaines des protéines de signalisation

A. Définition d'un domaine

L'utilisation du terme « domaine » pour les protéines remonte aux années 1970. Il définissait alors des « unités structurales indépendantes » localisées à certaines régions de la même chaine polypeptidique (2, 3).
Les travaux dans les années 1980-1990 sur les domaines SH2 (***src homology 2***) et SH3 (***src homology 3***) constituent un tournant dans l'étude de ces entités structurales et dans leur définition (4-7).
Un domaine se définit désormais par les caractéristiques suivantes :

- « Une unité structurale spatialement distincte, capable de se replier de manière autonome » (8).
- La présence de séquences contiguës identifiables (séquences consensus).
- Une composition allant de 40 jusqu'à plus de 300 acides aminés.
- Une capacité d'interaction avec des courtes séquences, ou motifs.
- Une large répartition au sein du protéome (« génétiquement mobile »).

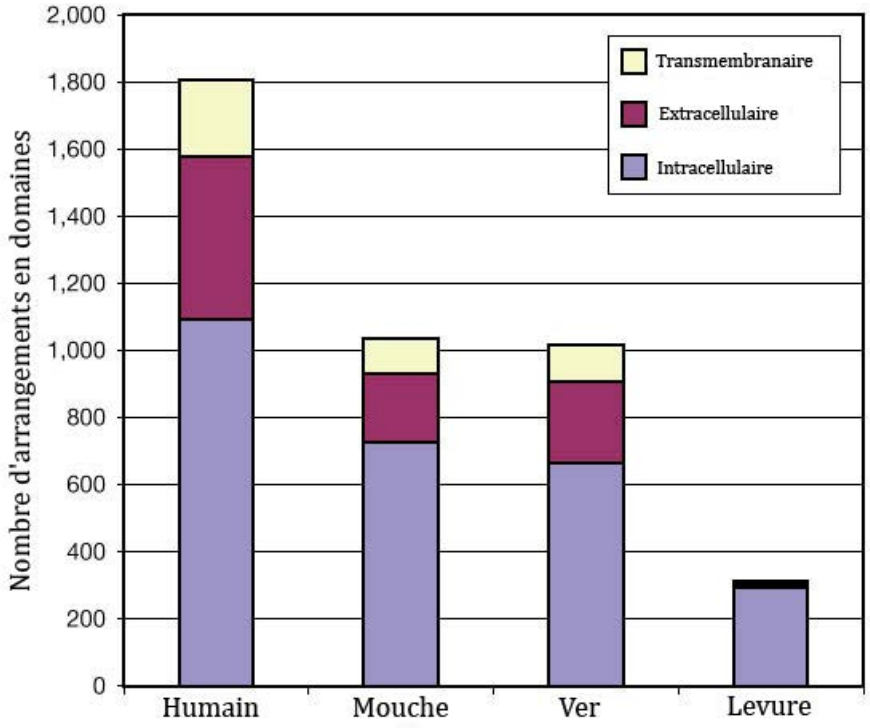
On utilise également aujourd'hui le terme de module pour définir un sous-groupe de domaines qui sont en copie unique. Ils différent ainsi des domaines dont la fonction et la structure dépendent de la répétition d'une même séquence, ou domaine de répétition, tel que le domaine WD (8, 9).

B. Modularité des protéines de signalisation

Les protéines « ancestrales » telles que les enzymes métaboliques présentent rarement une architecture modulaire (8, 10). Une étude comparative des génomes de cinq organismes eucaryotes met en évidence un accroissement du nombre de domaines et de leurs arrangements avec la complexification des organismes (figure 01). Elle montre une

augmentation du nombre et de la variété des domaines d'interaction protéine-protéine (*e.g.* SH3, SH2, PDZ) codés par le génome humain et impliqués dans la signalisation cellulaire (11, 12). Par ailleurs, les domaines sont extrêmement bien représentés dans les protéines régulatrices (13). L'ensemble de ces observations tend à démontrer que l'architecture en domaines des protéines est apparue tardivement lors de l'évolution et en concomitance avec la complexification des organismes et l'émergence d'une communication entre cellules toujours plus élaborée.

Il est aujourd'hui clairement établi que les domaines sont la base des systèmes de communication et de signalisation des cellules (10, 14-21).



<u>Figure 01 :</u> Nombre d'arrangements de domaines prédit par SMART* au sein de quatre génomes eucaryotes.
Le nombre d'arrangements est réparti en trois compartiments cellulaires différents : intracellulaire, extracellulaire et associé à la membrane. Le nombre d'arrangements de domaines est normalisé avec le nombre de domaines présents dans chaque lignée étudiée. Les domaines de répétition (Armadillo, Leucine-rich, WD40, etc…) ne sont comptés que comme une seule occurrence. D'après Lander *et al* 2001 (12).

* *Simple Modular Architecture Research Tool*, logiciel de prédiction de la présence de domaines au sein des protéines

3) Les domaines protéiques

Les protéines de signalisation sont composées de domaines enzymatiques ou de domaines d'interaction (19). Ils se replient de manière à garder leurs extrémités N- et C-terminales à la fois à proximité l'une de l'autre et sur la face opposée au site de reconnaissance au partenaire. De ce fait, ils peuvent au cours de l'évolution être incorporés facilement dans une protéine préexistante sans modifier leurs propriétés d'interaction ni leur structure (16, 22). Par la suite, j'aborderai brièvement les enzymes avant de m'attarder plus en détail sur les domaines d'interaction.

A. Les enzymes

Les enzymes impliquées dans la signalisation cellulaire ont pour fonction principale la synthèse et la dégradation de messagers secondaires (*e.g.* phospholipases, cAMP ou cGMP), la régulation de la conformation active et inactive de la protéine G ainsi que la régulation des modifications post-traductionnelles des protéines. Cette dernière fonction est prédominante dans le contrôle des voies de signalisation. Ces modifications vont intervenir de deux manières dans la transduction du signal :

- Réguler la fonction d'une protéine *via* des mécanismes allostériques (23) ou des changements conformationels (24).

- Créer ou supprimer un point d'ancrage reconnu par un domaine, spécifique à une certaine modification post-traductionnelle, et permettre ainsi de réguler l'interaction d'une protéine avec son partenaire.

De l'ensemble du répertoire des modifications post-traductionnelles connues à ce jour, la phosphorylation des protéines est décrite comme étant la plus répandue. Elle est sous le contrôle de kinases et de phosphatases, deux enzymes au centre de nombreuses voies de signalisation dont nous parlerons plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

B. Les domaines d'interaction

Alors que les enzymes jouent un rôle crucial dans la transduction du signal, les domaines d'interaction, au-delà d'établir des contacts entre protéines, permettent également l'établissement et la régulation du réseau de signalisation.

a. Fonction

Les domaines d'interactions ont pour rôle majeur de reconnaître de courtes séquences consensus chez leurs partenaires, permettant alors l'interaction entre différentes protéines. Ces séquences sont de diverses natures. Les domaines SH3 et WW (two-conserved tryptophans), par exemple, reconnaissent des séquences riches en prolines (Pro-rich). Les domaines PDZ reconnaissent quant à eux des séquences situées principalement en C-terminal du partenaire (25-27). D'autres domaines vont interagir avec des séquences selon les modifications post-traductionnelles qu'elles portent, tels que les domaines MH2 et SH2 qui interagissent respectivement avec des séquences composées de phospho-sérines (pSer) ou des phospho-thréonines (pThr), et de phospho-tyrosines (pTyr). Les Bromo domaines et les domaines Chr vont interagir avec des lysines acétylées ou méthylées. Les domaines UIM reconnaissent quant à eux des protéines ubiquitinées (28-33) (Figure 02).

Il existe également des domaines qui n'interagissent pas avec leurs partenaires *via* la reconnaissance de motifs consensus, mais plutôt de façons homo- ou hétérotopique avec d'autres domaines. C'est le cas des domaines impliqués dans l'activation des voies apoptotiques dont les domaines de mort DD (**D**eath **D**omain) sont un exemple (34).

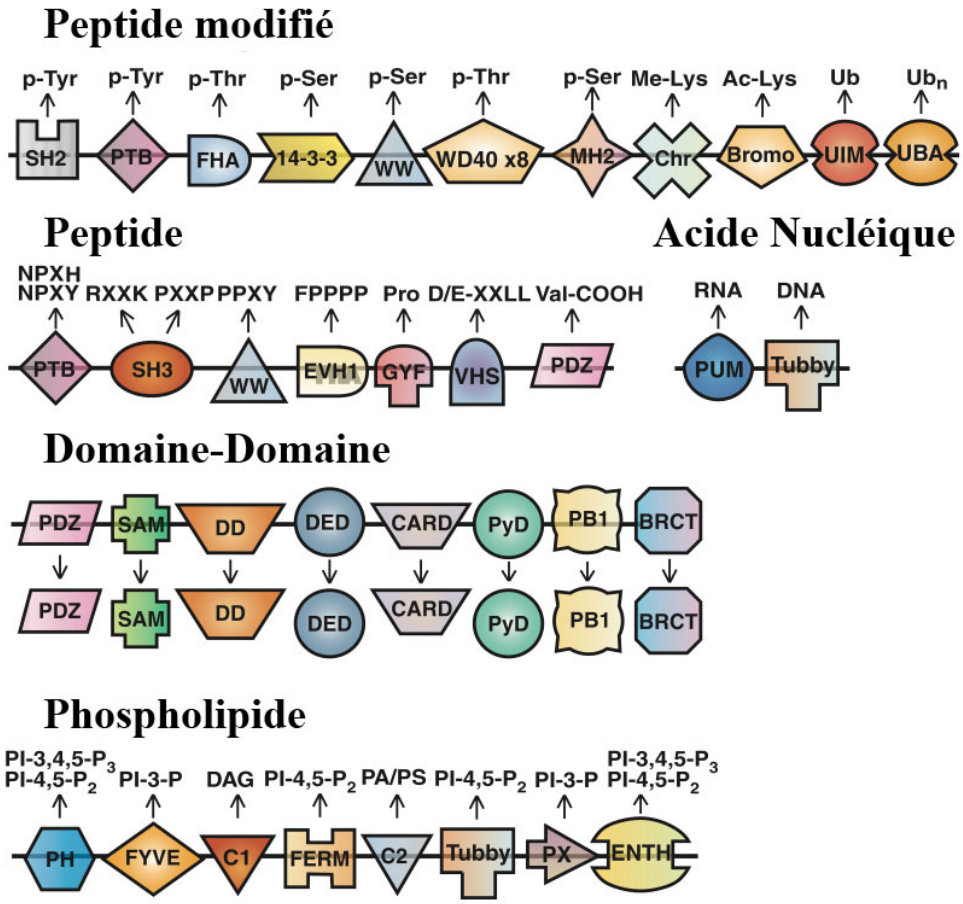


Figure 02 : Domaines d'interaction impliqués dans la transduction du signal
Les domaines d'interaction interagissent avec des protéines, des phospholipides, ou encore des acides nucléiques. Une petite partie d'entre eux sont illustrés ici, ainsi que les séquences principales reconnues. D'après Pawson *et al* (2003) (19).

Bien que les interactions entre protéines soient majoritaires lors de la transduction du signal, d'autres reconnaissances moléculaires peuvent intervenir. Les domaines PH ou FERM, par exemple, reconnaissent des phospholipides. Ils jouent un rôle dans la localisation cellulaire des protéines, notamment à la membrane plasmique (35, 36). D'autres domaines sont aussi connus pour interagir avec des acides nucléiques comme les domaines KH (hnRNP **K** **h**omology) ou PUM (**Pum**ilio homology domain). Ils peuvent réguler des processus fondamentaux tels que la transcription ou la traduction (37, 38). Les domaines RRM (**R**NA **r**ecognition **m**otif) interagissent quant à eux avec l'ARN et jouent un rôle dans l'épissage de pré-mRNA (39, 40).

Cette diversité de partenaires recrutés par l'ensemble de ces domaines fait qu'ils sont impliqués dans et relient fonctionnellement chaque niveau structural de la cellule (membrane, protéine, ARN, ADN).

b. Spécificité

L 'existence de différents domaines capables de reconnaître les même motifs (Pro-rich, pSer, pThr, pTyr) et le nombre important de ces domaines retrouvés dans le génome humain amènent la question de leur spécificité vis à vis de leurs ligands.
L'augmentation du nombre de domaines au cours de l'évolution est principalement due au brassage génétique ainsi qu'à la duplication et la divergence des gènes (41 2009). Lors de ce processus, chaque domaine acquiert, au gré des mutations, des propriétés d'interactions quelque peu différentes de ses homologues. Ainsi, au sein d'une même famille de domaines, les différentes propriétés de reconnaissance sont regroupées en « classes », sur la base des séquences qui sont reconnues.

En ce sens, les domaines SH2 sont répartis en deux classes majeures. La classe I interagit avec la séquence consensus pY-X-N-X† et la classe II avec la séquence pY-X-X-P/L (42, 43). Les domaines WW sont répartis en cinq classes dont la première, la plus abondante, reconnaît le motif P-P-X-Y (44-47). Les domaines SH3 sont quant à eux divisés en trois grandes classes dont les séquences consensus des deux premières sont +-X-X-P-X-X-P et P-X-X-P-X-+ (48).
Ces deux derniers domaines ont tous deux une préférence pour les motifs riches en proline mais leurs séquences consensus sont assez différentes les unes des autres pour qu'une séquence ne soit reconnue que par un seul des deux domaines. De ce fait, il n'y a pas de chevauchement de spécificités. On observe la même différenciation de motif, par exemple, pour les pTyr avec les domaines SH2 et PTB (42, 49).

La spécificité au sein d'une même classe d'un domaine pour un ligand va quant à elle dépendre des résidus non discriminants du motif, marqués « X », des acides aminés en amont et aval du motif, lorsque ceux-ci participent à l'interaction, ainsi que du contexte

† Les lettres correspondent au code à une lettre des acides aminés. X indique n'importe quel acide aminé; pX indique la phosphorylation de l'acide aminé ; + indique un acide aminé chargé positivement.

moléculaire et cellulaire (50, 51). Aussi, pour une même famille de domaines, il y a un chevauchement de spécificités pour les différentes séquences consensus d'où résulte un continuum de reconnaissance avec leurs ligands (49, 52, 53). Ceci participe à l'échafaudage du réseau d'interactions et apporte une certaine finesse dans la réponse apportée à divers stimuli.

Pour finir, il est évident que la localisation cellulaire ou encore le niveau de transcription de chaque domaine est un paramètre crucial pour moduler la reconnaissance du motif par une protéine partenaire (54).

c. Polyvalence d'interaction

La divergence de certains domaines au cours de l'évolution apporte, pour une même famille, la capacité de reconnaître d'autres types de motifs consensus ou de recruter des partenaires de nature différente, comme les lipides. Les domaines WW ont, par exemple, la capacité de reconnaitre, en plus des motifs riches en prolines, des pSer ou des pThr (55, 56). De même le domaine SH3 de la protéine Gads reconnaît le motif R-X-X-K au lieu du motif conventionnel P-X-X-P (57).

Certains domaines acquièrent une plus grande polyvalence d'interaction. Des domaines SH2 peuvent interagir avec des domaines SH3 *via* une surface d'interaction différente du site d'interaction aux pTyr (58) ou encore interagir avec des motifs non phosphorylés (59). De la même façon, les domaines PH (**P**leckstrin **H**omology) ont la capacité d'interagir avec des molécules de natures diverses telles que des phospholipides, des pTyr ou des hélices poly-prolines (Figure 03) (60).
Enfin, les domaines PDZ sont aussi un bon exemple pour illustrer la diversité d'interactions dans lesquelles des domaines peuvent être impliqués. Au-delà de reconnaître des motifs peptidiques situés en C-terminal des partenaires, certains sont capables d'interagir avec des lipides ou encore de former des homo ou hétéro-dimères. La polyvalence d'interaction de ces domaines et leur implication dans la transduction du signal seront traitées en détail ultérieurement dans cette thèse.

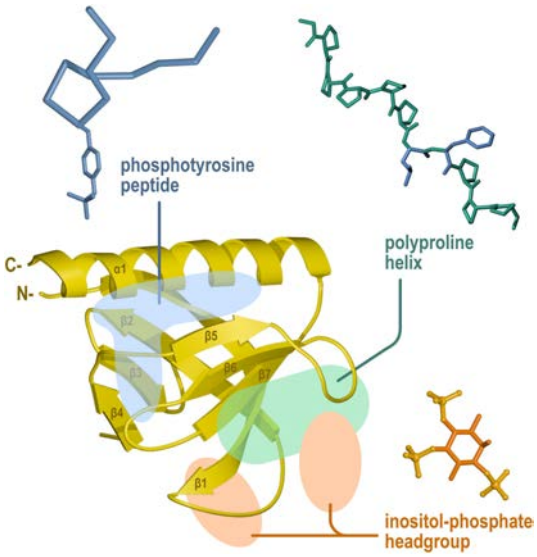


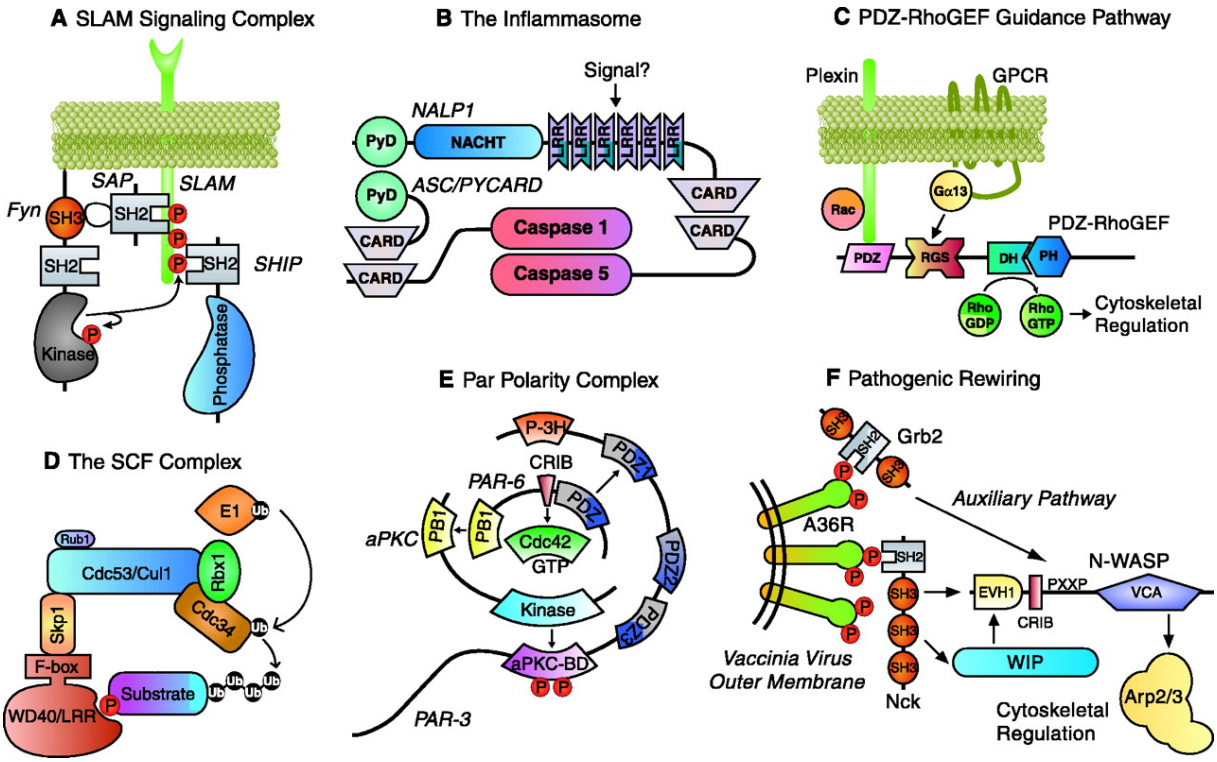
Figure 03 : Les domaines PH et leurs sites de fixation canonique.
Les domaines PH peuvent interagir avec des groupements inositol phosphorylés (orange), des hélices poly-prolines (vert) et avec des peptides phospho-tysosines (Bleu). D'après Scheffzek *et al* (2012) (60).

Cette polyvalence qu'ont les domaines de reconnaissance à recruter des partenaires illustre la façon dont ils participent de manière dynamique à l'établissement du réseau d'interactions au sein de la cellule. Ils permettent, par l'utilisation d'un nombre limité de domaines, une diversification du réseau d'interactions d'une même protéine. Un exemple récurrent est celui du domaine MH2 de la protéine SMAD qui peut interagir avec les pSer, la protéine d'architecture Sara, ou avec des composants de la machinerie de transcription et permet à la protéine d'être ainsi impliquée dans différentes voies de signalisation (19, 61).

C. Les motifs de reconnaissance

L'interaction d'un domaine de reconnaissance avec une courte séquence d'acides aminés présente au sein du partenaire est indispensable lors de la transduction du signal (17, 19).

Ces motifs de reconnaissance sont majoritairement (~90%) composés de 3 à 11 acides aminés mais peuvent atteindre jusqu'à 23 acides aminés (62). Ils sont généralement situés dans des régions désordonnées des protéines (63). Du fait de leur faible surface d'interaction avec les domaines, leur affinité est relativement faible (de 1 à plusieurs centaines de micromolaires ; µM) (64). Ceci à l'avantage de permettre des interactions transitoires nécessaires à la transduction du signal (65).



<u>Figure 04 :</u> Utilisation des domaines d'interactions pour construire une machinerie de signalisation complexe.

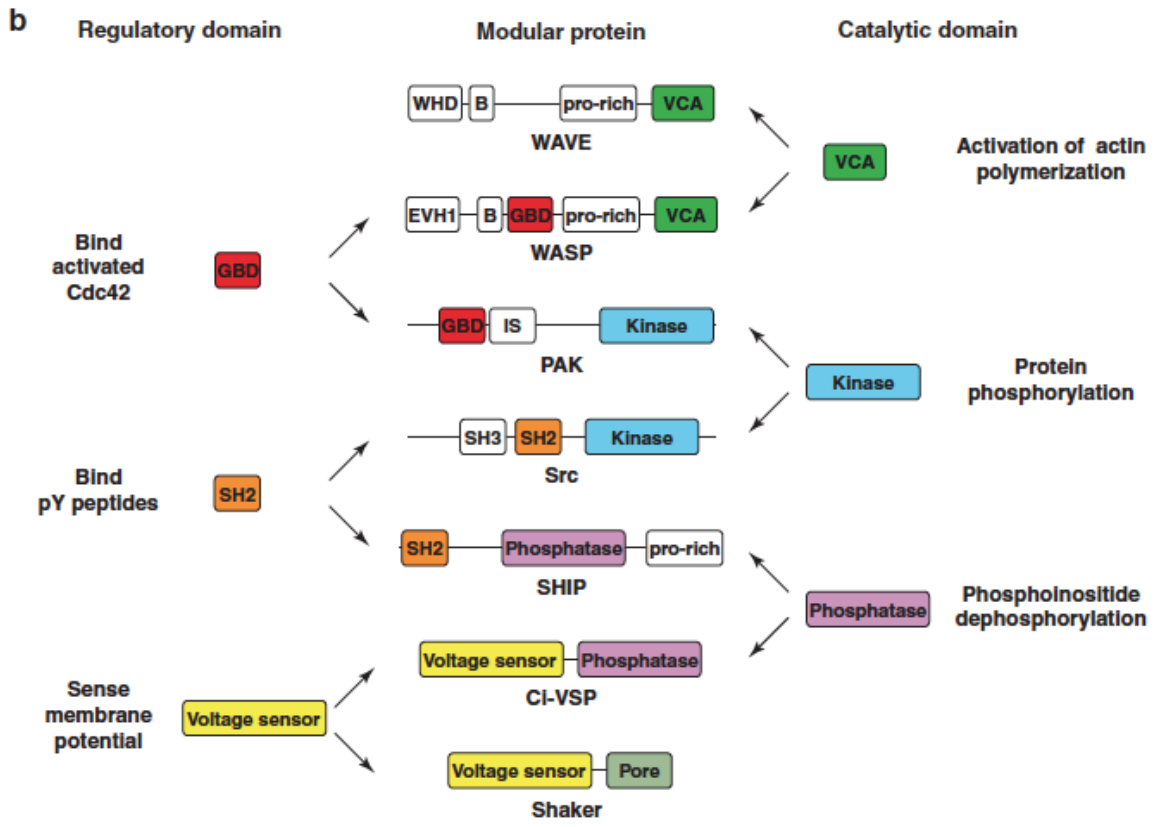
(A) Un complexe de signalisation formé par le récepteur SLAM de cellules T, la kinase Fyn, la protéine SAP et la phosphatase SHIP. Le réseau d'interactions protéiques et la réponse à l'infection virale des cellules lymphoïdes dépendent de la régulation de la phosphorylation du récepteur SLAM.
(B) L'activation de NALP1 induit la formation de l'inflamosome qui amène les pro-caspases à proximité les unes des autres et entraîne leur activation (66).
(C) Les protéines Rho-GEFs des familles PDZ-RhoGEF et LARG utilisent les domaines PDZ et RGS pour intégrer le signal de la protéine plexin-B1 et des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR).
(D) Un complexe de signalisation SCF ubiquitine ligase E3. Le complexe SCF est composé de la protéine Skp1, d'une protéine Cullin (Cdc53), d'une E2 (Cdc34), d'une Rbx1 RING-*finger* et d'une protéine substrat de F-box telle que Cdc4, Skp2 ou β-TrCP (67). La poche de fixation de la protéine F-box lie des partenaires pour l'ubiquitination ; cette interaction requiert fréquemment la phosphorylation de ces partenaires.
(E) Le complexe PAR-3/PAR-6 est impliqué dans la polarité cellulaire. Un réseau d'interactions impliquant différents domaines crée un complexe entre les protéines PAR3, PAR6, aPKC et Cdc42, requis pour l'établissement et la maintenance de la polarité cellulaire.
(F) Certains pathogènes peuvent profiter de la machinerie cellulaire préexistante et détourner la signalisation cellulaire à leur avantage. La protéine A36R du virus Vaccinia recrute Nck et réorganise le cytosquelette (68). D'après Pawson *et al* (2003) (19).

La modification post-traductionnelle de certains motifs est cruciale dans la spécificité des interactions et représente un autre niveau de régulation à travers l'activité des enzymes responsables de ces modifications. Les motifs sont ainsi un lien fonctionnel entre les enzymes et les domaines de reconnaissance impliqués dans la transduction du signal pour contrôler l'état de la cellule (19).
En comparaison des domaines qui sont principalement conservés au cours de l'évolution (69, 70), les motifs évoluent beaucoup plus rapidement (71). Par leur faible longueur et cette rapidité d'évolution un motif peut apparaître dans plusieurs protéines différentes suite à une évolution convergente (72). De ce fait, les motifs participent activement à la plasticité et à l'évolution du réseau d'interaction au sein de la cellule par la genèse de nouvelles interactions protéine-protéine (73).

4) Du réseau à la fonction

A. L'établissement d'un réseau

Comme nous l'avons vu, la transduction du signal au sein de la cellule est, entre autres, basée sur des interactions protéiques. Ces interactions vont dépendre de la présence de motifs de reconnaissance et/ou de modifications post-traductionnelles au sein du partenaire. La cellule contrôle la spécificité des interactions en organisant et régulant les différentes protéines dans le temps et l'espace (21, 74, 75).
L'organisation de ce réseau d'interactions est possible grâce à la grande diversité d'association de motifs et domaines au sein des protéines (Figure 04). Ces différentes combinaisons de domaines permettent, par exemple, à une même enzyme d'être reliée fonctionnellement à différentes voies de signalisation ou d'être répartie dans différents compartiments cellulaires (*e.g.* membrane plasmiques, ou différents organelles) (figure 05).



<u>Figure 05 :</u> Exemples de transferts de fonctionnalités entre protéines via la réutilisation de domaines en différentes combinaisons afin d'établir différentes connections entre des activités catalytiques et le ciblage de divers partenaires.

Le domaine VCA (*verpolin homology*, *cofilin homology*, *acidic*), qui active la polymérisation de l'actine, est commun aux protéines régulatrices de l'actine WAVE et WASP (76). Dans ces dernières, ce domaine est combiné à différents domaines d'interactions. Ces différentes combinaisons contribuent à leur implication distincte dans la polymérisation de l'actine.

Le domaine *GTPase binding domain* (GBD) présent au sein de WASP et de la protéine p21-*activated kinase* (PAK) permet d'adresser ces deux protéines à son partenaire, la protéine Cdc42 (77).

Le domaine kinase de PAK est également présent dans différents contextes protéiques. On le retrouve dans la protéine Src, où il est combiné avec différents domaines d'interactions, comme le domaine SH2 qui régule le niveau d'activation de la kinase et le recrutement de partenaires phosphorylés (16, 78, 79).

Les domaines SH2 sont des composants courants des voies de signalisation et se trouvent dans une grande variété de protéines telle que la phosphatase SHIP (80).

Les domaines phosphatases sont eux-aussi présents dans diverses protéines, par exemple, la phosphatase sensible au voltage *Ciona intestinalis*, Ci-VSP.

Cette dernière comprend un domaine sensible au voltage, traditionnellement présent au sein des canaux à voltage tels que Shaker. Son activité phosphatase est alors régulée par le potentiel membranaire (81, 82).

Ainsi, l'organisation modulaire des protéines de signalisation est basée sur l'utilisation redondante d'un nombre limité de domaines qui peuvent être fonctionnellement combinés. D'après Bhattacharyya *et al* (2006) (10).

Une autre manière de contrôler le flux d'informations est l'établissement de complexes multi-protéiques de signalisation. Ces derniers impliquent des protéines « d'architecture » constituées de domaines ou de motifs d'interaction. Elles peuvent interagir avec différents partenaires de manière simultanée ou successive (83). La séquestration de différentes enzymes au sein d'un même complexe permet de contrôler la précision du flux d'informations ainsi que la fidélité du signal pour une même voie de signalisation. C'est le cas des protéines d'architecture JIP (**J**un **N**-Terminal **K**inase - JNK - **I**nteracting **P**roteins) qui améliorent la cascade d'interactions impliquant les kinases JNK, ou des protéines KSR et MP-1 qui forment différentes combinaisons de MAP Kinases (**M**itogen **A**tivated **P**rotein) pour faciliter la transduction du signal (21, 84).

Aujourd'hui les processus de signalisation permettant le contrôle des processus biologiques de la cellule ne sont pas encore complètement compris (85). Il est néanmoins clair que l'organisation en domaines des protéines de signalisation permet la formation de complexes protéiques essentiels pour les processus de transduction du signal. Ainsi, une série d'interactions simples, telles que les interactions protéine-protéine ou protéine-lipide, peuvent se combiner pour former un réseau de signalisation complexe qui, en réponse à de nombreux stimuli, contrôle des aspects physiologiques importants pour la cellule (18). En outre, la multiplication de ces interactions au sein de ce réseau constitue autant de points de régulation de la transduction du signal.

Le vaste nombre de combinaisons de domaines présent dans le protéome suggère que le brassage génétique peut-être une source majeure d'évolution dans les processus de signalisation (19, 41). Trois éléments principaux supportent cette idée. Premièrement, la fonction des protéines est associée à leur combinaison en domaines (86). Deuxièmement, des mutations ayant pour conséquence la fusion de gènes codant pour des protéines conduit à une activation incorrecte des voies de signalisation, amenant une transformation oncogénique des cellules (87, 88). Troisièmement, la fusion de divers domaines, qu'ils soient d'interaction ou catalytiques, peut permettre la création de protéines synthétiques avec de nouveaux interactants, à la fois *in vitro* (89) et *in vivo* (90, 91).

L'utilisation récurrente de domaines d'interaction a pu faciliter l'évolution de nouvelles fonctions cellulaires, car ils peuvent être réunis en de nouvelles combinaisons pour créer de nouvelles connections et voies de signalisation au sein de la cellule. Différentes études ont d'ailleurs montré qu'il est possible de créer de manière synthétique de nouvelles fonctions cellulaires par le biais de nouvelles combinaisons de domaines au sein d'une protéine (73, 92-94).

B. Le détournement du réseau

a. Les pathogènes

Cette même stratégie (naturelle ou synthétique) qui consiste à reprogrammer la cellule est également habilement utilisée par les virus pour détourner les fonctions de la cellule à leur avantage (95, 96). Pour ce faire, ils ont développé des systèmes mimétiques tels que des enzymes, des domaines ou des motifs d'interaction pour recruter différentes protéines de l'hôte.

Certains virus ont développé la capacité de coder pour des motifs de reconnaissance et ainsi recruter des protéines intracellulaires (62, 97). L'étude de Préhaud *et al.* illustre comment deux souches du virus de la rage recrutent des domaines PDZ de deux protéines cellulaires différentes et induisent deux phénotypes opposés, soit la mort soit la survie (98).
Par ailleurs, différents pathogènes ont évolué de manière convergente pour recruter le même partenaire cellulaire. Le virus Vaccinia et la bactérie entéro-pathogénique *Escherichia coli* ont tous deux acquis indépendamment le même motif d'interaction de reconnaissance de la protéine humaine Nck permettant de réorganiser le cytosquelette de l'hôte infecté (18, 68, 99).

L'utilisation de protéines d'architecture a également été démontrée pour reprogrammer une nouvelle voie de signalisation à l'avantage du pathogène *E. coli* entérohémorragique (100). De même, la bactérie *Yersinia pestis*, par l'intermédiaire d'un arsenal de différentes protéines, comme la tyrosine phosphatase YopH (*Yersinia* outer protein H), va perturber différentes voies de signalisation dépendantes de modifications post-traductionnelles et détourner les fonctions biologiques de l'hôte pour assurer son cycle infectieux (101, 102).

b. Phénotypes pathologiques

La perte d'interactions protéine-protéine, ou à l'inverse l'émergence de complexe protéique aberrant dans la cellule suite à une mutation de protéines cellulaires, peut également modifier le réseau d'interactions, la biologie de la cellule et entraîner des phénotypes pathologiques.

La protéine p53, protéine modulaire anti-apoptotique, est la protéine humaine la plus mutée dans les cancers. Ces mutations peuvent altérer l'interaction des domaines ou des nombreux motifs de reconnaissance de p53 avec ses partenaires et ainsi modifier drastiquement la physiologie d'une cellule et la transformer en cellule tumorale (54)

5) De la régulation des domaines à la complexification des voies de signalisation

Les domaines, au-delà de l'établissement d'un réseau de signalisation capable de transduire un signal, peuvent être impliqués dans des interactions intramoléculaires. Ces dernières donnent de nouvelles propriétés fonctionnelles aux protéines et modifient ainsi leurs propriétés de transduction du signal (103).

A. Les associations intramoléculaires de domaines

La grande diversité de combinaison des domaines au sein des protéines de signalisation donne parfois lieu à des interactions intramoléculaires (23). De ces associations de domaines peuvent émerger des fonctions différentes comparées à celles des domaines isolés. La comparaison faite par Bashton et Chothia sur les fonctions de domaines seuls ou associés met en lumière cette diversité des modifications fonctionnelles qui peut émerger de ces interactions (86). Bien que la fonction du domaine soit parfois drastiquement modifiée, allant jusqu'à entraîner des réactions catalytiques différentes, la plupart des cas montre que les domaines étudiés ont une fonction similaire mais modulée en présence du domaine additionnel. De plus la fonction d'un domaine est parfois placée sous le contrôle du domaine additionnel. Nous nous concentrerons par la suite sur ce dernier type de régulation intramoléculaire, notamment dans le contexte du contrôle de l'activité de domaines enzymatiques.

B. La régulation inter-domaines

Les domaines enzymatiques peuvent être associées à divers types de domaines adjacents qui vont alors contrôler leurs activités. Dans la majorité des cas, ce contrôle s'effectue par un mécanisme d'auto-inhibition (Tableau 01) (104). Ce mécanisme peut être soit allostérique, soit stérique en bloquant directement l'accessibilité du substrat au site actif (92). La fonction catalytique peut alors être réactivée suite à la fixation d'un ligand au domaine régulateur ou à une modification covalente qui perturbera les interactions auto-inhibitrices.

La kinase c-Abl est l'un des exemples les plus connus d'une régulation catalytique par des domaines d'interaction adjacents (105, 106). c-Abl comporte, en plus d'un domaine catalytique tyrosine kinase, deux domaines d'interaction SH2 et SH3, et un groupement myristoyl N-terminal. SH2 et SH3 interagissent avec des motifs de reconnaissance internes à la protéine, et le groupement myristoyl se loge dans une poche hydrophobe du domaine kinase.

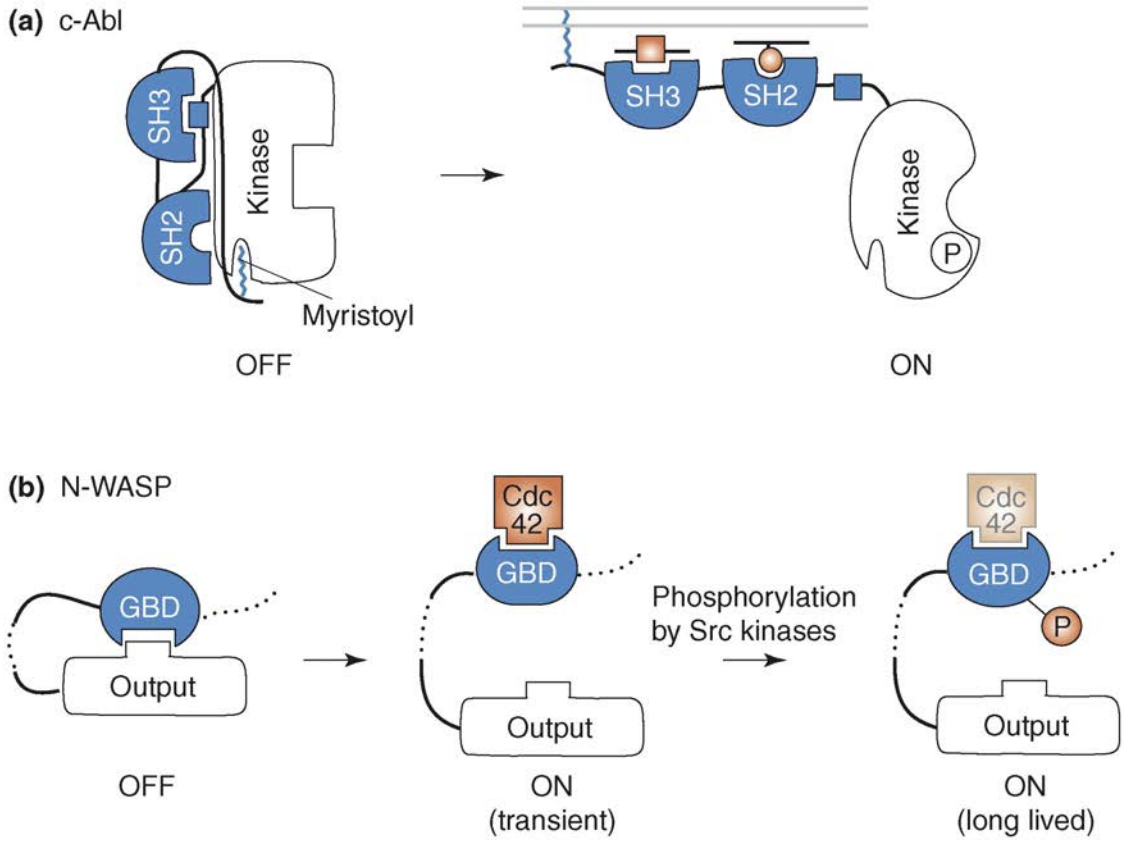
Protéines	Partenaires en aval	Fonctions en amont	Mécanismes d'auto-inhibition	Références
			Stérique	
EGFR	EGF	Dimérisation du récepteur	Un domaine Cystéine-rich bloque la surface de dimérisation, qui est un autre domaine Cystéine-rich.	(107, 108)
Phosphatase 2 à domaine SH2 (SHP2)	Motifs de fixation aux domaines SH2 (pTyr)	Phosphatase	Le domaine SH2 N-terminal bloque stériquement le site catalytique de la phosphatase.	(109)
PAK1	Rac ou Cdc42	Ser/Thr Kinase	Un domaine GBD bloque le site catalytique, empêchant une autophosphorylation.	(77)
Twitchin	complexe Ca2+/S100	Ser/Thr Kinase	Un motif pseudo-substrat occupe le site actif de la kinase verrouillé par un domaine IgG adjacent.	(110)
P47phox	Phosphorylation par PKC	NADPH oxydase	Un peptide intramoléculaire empêche un tandem de domaines SH3 d'interagir avec des partenaires associés à la membrane ; ceci bloque la formation du complexe oxydase.	(111)
Vav	Phosphorylation par la famille de kinases Src	Rho, Rac, Cdc42, GEF (DH-PH domaine)	Une extension N-terminale bloque le site d'interaction à la GTPase.	(112)
			Conformationnel	
Src kinase	Motifs de fixation aux domaines SH2 et SH3	Tyr Kinase	L'interaction des domaines SH2 et SH3 avec des motifs intramoléculaires contraint la kinase dans une conformation inactive.	(16)
C-Abl	Motifs de fixation aux domaine SH2 et SH3 ; interaction avec des groupements myristoyls	Tyr Kinase	La fixation du groupement N-terminal myristoyl et des domaines SH2 et SH3 avec des motifs intramoléculaires bloque la kinase dans une conformation inactive similaire à celle de la famille Src.	(105, 106)
N-Wasp	Cdc42 et PIP2	Stimulation de Arp2/3 (polymérisation de l'actine)	GBD et un motif polybasique forment des interactions coopératives qui inactivent le domaine N-WASP et l'empêchent d'activer le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3.	(113, 114)

Tableau 1 : Exemples de protéines de signalisation régulées par des mécanismes d'auto-inhibition. Adapté de Dueber *et al* (2004) (92).

Ces interactions intramoléculaires stabilisent l'enzyme dans une conformation inactive. L'ancrage à la membrane du groupement myristoyl et l'interaction des domaines SH2 et SH3 avec des ligands intermoléculaires induit quant à elle un changement conformationnel de la protéine, lève l'inhibition et active l'activité enzymatique de la

kinase (Figure 06a). Dans cet exemple, les domaines SH2 et SH3 sont situés sur la face opposée au site actif et la régulation se fait ainsi de manière indirecte.

La phosphatase SHP2 (SH2-containing phosphatase 2), qui contient deux domaines SH2 en N-Terminal du domaine catalytique tyrosine phosphatase, présente un mécanisme d'auto-inhibition direct. Le domaine SH2 N-Terminal (N-SH2) bloque de manière stérique le site actif de la phosphatase. La fixation de ligands aux domaines SH2 perturbe la conformation auto-inhibée en déplaçant les domaines SH2, lève l'inhibition enzymatique et libère l'accès du site actif aux substrats (109).



<u>Figure 06 :</u> Exemples de régulations allostériques de protéines modulaires.

(a) La kinase c-Abl est stabilisée dans une conformation auto-inhibée par trois interactions intramoléculaires impliquant le domaine SH3 avec un ligand interne, le domaine SH2 avec une boucle du domaine kinase et l'ancrage d'un groupement myristoyl dans une poche hydrophobe du domaine kinase. La kinase peut être activée par des ligands intermoléculaires qui perturbent ces interactions auto-inhibitrices. (b) La famille de protéines WASP peut interagir avec et activer le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 (*actine-related protein* 2/3). Le domaine « Output » est inhibé par plusieurs interactions intramoléculaires dont celle avec le domaine GBD. Cette dernière peut-être levée par la fixation de la GTPase Cdc42 au domaine GBD, ce qui active transitoirement la protéine WASP. L'interaction avec Cdc42 augmente l'accessibilité d'une tyrosine du domaine GBD qui est être phosphorylée par une kinase de la famille Src. Cette phosphorylation interfère avec l'interaction auto-inhibitrice du domaine GBD et stabilise WASP dans une conformation active, même après le retrait de retrait du stimulus initial, Cdc42. Adapté de Dueber et al (2004) (92).

C. La régulation des voies de signalisation

La régulation intramoléculaire des protéines de signalisation a un impact direct sur leurs propriétés de transduction du signal. Dans le cas de la kinase Src, qui présente un mécanisme d'auto-inhibition *via* ses domaines SH2 et SH3, son niveau d'activation dépend du partenaire qui sera reconnu par les domaines régulateurs. Plus précisément, l'activation catalytique de la kinase par un ligand du domaine SH2 est plus forte que celle obtenue avec un ligand du domaine SH3. Ainsi, le mécanisme d'inhibition de la kinase permet de moduler le niveau de réponse en fonction du partenaire lors de la transduction du signal. De plus, une protéine ayant la capacité d'interagir avec les deux domaines régulateurs SH2 et SH3 plutôt qu'avec seulement l'un des deux, activera de manière plus efficace le domaine kinase (16).

Les mécanismes d'auto-inhibition, en plus de réguler le niveau d'activation d'une enzyme, peuvent également moduler la durée de l'activation. Par exemple, la famille des protéines régulatrices de l'actine, WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), a un mécanisme d'auto-inhibition impliquant une interaction intramoléculaire de son domaine GBD. L'interaction de ce dernier avec son partenaire cdc42 active de manière transitoire la protéine WASP. Par ailleurs, cette interaction favorise *in vitro* la phosphorylation du domaine GBD en améliorant son accessibilité à différentes kinases (Abl, Lck et Lyn), ce qui stabilise l'état actif de la protéine de manière plus longue (figure 06b) (115-117).

Ainsi, ces mécanismes de régulations permettent d'établir des systèmes très fins capables de contrôler l'intensité ou la durée de la réponse de la protéine lors de la transduction du signal. En ce sens, une étude de conception synthétique de protéines montre que la combinaison de différentes interactions auto-inhibitrices permet d'obtenir des mécanismes d'activation divers et complexes. Ces protéines peuvent, par exemple, s'activer soit en la présence simultanée de deux partenaires, soit en la présence d'un des deux partenaires domaines. D'autres phénotypes d'activation bien plus complexes ont été obtenus (Figure 07) (89). L'association et la régulation des domaines au sein d'une protéine sont donc cruciales pour la fonction même de celle-ci ainsi que pour son implication dans diverses voies de signalisation en fonction des stimuli.

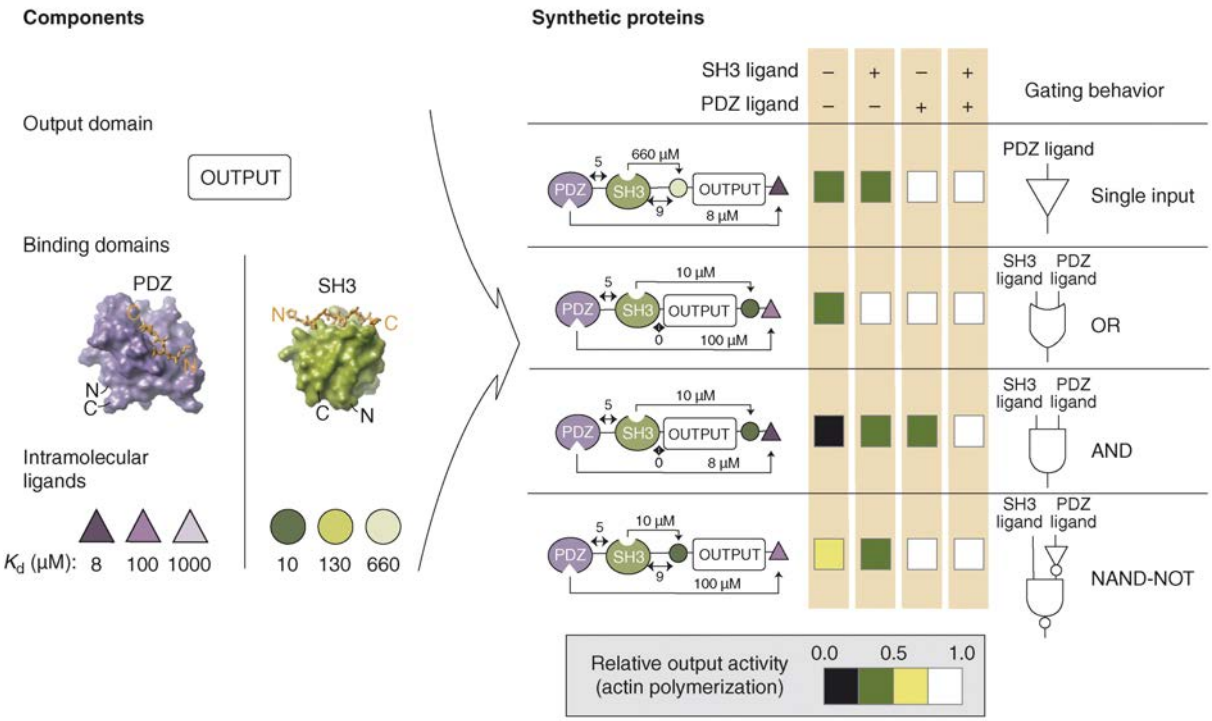


Figure 07 : Reprogrammation de l'activation de N-WASP par combinaisons synthétiques de domaines pour contrôler l'activation de la polymérisation de l'actine.
Dueber *et al*. ont tenté de moduler l'activation de la protéine N-WASP *via* des interactions auto-inhibitrices synthétiques de domaines SH3 et PDZ (89). Plusieurs mécanismes d'activation ont été construits en utilisant différentes combinaisons de domaines et de ligands intramoléculaires d'affinités variables. La colonne de droite en montre quelques exemples D'après Dueber *et al* (2004) (92).

D. La perturbation des régulations intramoléculaires

L'importance de ces mécanismes d'auto-inhibition dans le maintien et le contrôle des voies de signalisation d'une cellule est mise en évidence lorsque des mutations qui perturbent ces mécanismes causent des dysfonctionnements physiologiques à l'échelle de la cellule ou de l'organisme.

Des mutations de la phosphatase humaine SHP2 (PTPN11), par exemple, suppriment des interactions auto-inhibitrices entre le domaine catalytique et le domaine N-SH2. Ces mutations rendent cette protéine constitutivement active et comptent parmi les causes du syndrome de Nooman, une maladie congénitale causant des anomalies telles qu'une petite taille, une dysmorphie faciale ou des déficiences cardiaques (118-120). En ce qui concerne la famille de protéines WASP, une mutation altère le domaine inhibiteur GBD et active constitutivement la protéine qui cause alors des troubles de neutropénie, ce qui se traduit par un taux bas de granulocytes dans le sang (121).

Les virus, orfèvres dans l'art de remodeler les voies de signalisation des cellules à leur avantage, détournent également les propriétés de régulation des protéines. La protéine v-Src est exprimée par le virus du Sarcome de Rous et est homologue de la protéine cellulaire Src (ou c-Src). Elle est aussi constitutivement activée du fait du manque de la queue C-Terminale qui stabilise la forme auto-inhibée (122). Cette perturbation de l'interaction entre le domaine catalytique et les domaines SH2/SH3 induit à elle seule l'activation constitutive de l'enzyme et la transformation maligne de la cellule infectée (18, 123).

La compréhension des mécanismes de régulation inter-domaines permet donc de mieux appréhender la biologie de la cellule et d'éclairer les origines de nombreuses pathologies. En outre, l'association et la régulation des domaines au sein des protéines de signalisation ont un impact direct sur leurs propriétés de transduction du signal ainsi que sur leur implication dans diverses voies de signalisation.
Parmi l'ensemble des domaines existants, les domaines tyrosine phosphatases sont un bon exemple illustrant ces mécanismes dans la mesure où leur fonction est dépendante des domaines avec lesquels elles sont combinées.

CHAPITRE II - LES PROTEINES TYROSINE PHOSPHATASES

1) Les outils de la phosphorylation des protéines

Les phosphoprotéines ont intéressé les scientifiques dès la fin du XIXème siècle. Elles ont d'abord été trouvées dans le jaune d'œuf, pour la phosvitine (124), ou dans le lait, pour la caséine (125) et elles étaient ainsi considérées comme les porteuses de nutriments biologiques. L'activité enzymatique de phosphorylation de protéines à partir du clivage de molécules d'ATP n'a été décrite pour la première fois que dans les années 1950 (126). Enfin, l'implication de la phosphorylation dans la régulation des protéines fut mise en lumière par les travaux fondateurs de E.H. Fisher et E.G. Krebbs (127), pour lesquels ils ont obtenu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1992 (128, 129). La phosphorylation réversible des protéines est désormais reconnue comme étant l'un des mécanismes majeurs dans les voies de signalisation d'une cellule. Elle peut être impliquée dans la transcription et la réplication des gènes, les réponses immunitaires, le développement et la différenciation cellulaires, la transformation oncogénique ou encore les mécanismes d'apoptose.

On estime que 30% des protéines cellulaires sont phosphorylées sur au moins un résidu (130). La phosphorylation s'effectue majoritairement sur les acides aminés sérine, thréonine et tyrosine, et plus rarement sur les cystéine, lysine, glutamate, aspartate, arginine et histidine. D'après une étude protéomique sur des cellules eucaryotes, les phospho-sérines (pSer) représentent environ 86% des phosphorylations, les phospho-thréonines (pThr) environ 12% et les phospho-tyrosines (pTyr) environ 2% (131).

Bien que la phosphorylation des tyrosines soit minoritaire, celle-ci joue un rôle majeur dans différentes fonctions cellulaires, dont la prolifération, la différenciation, l'adhésion, la réponse aux hormones et les défenses immunitaires (132). L'émergence des mécanismes de signalisation liés à la phosphorylation des tyrosines auraient eu une fonction essentielle dans l'apparition des premiers métazoaires multicellulaires (133-136). L'état de phosphorylation des protéines dépend des kinases et des phosphatases

qui, respectivement, fixent et hydrolysent un groupement phosphate sur leurs substrats. Cette phosphorylation est reconnue par divers modules de reconnaissance, le plus important d'entre eux étant le domaine SH2.

La phosphorylation des tyrosines existe déjà au sein des procaryotes mais est très peu développée, avec en moyenne une seule protéine tyrosine kinase (PTK) par espèce. Ces kinases ne sont cependant reliées à celles des eucaryotes ni en séquence, ni en structure, et elles ont un mécanisme enzymatique différent (137-139). Certains travaux montrent par ailleurs que « d'anciennes » familles de serine/thréonine kinases, notamment au sein des champignons, sont capables de phosphoryler des tyrosines (140, 141).

Des protéines tyrosines phosphatase (PTP) homologues de celles eucaryotes se trouvent en très faible nombre au sein des procaryotes et des levures. Ces PTP ont un rôle fonctionnel limité dans les voies de signalisation telles que celle des MAP kinases (142). Elles ont néanmoins pu jouer un rôle essentiel pour contrebalancer l'action des kinases précédemment décrites. De plus, la présence de phosphatases spécialisées pour les tyrosines a pu exercer une pression sélective et permettre l'apparition d'une nouvelle classe de protéines kinases spécifiques des tyrosines (132).

Les domaines de reconnaissance SH2 ont été identifiés dans des organismes tels que la levure ou des myxomycètes mais leur nombre augmente significativement dans le génome de l'espèce *Monosiga brevivollis* (143). Une autre étude génomique a notamment identifié dans cet organisme la première apparition de PTK, orthologue de celles présentes chez les métazoaires (136, 144). *Monosiga brevivollis* est l'organisme unicellulaire le plus proche des métazoaires, du point de vue de l'évolution. La présence dans cet organisme d'un système de signalisation des pTyr aussi complexe que celui observé chez les eucaryotes suggère donc que la phosphorylation des pTyr à participé à l'émergence des organismes multi-cellulaires.

En ce qui concerne le génome humain, on y décompte 518 kinases (145) et 211 phosphatases (146, 147). Alors qu'on aurait pu s'attendre à un nombre équivalent de ces deux types d'enzymes afin de contrebalancer leurs effets pour réguler de manière fine la transduction du signal au sein de la cellule, cette différence peut s'expliquer par le nombre de combinaisons d'holoenzymes que les serine/thréonine phosphatases (PSP) peuvent former à partir de sous-unités catalytiques et de nombreuses sous-unités régulatrices (148). Si on s'intéresse uniquement aux enzymes spécifiques des pTyr, leur

nombre est quant à lui comparable, car il y a 90 PTP (dont 81 constitutivement actives) et 108 PTK (dont 85 constitutivement actives) (149).

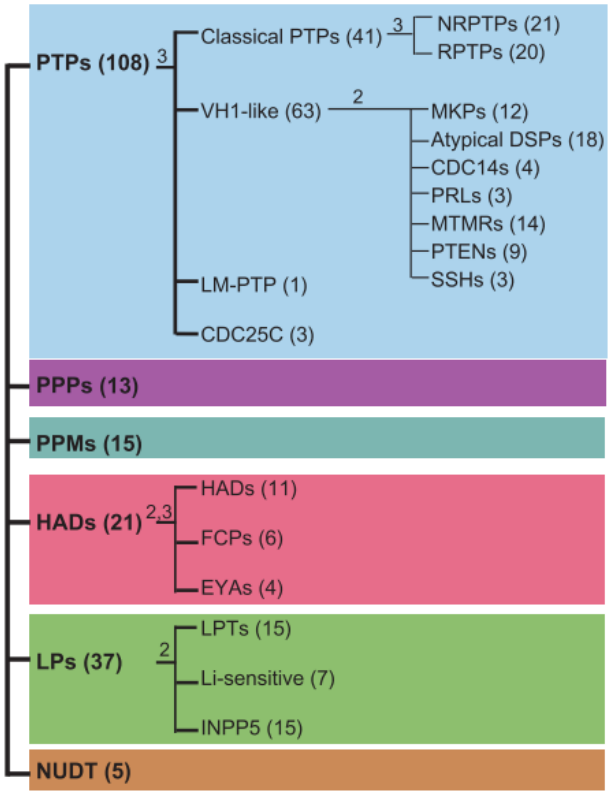


Figure 08 : Classification des phosphatases
Les phosphatases sont divisées en six familles, d'après la classification InterPro de leur domaine catalytique. Chaque famille est sous-divisée en différentes classes en fonction de leurs spécificités de substrats. Le nombre de phosphatases de chaque famille ou classes est indiqué entre parenthèses. D'après Sacco *et al* (2012) (146)

Contrairement aux kinases, issues d'un ancêtre structural commun, les phosphatases ont des origines distinctes et sont réparties en six principales familles qui diffèrent du point de vue de leur séquence, de leur structure et possèdent des mécanismes enzymatiques distincts : les lipides phosphatases (LP), les NUDIX phosphatases (NUDT), les phospho-protéines phosphatases (PPP), les protéines phosphatases métal-dépendantes (PPM), les haloacides déshalogénases (HAD) et les protéines tyrosine phosphatases (PTP) (Figure 08) (146, 149, 150).

2) Classification des Tyrosine Phosphatases

Les protéines tyrosine phosphatases constituent la plus grande des six familles, en terme de nombre. Elles sont réparties en quatre classes selon leurs séquences et leurs préférences vis a vis du substrat (Figure 09) (149).

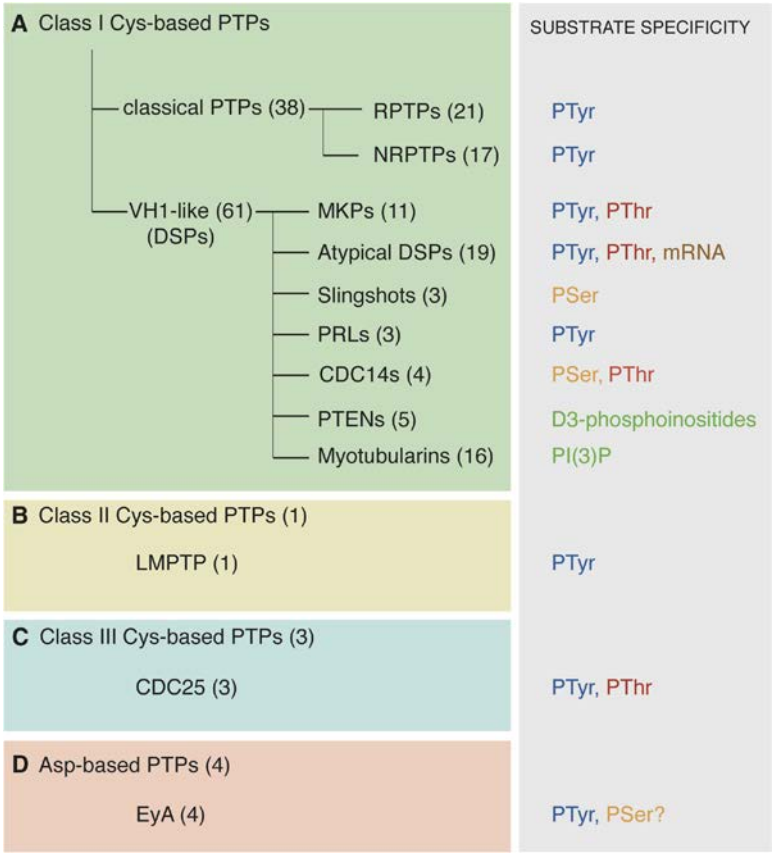
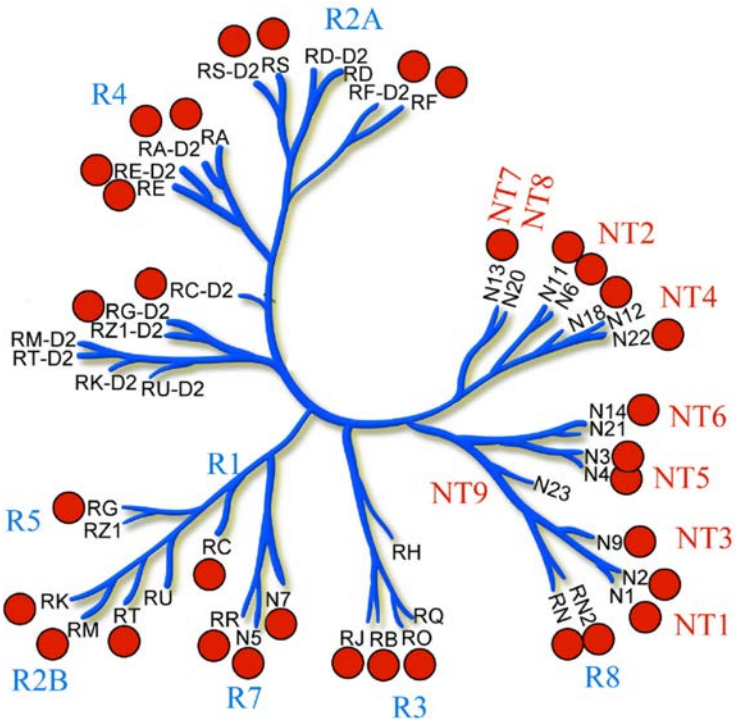


Figure 09 : Classification et spécificité de substrat des PTP.
Le code couleur des familles des PTP est le suivant : Les PTP à cystéine de classe I (vert), les PTP à cystéine de classe II (Jaune), les PTP à cystéine de classe III (bleu) et les PTP à acide aspartique (rose pale). La spécificité de substrats de chaque classe ou sous-groupe est listée à droite. D'après Alonso *et al*, (2004) (149).

Les PTP à cystéine de classe I :

Cette première classe est de loin la plus grande des quatre puisqu'elle comprend 104 des phosphatases sur un ensemble de 112. Elles présentent une grande diversité de reconnaissance de substrats, partagent un ancêtre structural commun et possèdent toutes un mécanisme catalytique qui repose sur une cystéine réactive (PTP à cystéine). Ces PTP à cystéine sont réparties en deux groupes, les PTP classiques strictement spécifiques aux pTyr et les PTP à double spécificité, les DSP :

- Les PTP classiques regroupent les PTP receptor-like (RPTP) transmembranaires et les PTP cytosoliques ou non receptor-like (NRPTP). Sur la base d'une étude phylogénétique, d'alignements de séquence et selon la nature des séquences adjacentes aux domaines catalytiques, les RPTP ont été subdivisées en huit sous-groupes (R1à R8) et les NRPTP en neuf sous-groupes (NT1 à NT9) (figure 10).



<u>Figure 10 :</u> Arbre phylogénique des protéines tyrosine phosphatases classiques.
Elles sont groupées en PTP réceptrices (R1-R8) et PTP non réceptrices (NT1-NT9). Les abréviations de l'organisation du génome humain pour le nom des gènes sont utilisées dans cet arbre phylogénique (HUGO: http://www.genenames.org/). Adapté de Barr *et al* (2009) (167).

- Les DSP regroupent un ensemble de PTP avec des substrats très divers, allant de l'ARN messager (ARNm) aux phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate (PI3P) en passant par les D3-phosphate des phosphatidylinositol-3-phosphate (151), les pSer ou encore les pThr.

Les PTP à cystéine de classe II :

La deuxième classe des PTP est composée d'une seule protéine, la *Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase*. Elle est représentée dans l'ensemble des branchements phylogéniques y compris les plantes, les procaryotes et les archées. Elle se caractérise par un poids moléculaire inférieur à toutes les autres PTP (18kDa) (152) et sa structure est similaire à celle des arsenates réductases bactériennes de *Bacillus subtilis* (153). Son rôle physiologique n'a pas encore été clairement établi (154).

Les PTP à cystéine de classe III :

Cette troisième classe est composée de trois phosphatases cdc25 qui auraient évolué en détournant la fonction de sulfurtransférase des domaines rhodanèses (155). Elles ont la même topologie que ces domaines (156) et ont une double spécificité vis à vis des pTyr et des pThr. Ces phosphatases ont une fonction dans la régulation du cycle cellulaire (157, 158) et dans le contrôle de l'apoptose (159).

Les PTP à acide aspartique:

Cette dernière classe diffère des trois précédentes par son mécanisme catalytique. L'hydrolyse du groupement phosphate est dépendante de la présence d'un ion magnésium et repose sur un acide aspartique nucléophile. Du fait de cette particularité, ces protéines appartiennent également à une autre famille d'enzyme : les « Haloalkanoic Acid Dehalogenase » (HAD) (160). Les quatre protéines *Eyes Absent* (EyA) qui composent cette classe sont spécifiques des pTyr et pSer. Elles sont impliquées dans l'organogenèse, notamment pour le développement embryonnaire des yeux chez la drosophile (161) et celui des muscles, des reins, des oreilles et de la thyroïde chez la souris (162-164).

3) Structure des Tyrosine Phosphatases « classiques »

Ces différentes classes de protéines auraient convergé vers une fonction commune de phosphatase tout en conservant leurs architectures « ancestrales ». Cette convergence

est illustrée par la présence de motifs structuraux communs à l'ensemble de ces quatre classes de phosphatases, qui ne possèdent pas la même topologie structurale. Nous ne traiterons dans la suite de ce manuscrit que de la première classe, les PTP classiques non réceptrices.

A. Le domaine PTP

Le domaine catalytique des PTP classiques est constitué de 250 à 290 résidus. Son repliement est composé d'un cœur de 8 brins β, fortement déformés et entourés par six hélices α (Figure 11a) (165). La superposition des structures des PTP classiques illustre la très bonne conservation du repliement tertiaire de ces protéines (figure 11b).
Le site catalytique est situé dans une crevasse d'environ 9Å de profondeur lui conférant sa sélectivité pour les substrats contenant des phospho-tyrosines (166).

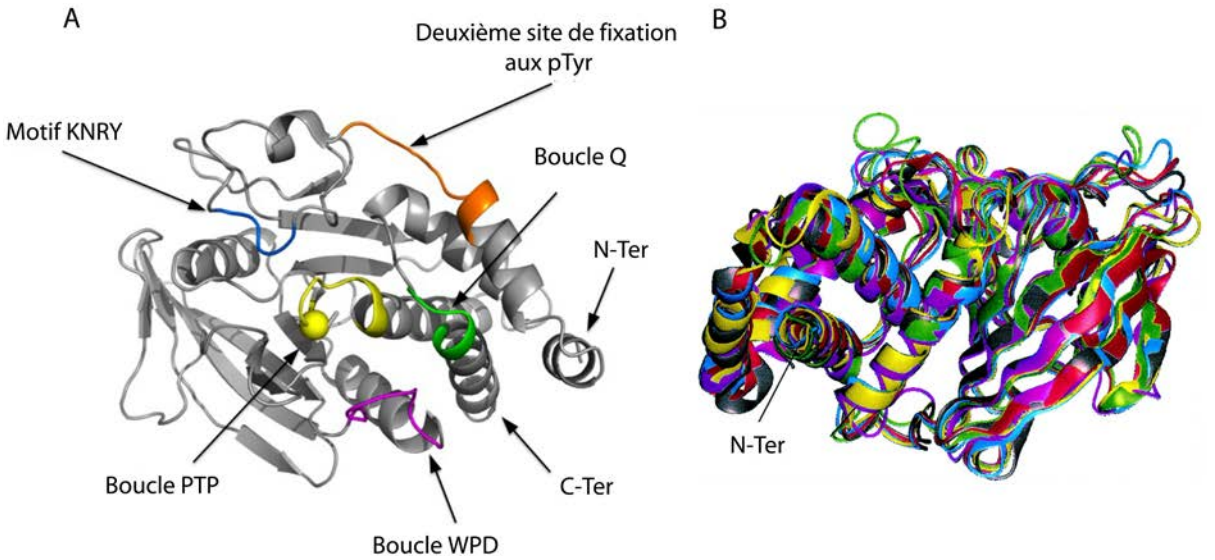


Figure 11 : Eléments structuraux clés des PTP
(A) Représentation en ruban de la structure de PTP1B (PDB : 2HNP). La boucle WPD est en position ouverte (violet). La boucle P est en jaune, avec la cystéine réactive indiquée par une sphère. (B) Superposition de structures cristallines de domaines phosphatases réceptrices et non-réceptrices dans leur conformation ouverte. PTPN1 (magenta), PTPN6 (vert), PTPN11 (jaune), RPTPα (gris), RPTPμ (rouge) et LAR (bleu). Adapté de Barr *et al* (2009) et d'après Andersen *et al* (2001) (167, 168).

B. Caractéristiques structurales

Suite aux premiers séquençages des tyrosine-phosphatases, plusieurs motifs d'acides aminés, caractéristiques des PTP, ont été identifiés grâce à leur très forte conservation (168, 169). Un alignement des séquences de la famille des PTP classiques humaines est présenté en Annexe n°1.

a. La boucle PTP (Motif n°9)

La boucle PTP, ou boucle P, est le motif caractéristique des tyrosine-phosphatases. Cette séquence H**C**$(X)_5$**R**(S/T) contient des résidus essentiels pour l'activité catalytique de l'enzyme. La cystéine est essentielle pour la catalyse de la phospho-tyrosine tandis que l'arginine stabilise les différentes étapes intermédiaires de la catalyse. Cette boucle est le motif le plus important du site actif de l'enzyme. Elle est située au fond de la poche catalytique.

b. Le motif de reconnaissance des phospho-tyrosines (Motif n°1)

Ce motif est nommé par les acides aminés qui le composent, KNRY. Il détermine la spécificité de l'enzyme pour les phospho-tyrosines pour deux raisons :

- Il définit la profondeur de la poche catalytique et ne permet donc pas aux résidus plus courts, tels que les pSer et pThr, d'atteindre le site catalytique (la boucle PTP) au fond de la cavité.
- Sa tyrosine interagit avec le cycle aromatique de la phospho-tyrosine du substrat et le stabilise lors de la catalyse.

c. La boucle WPD (Motif n°8)

La boucle WPD, du nom des trois résidus qui la composent, est un autre élément clé dans la catalyse du substrat. La fixation du substrat au site actif induit un déplacement d'environ 10Å du résidu aspartique grâce au mouvement de l'ensemble de la boucle

WPD qui passe d'une position ouverte à une position fermée (170). La boucle WPD est catalytiquement compétente lorsqu'elle adopte une conformation fermée.

d. La boucle Q (Motif n°10)

La boucle Q est définie par le motif QTXXQYXF. Ce motif structural se trouve à l'intérieur de la poche catalytique et y joue un rôle crucial lors du mécanisme catalytique. L'importance des deux glutamines de ce motif est soulignée par leur très forte conservation (> 90%) au sein d'une région variable.

e. Et bien d'autres motifs …

D'autres motifs conservés ont été identifiés dans l'ensemble des PTP humaines. Ils font partie pour la plupart du coeur hydrophobe et sont impliqués dans le maintien de l'intégrité structurale de la phosphatase (168). (Annexe n°1)

4) Mécanisme catalytique

Les quatre principaux motifs précédemment décrits sont importants dans la famille des PTP car ils participent tous de manière différente et complémentaire aux étapes de la catalyse du substrat. Ce mécanisme catalytique se décompose en deux étapes (171) :

- La première étape consiste en l'hydrolyse du groupement phosphate du substrat et à son transfert sur l'enzyme (Figure 12). Lors de la fixation du substrat, le motif KNRY participe à la reconnaissance de la phospho-tyrosine. Le groupement phosphate du substrat est alors stabilisé par la cystéine, l'arginine et un ensemble de liaisons hydrogène établies avec les groupements amides de la boucle PTP (172). Le groupement phosphate subit alors une attaque nucléophile par l'atome de soufre Sγ du thiolate de la cystéine. Simultanément, la fixation du substrat provoque la fermeture de la boucle WPD. L'aspartate de cette boucle alors à proximité de la pTyr agit comme un acide et protone le groupement hydroxyle de la tyrosine et permet la liaison covalente du groupement phosphate à la cystéine de la phosphatase. Suite à cette étape, le substrat est libéré de l'enzyme. La

catalyse passe ainsi par une étape intermédiaire de phospho-enzyme où la cystéine de la boucle PTP est liée covalemment à un groupe phosphate (173).

- La seconde étape est l'hydrolyse de l'intermédiaire cystéinyl-phosphate. La glutamine N-terminale de la boucle Q stabilise une molécule d'eau, dont le proton sera accepté par l'acide aspartique de la boucle WPD, aidant ainsi la conversion de la phospho-Cys vers son état de Cys-S$^-$. L'enzyme libre est ainsi régénérée et le phosphate inorganique libéré (166, 174).

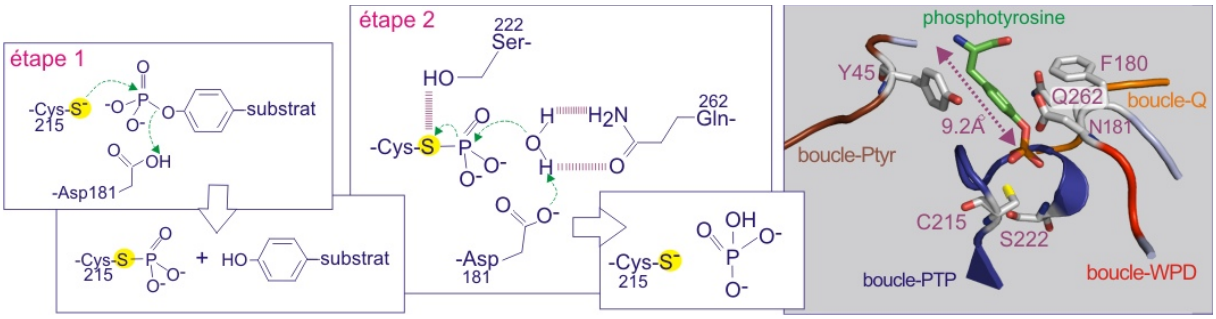


Figure 12 : Mécanisme catalytique des PTP.
La numérotation des acides aminés est celle de la protéine PTP1B. Etape n°1 : formation de l'intermédiaire cystéinyl-phosphate. Etape n°2 : hydrolyse de l'intermédiaire cystéinyl-phosphate. Case de droite : positionnement du substrat phospho-tyrosine dans la poche catalytique. D'après : http://www.ulysse.u-bordeaux.fr/atelier/ikamer/biocell_diffusion/gbb.cel

Le mécanisme catalytique des PTP est un bon exemple du concept d'« *induced-fit* », dans lequel le changement conformationnel de la boucle WPD induit par la fixation du substrat rend l'enzyme compétente pour la catalyse. L'efficacité catalytique des PTP est dépendante de la dynamique d'ouverture et de fermeture de la boucle WPD. L'étude menée récemment par Whittier *et al*, montre de manière intéressante que la vitesse de fermeture de la boucle WPD vers sa position compétente est comparable à la vitesse de clivage du groupement phosphate du substrat (175).

5) Spécificité et régulation des PTP classiques

La constante de Michaelis (K_M) des PTP classiques pour un pTyr libre est environ 10 000 fois supérieure à celle d'un substrat peptidique (176). L'interaction entre les résidus adjacents de la pTyr dans la séquence du substrat et les résidus du PTP contribuent alors à l'interaction et l'affinité des substrats protéiques. De plus, ces résidus encadrant la pTyr jouent un rôle dans la spécificité de l'interaction avec les PTP (167).

A. Spécificité intrinsèque du domaine PTP

a. Surface électrostatique

Contrairement à la structure tertiaire conservée des NRPTP, la nature des résidus à leur surface est très diversifiée. Ainsi, l'ensemble de la surface des NRPTP est variable à l'exception de quelques zones à proximité du site catalytique (Figure 13) (167). Ces zones conservées à la surface sont constituées de la boucle KNRY et des glutamines de la boucle Q (Figure 13, zones A et C). A noter que la boucle WPD n'est pas à la surface de la protéine (zones D).

À l'inverse, les zones variables autour du site catalytique sont formées par les deux résidus suivant le motif KNRY (zone B) et par la seconde poche de fixation aux pTyr (zone F et chapitre suivant) qui participe à l'interaction vis à vis de certains substrats (167).

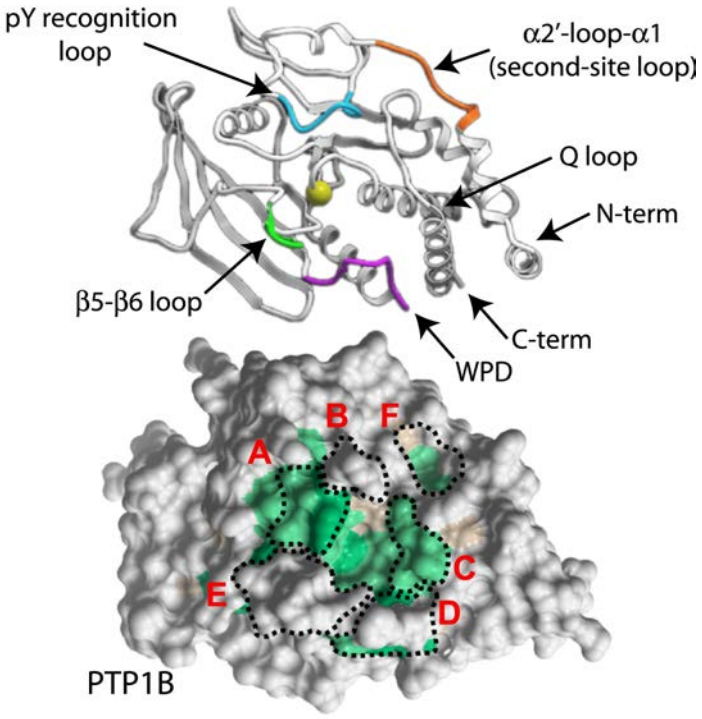


Figure 13 : Conservation des résidus à la surface des phosphatases.
(A) Diagramme en ruban de PTP1B avec les motifs clés.
(B) Les résidus conservés des NRPTP sont reportés à la surface de PTP1B. Le code couleur est le suivant : vert pour les résidus fortement conservés ; marron clair pour les résidus dont les propriétés sont conservées ; gris pour les résidus non conservés. Adapté de Barr *et al* (2009) (167).

Cette diversité de surface des NRPTP donne lieu à une hétérogénéité du potentiel électrostatique de surface (149). Elle s'observe non seulement entre les sous-groupes de PTP mais également au sein d'un même sous-groupe (figure 14). Cette propriété pourrait participer à la reconnaissance des substrats ou à l'association avec des protéines régulatrices (167).

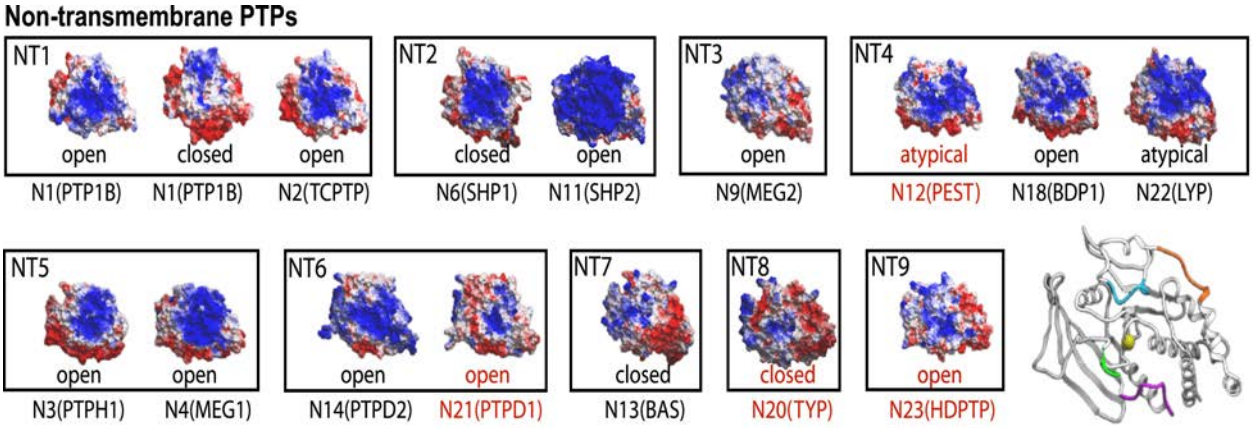


Figure 14 : Diversité du potentiel électrostatique de surface de NRPTP.
Le potentiel électrostatique est représenté à la surface des NRPTP. Les structures cristallographiques sont en noir et les modèles par homologie sont en rouge. Les couleurs de surface couvrent une échelle de ±3 kcal/volts (+3= bleu ; -3= rouge). La position de la boucle WPD est indiquée sous chacune des structures de NRPTP. Le potentiel électrostatique de surface est influencé par les conformations, ouverte ou fermée (open/closed), de la boucle WPD (comparaison de PTP1B ouvert/fermé) mais sur une très faible surface. D'après Barr *et al* (2009) (167).

b. Deuxième poche de fixation au pTyr

Une deuxième caractéristique dans la reconnaissance de partenaires est la présence d'un deuxième site de fixation des pTyr, situé à proximité du site actif (Figure 15). Ce site fut identifié pour la première fois dans PTPN1 (177). Il permet à cette phosphatase d'être spécifique du segment activateur de la kinase IRK (Insulin Receptor Kinase) possédant deux tyrosines phosphorylées successives (178).

L'identification d'une poche similaire dans les autres NRPTP est difficile et repose non seulement sur la conservation des résidus équivalents à l'arginine 24 et 254 et des résidus 258-259 de PTPN1, mais également sur la topologie de la cavité (Annexe 1) (178, 179). De plus, la conformation de la boucle reliant les hélices α2 et α1 est cruciale

car elle permet la fixation d'une deuxième pTyr lorsqu'elle adopte une conformation partiellement en hélice α (Figure 11). Une étude structurale a classé les PTP classiques en cinq groupes, sur la base de la conservation des résidus clés, de la topologie de la cavité ainsi que la conformation de la boucle α2 et α1 (Annexe 2) (167). Ce classement montre que neuf des dix-sept NRPTP font partie de la même classe que PTP1B et devraient également être capable de fixer une deuxième pTyr.

Cette seconde poche d'interaction participe à la spécificité d'interaction avec différents partenaires du fait de ces différences entre PTP (179).

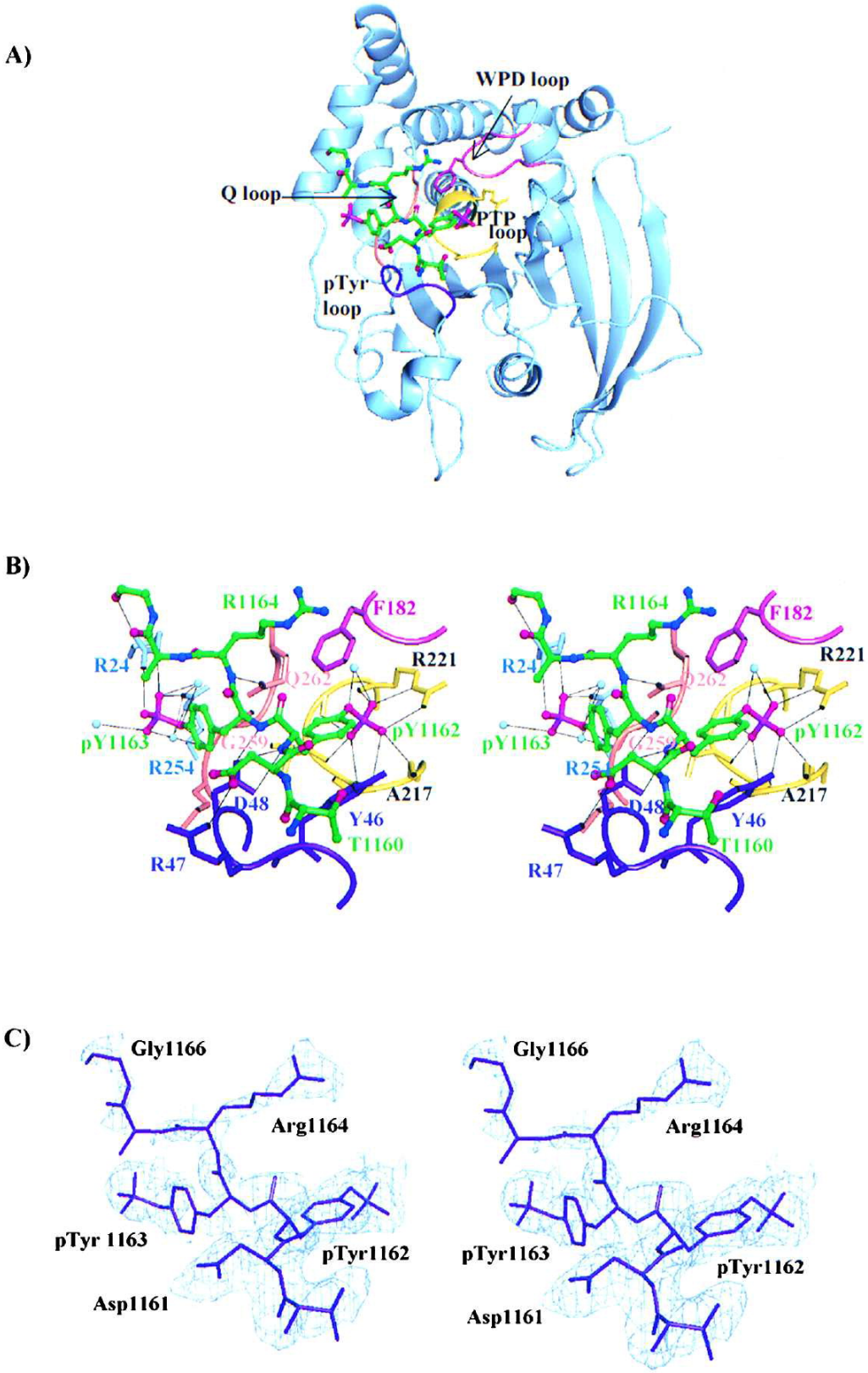


Figure 15 : Structure de la phosphatase PTPN1 en complexe avec un peptide IRK biphosphorylé.

(A) Vue globale du complexe. La boucle PTP (residus 215–222) est colorée en jaune, la boucle WPD (residus 179-185) en marron, la boucle KNRY (residus 45–49) en violet et la boucle Q (residus 258–262) en rose. (B) Vue en stéréo montrant les détails de l'interaction entre le peptide IRK biphosphorylé et PTP1B. (C) Illustration de la carte de densité 2Fo-Fc, à un niveau de 1 σ, du peptide IRK. D'après Salmeen *et al* (2000) (178).

c. Modifications post-traductionnelles des NRPTP

Les NRPTP peuvent être sous le contrôle de diverses modifications post-traductionnelles. Par exemple, PTPN22 peut être phosphorylée sur la sérine 35, ce qui altère sa capacité à inactiver les kinases de la famille Src et à inhiber les voies de signalisation TCR. Cette phosphorylation pourrait contrôler la conformation de l'hélice α2 de PTPN22, et par là même la topologie d'une deuxième poche d'interaction avec des partenaires (180).

D'autres types de modifications post-traductionnelles, telles que la sumoylation, la protéolyse ou encore l'oxydation peuvent contrôler la fonction des NRPTP (181-183). La protéine PTPN1 est un bon exemple pour illustrer comment une phosphatase peut être soumise au contrôle d'un ensemble de modifications post-traductionnelles (Figure 16) qui conditionnent les partenaires recrutés et les voies de signalisation activées ou réprimées (184).

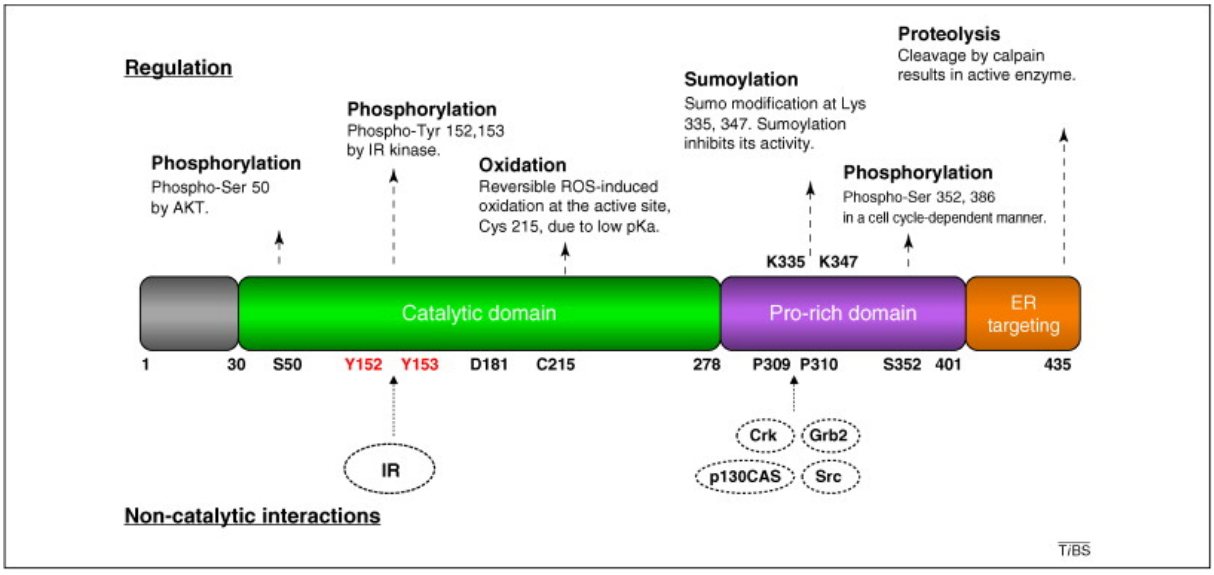


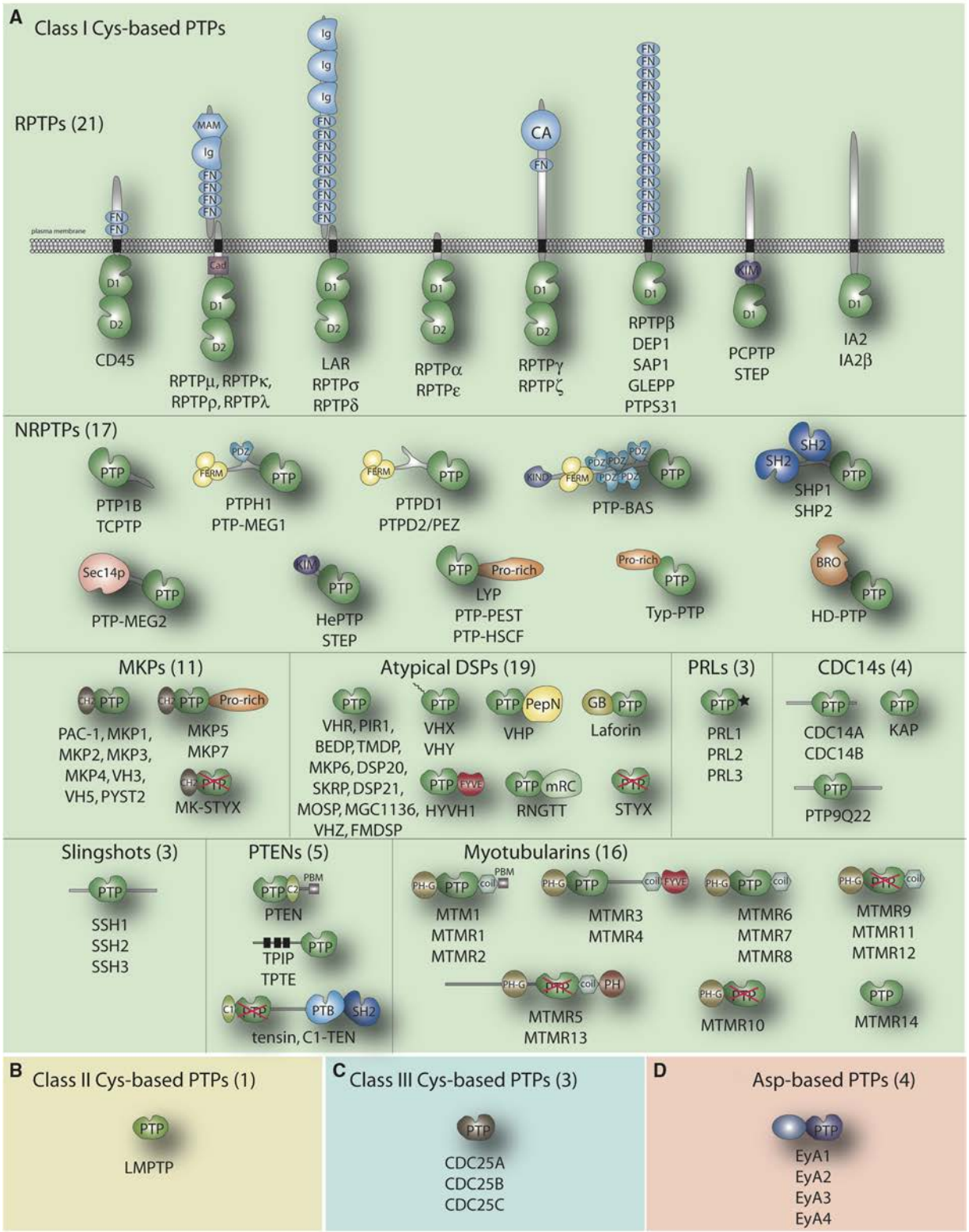
Figure 16 : Organisation modulaire de PTPN1 et ses modifications post-traductionnelles. Illustration schématique de la composition en domaines et motifs de PTP1B. Elle est composée d'un domaine catalytique N-terminal (vert), de deux motifs Pro-rich (violet) et d'un motif C-terminal de localisation au réticulum endoplasmique (ER) (orange). PTP1B est régulée par la phosphorylation de Y_{152} et Y_{153}, par la phosphorylation de certaines sérine indiquées, par l'oxydation de la C_{215} du site catalytique, par la sumoylation de lysines au niveau des motifs Pro-rich et par la protéolyse du motif signal du RE par la calpaïne. D'après Yip *et al* (2010) (184).

B. Rôle des séquences adjacentes

L'ensemble des caractéristiques précédemment détaillées participe à la spécificité des domaines NRPTP vis-à-vis de leurs partenaires. Pour exemple, PTPN1 et PTPN2 sont deux NRPTP qui, malgré leurs fortes similitudes de séquences (72% de similarité pour leur domaine catalytique), reconnaissent des partenaires cellulaires différents, avec pour conséquence des fonctions biologiques distinctes (101, 185-188).

En plus des caractéristiques propres à chaque domaine PTP, les fonctions biologiques des tyrosine-phosphatases sont définies par leurs localisations cellulaires, leurs activités ou le recrutement de partenaires. Ces propriétés vont dépendre de séquences adjacentes au domaine catalytique. Parmi les 107 PTP, 79 possèdent des séquences adjacentes (Figure 17)(149). Il est intéressant de constater que la totalité des 38 PTP classiques en contient. Ces séquences adjacentes sont soit des motifs de reconnaissance, soit des domaines d'interaction.

Figure 17 : Vue schématique de la composition de tous les membres de la famille PTP
Abréviations : BRO, baculovirus BRO homology; C1, protein kinase C conserved region 1; C2, protein kinase C conserved region 2; CA, carbonic anhydrase-like; CAAX box, farnesylation signal; CH2, cdc25 homology region 2; CRAL/TRIO, cellular retinaldehyde binding protein/trio homology (Sec14p homology); FERM, band 4.1/ezrin/radixin/moesin homology; FN, fibronectin-like; FYVE, Fab1/Yotb/Vac1p/early endosomal antigen-1 homology; Ig, immunoglobulin-like; KIM, kinase interaction motif; KIND, kinase N lobe-like domain; MAM, meprin, A2, RPTPμ homology; PBM, PDZ binding motif; PDZ, postsynaptic density-95/discs large/ZO1 homology; PH, pleckstrin homology (including GRAM domains); PTB, phosphotyrosine-binding domain; SH2, src homology 2; SH3B, src homology 3 domain binding motif; SH4, src homology 4 (myristylation signal).coil, coiled-coil domain; GB, glycogen binding; mRC, mRNA capping; PBM, PDZ binding motif; pepN, N-terminal peptidase- like; PH-G, pleckstrin homology-"GRAM" domain; Pro-rich, proline-rich; Sec14, Sec14p homology (or CRAL/TRIO). Un rectangle noir représente un segment transmembranaire et une croix rouge sur un domaine PTP signifie que le domaine catalytique est *a priori* inactif. D'après Alonso *et al* (2004) (149)


A
Class I Cys-based PTPs
RPTPs (21)
plasma membrane
CD45
RPTPμ, RPTPκ,
RPTPρ, RPTPλ
LAR
RPTPσ
RPTPδ
RPTPα
RPTPε
RPTPγ
RPTPζ
RPTPβ
DEP1
SAP1
GLEPP
PTPS31
PCPTP
STEP
IA2
IA2β
NRPTPs (17)
PTP1B
TCPTP
PTPH1
PTP-MEG1
PTPD1
PTPD2/PEZ
PTP-BAS
SHP1
SHP2
PTP-MEG2
HePTP
STEP
LYP
PTP-PEST
PTP-HSCF
Typ-PTP
HD-PTP
MKPs (11)
PAC-1, MKP1,
MKP2, MKP3,
MKP4, VH3,
VH5, PYST2
MKP5
MKP7
MK-STYX
Atypical DSPs (19)
VHR, PIR1,
BEDP, TMDP,
MKP6, DSP20,
SKRP, DSP21,
MOSP, MGC1136,
VHZ, FMDSP
VHX
VHY
VHP
Laforin
HYVH1
RNGTT
STYX
PRLs (3)
PRL1
PRL2
PRL3
CDC14s (4)
CDC14A
CDC14B
KAP
PTP9Q22
Slingshots (3)
SSH1
SSH2
SSH3
PTENs (5)
PTEN
TPIP
TPTE
tensin, C1-TEN
Myotubularins (16)
MTM1
MTMR1
MTMR2
MTMR3
MTMR4
MTMR6
MTMR7
MTMR8
MTMR9
MTMR11
MTMR12
MTMR5
MTMR13
MTMR10
MTMR14
B
Class II Cys-based PTPs (1)
LMPTP
C
Class III Cys-based PTPs (3)
CDC25A
CDC25B
CDC25C
D
Asp-based PTPs (4)
EyA1
EyA2
EyA3
EyA4

a. Localisation cellulaire

Ces séquences adjacentes jouent un rôle dans la localisation cellulaire des phosphatases, restreignant ainsi leur accès à des substrats situés dans des compartiments intracellulaires ciblés. Le motif signal C-terminal de la protéine PTPN1, majoritairement composé de résidus hydrophobes, est responsable de l'ancrage de la protéine au réticulum endoplasmique (189). Cette caractéristique conditionne une de ses fonctions biologiques, à savoir la déphosphorylation du récepteur à insuline (190-192).

Certains domaines d'interactions sont également responsables de la compartimentalisation cellulaire des PTP. Le domaine d'interaction au cytosquelette et à la membrane FERM, présent dans PTPN4, PTPN3 et PTPN13 est responsable de la présence de ces phosphatases à la membrane (193). Autre exemple, Le domaine SEC14 interagit avec les lipides membranaires et permet de ce fait à la phosphatase PTP-MEG2 de se localiser au niveau des vésicules de transport (194, 195). Enfin, le domaine BRO1 est impliqué dans le ciblage des protéines à l'endosome et fait de PTPN23 une protéine centrale dans le transport endosomal (196, 197).

b. Recrutement de partenaire

Divers motifs de reconnaissance de protéines sont présents au sein des NRPTP. Les motifs riches en proline trouvés dans près de la moitié des NRPTP interagissent avec les domaines SH3 de partenaires (198). La reconnaissance du motif Pro-rich de PTPN5 par le domaine SH3 de P130 ^{cas} permet l'interaction des deux protéines. En l'absence de ce motif, l'interaction des deux protéines est fortement diminuée, ainsi que la déphosphorylation de p130 ^{cas} (199).
Un autre motif, celui de reconnaissance aux kinases, KIM (*Kinase Interaction Motif*) s'insère dans une poche d'interaction présente dans différentes kinases et procure à PTPN5 et PTPN7 leur spécificité pour les MAPK (200-202).

Les domaines d'interaction protéine-protéine associés aux phosphatases participent de la même manière au recrutement de partenaires présentant des motifs consensus. Ainsi, la famille des phosphatases SHP, PTPN6 et PTPN11 (SHP1 & SHP2) est caractérisée par la présence de deux domaines SH2 qui permettent le recrutement de protéines contenant des phospho-tyrosines (203). Malgré une même organisation modulaire, ces deux protéines ont des fonctions cellulaires différentes qui proviennent du recrutement de partenaires différents (204).
Enfin, trois PTP sont associées à des domaines PDZ qui participent à la reconnaissance de leurs partenaires, et de ce fait aux voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées (205-207). Ces domaines PDZ et leurs rôles dans les PTP seront traités plus en détail dans un prochain chapitre de cette introduction.

c. Régulation directe

En plus de participer à la localisation cellulaire et au recrutement de partenaires, ces motifs ou domaines avec lesquels les PTP sont combinées peuvent également réguler directement l'activité catalytique des phosphatases.

Un cas des plus intéressants est celui des domaines SH2 de la famille des SHPTP qui, en plus de leur fonction de recrutement de partenaires, régulent de manière compétitive l'activité catalytique du domaine phosphatase. En effet, ces enzymes ont un état basal auto-inhibé où la poche catalytique de la phosphatase est obstruée par un des domaines SH2 (109). La fixation d'un ligand sur un ou les deux domaines SH2 lève l'inhibition et permet de rétablir, au moins partiellement, l'activité catalytique de la phosphatase (208-210). D'un point de vue structural, le ligand induit la réorientation des domaines SH2 et libère l'accès de la poche catalytique aux substrats (211). L'état auto-inhibé est crucial pour le rôle physiologique de ces phosphatases. En effet, des mutations identifiées chez des patients atteints du syndrome de Nooman, perturbent le contrôle de l'activité de l'enzyme. Ce syndrome, maladie génétique répandue (1:2000 cas chez les nouveaux nés), cause de nombreux troubles tels que des cardiopathies congénitales ou des déformations du thorax (118, 119, 212). Des mutations de PTPN11 sont responsables de ce syndrome dans environ 50% des cas. Elles se situent dans ou autour du domaine SH2

N-terminal qui obstrue la poche catalytique du PTP. Elles peuvent ainsi, soit faciliter l'activation de l'enzyme par un ligand pTyr, soit lorsqu'elles sont situées à l'interface avec le domaine catalytique, déstabiliser la conformation auto-inhibitrice et induire une conformation basale auto-activée en l'absence de stimulus (Figure 18) (213-217).

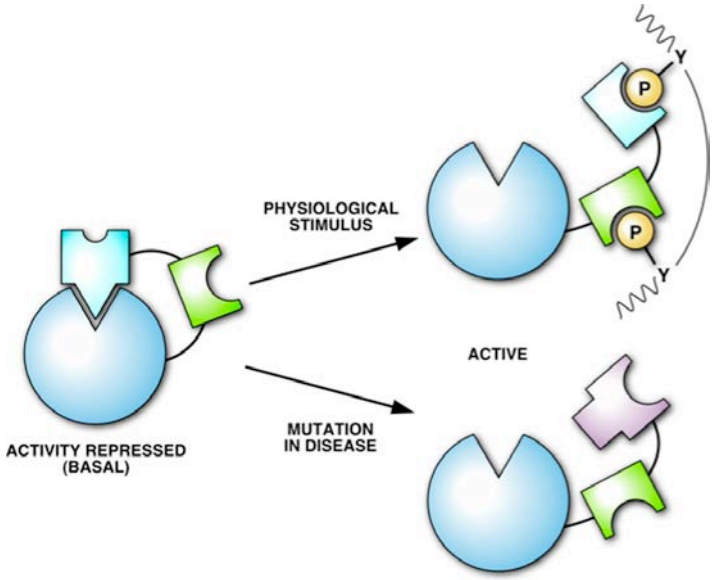


Figure 18 : Mécanisme d'activation de la protéine PTPN11.
Dans l'état basal de PTPN11, le site catalytique est obstrué par des interactions intramoléculaires avec son domaine N-SH2. La phosphatase peut-être activée soit par le recrutement de ligands par les domaines SH2, soit par des mutations au niveau du domaine N-SH2 ou du domaine PTP situées à leur interface (215). D'après Tonks *et al* (2013) (147)

Un autre type de régulation de l'activité catalytique des phosphatases a été décrit pour PTPN1. La fixation d'un dérivé de benzbromarone sur cette phosphatase bloque la boucle catalytique WPD dans une position ouverte inactive. Cet inhibiteur non-compétitif interagit avec une poche de régulation allostérique située à environ 20 Å du site catalytique formé par les hélices α3 et α6. L'inhibiteur bloque l'interaction d'une hélice atypique (α7) située en C-terminal du domaine phosphatase avec la poche de régulation allostérique (α3-α6) (Figure 19) (218). Des études de mutants et de dynamique moléculaire ont démontré l'importance de cette hélice α7 dans le maintien de l'activité catalytique de PTP1B (219).

L'implication d'une poche de régulation allostérique similaire au sein des autres NRPTP est très peu étudiée à ce jour. Quelques indices laissent à penser que cette

caractéristique n'est pas unique à PTP1B. Dans PTPN13, l'hélice α0, située en N-terminal du domaine PTP a une position équivalente à celle de l'hélice α7 de PTP1B et sa suppression diminue également l'activité catalytique de la phosphatase (220).

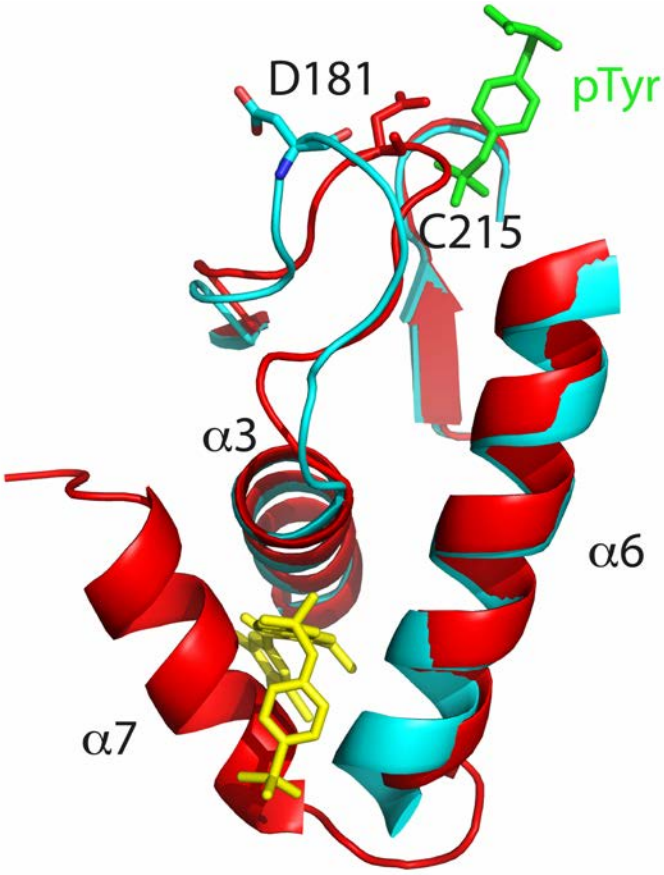


Figure 19 : Régulation allostérique de la protéine PTPN1
La fixation d'un inhibiteur allostérique sur PTPN1 bloque sa boucle catalytique WPD dans une conformation ouverte inactive. Illustration de la structure de PTPN1 (bleu) en complexe avec l'inhibiteur 3-(3,5-dibromo-4-hydroxy-benzoyl)-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonic acide 4-sulfamoyl-phenyl)-amide (appelé « composé 2 » dans Wiesmann et al, 2004) (PDB code 1T49) superposée à la structure de PTPN1 en complexe avec un substrat pTyr (PDB code 1PTV). Seuls les éléments de structure impliqués dans l'inhibition allostérique sont représentés. En présence de l'inhibiteur allostérique (jaune), la partie C-terminale de PTPN1 est désordonnée, alors qu'en son absence et en présence d'un substrat pTyr (vert) dans la poche catalytique elle adopte une structure en hélice-α (α7). La fixation de l'inhibiteur empêche l'interaction entre α3, α6 et α7, ce qui prévient la fermeture de la boucle WPD. D'après Tabernero *et al* (2008) (221).

6) Vers une nouvelle vision des phosphatases

Une vision « historique » décrivait les phosphatases comme des enzymes peu spécifiques vis-à-vis de leurs substrats. Le très haut degré de similarité des séquences entourant le site actif des phosphatases leur a valu cette étiquette, au point d'être classées comme « undruggable » par les industriels (222). L'ensemble des études menées à ce jour sur les phosphatases apporte un regard nouveau sur ces enzymes dont la spécificité de reconnaissance de substrats et leur catalyse peuvent être soumises à de multiples régulations, comme nous venons de le voir.

Par ailleurs, les mutations présentes au sein des phosphatases sont impliquées dans de plus en plus de pathologies comme certains cancers avec PTPN3, PTPN13, PTPN14, PTPN6 et PTPN11, des maladies auto-immunes telles que la maladie de Graves, le diabète de type 1 ou l'arthrite rhumatoïde qui impliquent PTPN22, et différents syndromes comme ceux de Nooman ou LEOPARD, dans lesquels des mutations de PTPN11 jouent un rôle (143, 214, 223-228).

L'élucidation des mécanismes qui impliquent ces PTP dans des pathologies devient un enjeu de santé publique grandissant. De nombreuses PTP restent à caractériser, particulièrement en ce qui concerne le rôle de leurs domaines autres que catalytiques dans les fonctions cellulaires. Ceci permettrait d'améliorer notre compréhension des voies de signalisation des cellules et de donner naissance à de nouvelles pistes « thérapeutiques ».

Notre étude de PTPN4 s'inscrit dans cette perspective d'une meilleure compréhension de la régulation des PTP, notamment *via* les domaines PDZ qui demeurent peu étudiés à ce jour dans le contexte des phosphatases.

CHAPITRE III - LES DOMAINES PDZ



e domaine PDZ est un module d'interaction protéine-protéine qui a été identifié au début des années 1990. Il fut d'abord nommé domaine GLGF en référence au motif GLGF conservé dans une boucle de ce domaine (229). Il a ensuite pris le nom de « domaine DHR » (**D**isc large **H**omology **R**epeat) en référence à la protéine Dlg (*Drosophila melanogaster* Disc large protein) dans laquelle il fut étudié (230) avant d'être finalement appelé domaine PDZ (231) initiales de trois protéines dans lesquelles il a été identifié: **P**SD-95 (protéine impliquée dans la signalisation dans la densité post-synaptique), **D**lg et **Z**O-1 (Zonula occludens 1) (229, 232, 233).

Les domaines PDZ se trouvent majoritairement au sein des protéines des métazoaires bien que quelques occurrences se relèvent chez les levures, les bactéries et les plantes, suggérant une origine lointaine (234-237). Néanmoins, la fonction de domaine d'interaction protéine-protéine est remise en doute pour les domaines PDZ identifiés chez S. cerevisiae et S. pombe en raison d'une faible similarité de séquences avec ceux d'origine métazoaire (238).

Dans le génome humain, les domaines PDZ sont particulièrement répandus avec 270 domaines présents dans 150 protéines différentes où ils sont présent en 1 à 13 copies (239, 240). Ceci en fait l'un des domaines les plus abondants chez l'homme (Tableau n°2). Les protéines contenant des PDZ sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que le maintien de la polarité cellulaire (241), la migration cellulaire (242), la régulation des jonctions cellulaires (243), la transduction du signal dans les neurones (244), les processus auditifs et visuels (245) ou encore le contrôle de l'homéostasie cellulaire (246). Les PDZ sont majoritairement localisés dans le cytoplasme des cellules.

Nom des domaines	Motif de reconnaissance	Nombre identifié	références
Bromo	$_{Ac}$Lys	42(56)	(247)
FERM	PIP	30(50)	(248)
PDZ	Peptide C-terminal	150(270)	(50)
SH2	$_{p}$Thr	110(120)	(249)
SH3	Pro-rich	217(296)	(250)
WW	Pro-rich	44(65)	(251)

Tableau 2 : Occurrence de différents domaines dans le génome humain
Pour chaque type de domaine, le motif de reconnaissance est indiqué suivi du nombre de protéines composées d'au moins un de ces domaines et entre parenthèses le nombre total de domaine identifié dans le génome humain.

1) Structure

La première structure tridimensionnelle d'un domaine PDZ - libre et en interaction avec un ligand - a été obtenue en 1996. Aujourd'hui, on dénombre 373 structures de PDZ (dont 215 humaines) dans la protéine data Bank (Janvier 2014).

Les domaines PDZ sont globulaires, compacts et composés de 80 à 100 résidus. Leurs parties N- et C-terminales sont proches l'une de l'autre et situées sur la face opposée au site de fixation du ligand. Le repliement se compose de six brins antiparallèles β (β1-β6) et de deux hélices α (α1 et α2) (figure 20). La boucle située entre les brins β1 et β2 est composée du motif conservé $X\Phi_1G\Phi_2$ (où X est n'importe quel acide aminé et Φ est un acide aminé hydrophobe) qui permet la fixation du carboxyle du partenaire (252). Elle est aussi communément appelé boucle GLGF, nom correspondant à la séquence la plus largement représentée du motif $X\Phi_1G\Phi_2$ (figure 20).

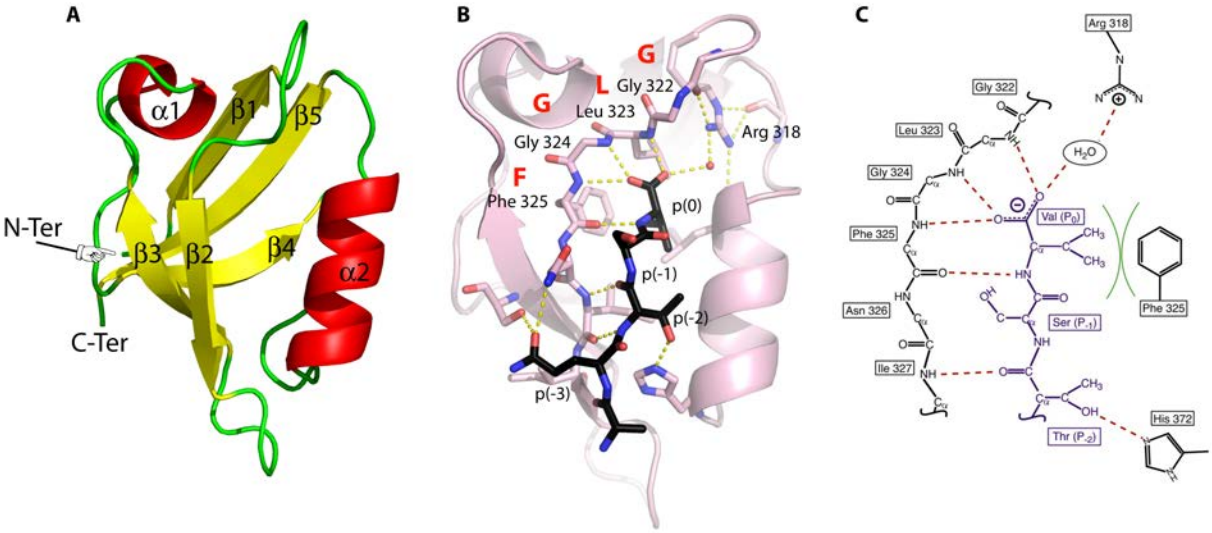


Figure 20 : Structure des domaines PDZ et leur interaction avec un PBM.
(A) Structure du troisième domaine PDZ de PSD-95. Les hélices-α sont en rouge et les brin-β sont en jaune (Code PDB : 1BE9). (B) Structure et détail moléculaire du complexe du PDZ-3 de PSD-95. Le peptide est en noir et le domaine PDZ en rose. Les atomes d'oxygène sont en bleu, ceux d'azote en rouge et la sphère rouge correspond à une molécule d'eau. (C) Représentation schématique de la poche de reconnaissance du peptide en noir, le peptide est en bleu. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés rouges et les interactions hydrophobes sont indiquées par des arcs verts. Adapté de Harris *et al* (2001) (27, 238)

2) Mode d'interaction

La découverte des interactions des derniers résidus carboxyles de canaux potassiques et des sous-unités NR2 du récepteur NMDA avec des domaines PDZ de PSD95 a révélé la fonction des domaines PDZ en tant que modules d'interaction protéine-protéine (253, 254). Ces études ont établi la fonction la plus commune des PDZ : la reconnaissance d'une courte séquence située en C-terminal des protéines cibles.

A. Interactions canoniques des domaines PDZ

Par convention, l'acide aminé C-terminal du ligand est en position p(0), ceux en amont sont numérotés de manière décroissante de p(-1) à p(–n). La séquence de reconnaissance du domaine PDZ est communément nommée PBM pour « *PDZ Binding Motif* ».

a. Description de l'interaction canonique PDZ-ligand

Initialement, le motif reconnu par les domaines PDZ était décrit comme une courte séquence de trois acides aminés (253, 254). Bien que peu de temps après, la résolution de la structure du domaine PDZ3 de PSD-95 montra que les quatre derniers résidus du ligand participaient à l'interaction (figure 20) (27), un peptide de seulement trois acides aminés est suffisant pour interagir avec un domaine PDZ.

Le PBM se fixe dans un sillon étendu formé par le brin β2 et l'hélice α2 du domaine PDZ. Il forme un brin β intermoléculaire ; les amides et les carbonyles des liaisons peptidiques du ligand établissant ainsi un réseau de liaisons hydrogène avec le brin β2 du PDZ (255).

- La chaine latérale du résidu p(0) de nature hydrophobe s'insère dans une cavité formée par les résidus hydrophobes de la boucle GLGF, de l'entrée du brin β2 et du C-terminal de l'hélice α2 (Figure 20) (27). La topologie de cette poche hydrophobe discrimine la nature du résidu p(0) du ligand en fonction de son encombrement stérique (256, 257). Le groupement carboxylate du PBM forme un réseau de liaisons hydrogène avec la boucle GLGF ainsi qu'avec une molécule d'eau stabilisée par la chaine latérale des résidus conservés arginine ou lysine située en amont du motif $X\Phi_1G\Phi_2$.
- La chaine latérale du résidu p(-1) est généralement orientée vers le solvant. Elle peut, dans certains cas, interagir avec les résidus du brin β2, voire du brin β3 (258-260).
- La chaine latérale du résidu p(-2) est en contact direct avec la chaine latérale du premier résidu N-terminal de l'hélice α2. La nature de ce résidu va être déterminante lors de la classification des PDZ.
- La chaine latérale du résidu p(-3) interagit avec des résidus situés sur les brins β2 et β3. La nature de ces derniers est variable d'un PDZ à un autre.

Dans la majorité des cas, la fixation du PBM induit peu de changements conformationnels du domaine PDZ. Par exemple, le rmsd (root mean square deviation)

sur les positions des carbones α est inférieur à 0, 9 Å entre la forme libre et complexée du PDZ3 de PSD-95 (27).

b. Classification des interactions PDZ-ligand

Les interactions des domaines PDZ avec leurs ligands ont donné lieu à de multiples classifications. La plus admise à ce jour comporte trois classes. Elle se base sur la séquence du ligand reconnu par le domaine PDZ et plus particulièrement sur la nature des résidus p(0) et p(-2) du PBM (Table 3) (261). Elle est basée sur différentes études d'interaction de domaines PDZ avec des librairies de peptides ou avec différents partenaires physiologiques (261, 262).

Classe	Séquence C-Terminale	Protéines partenaires	Protéines à domaine PDZ	Références
Classe I				
X-(S/T)-X-Φ$_{-COOH}$	E-S-D-V	GluN2A, B	PSD95 (PDZ-2)	(254)
	E-T-D-V	Canal de type Shaker K^+		(253)
	D-S-W-V	P0071 δ-catenin, ARVCF	Erbin	(263, 264)
	D-S-S-L	Récepteur β_2-adrenergique	NHERF ou EBP50	(265)
	Q-T-R-L	GKAP	Shank pr ProSAP	(266)
Classe II				
X-Φ-X-Φ$_{-COOH}$	E-Y-Y-V	Neurxin	CASK	(267)
	E-F-Y-A	Syndecan	CASK, Syntenine	(268, 269)
	S-V-E-V	EphB2	PICK1	(270)
	D-V-P-V	ErbB2	Erbin	(271, 272)
Classe III				
X-(D/E)-X-Φ$_{-COOH}$	V-D-S-V	Récepteur à Melatonine	nNOS	(273)
	G-E-P-L	KIF17	mLIN10 ou Mint1 ou X11	(274)

Tableau 3 : Classification des domaines PDZ en fonction de leur spécificité d'interaction avec des PBM C-terminaux. D'après Nourry *et al* (2003) (261).

- La classe n°1 des domaines PDZ reconnaît un motif consensus X-(S/T)-X-Φ-COOH avec n'importe quel acide aminé en p(-1) et p(-3), une sérine ou une thréonine en p(-2) et un hydrophobe en p(0). Les PDZ de cette première catégorie ont, en première position N-terminale de l'hélice α2, une histidine dont un azote du noyau imidazole forme une liaison hydrogène avec l'hydroxyle de la chaine latérale S(-2) ou T(-2) (27).
- Les domaines PDZ de classe n°2 ont pour séquence consensus du PBM X-Φ-X-Φ-COOH. À la différence de la première classe, on retrouve un résidu hydrophobe en p(-2). Les PDZ de cette deuxième catégorie possèdent un résidu de nature hydrophobe en première position N-terminale l'hélice α2 qui interagit préférentiellement avec le résidu hydrophobe en p(-2) du ligand (275).
- La classe n°3 a pour motif consensus X-(D/E)-X-Φ-COOH. La présence d'une tyrosine en première position N-Terminale de l'hélice α2 du PDZ favorise l'interaction avec des résidus anioniques, aspartate ou glutamate, en p(-2) du ligand (273).

Cette classification fut remise en cause à diverses reprises car elle ne prend pas en compte les acides aminés en amont de p(-2) (276-278). S'il est clair que les trois premiers résidus forment le motif essentiel à l'interaction, de plus en plus d'études montrent que des résidus en amont de la position p(-2) peuvent aussi être impliqués et modifier son affinité et sa spécificité (50, 279-281). Diverses études structurales impliquent ainsi des résidus jusqu'à la position p(-7) ou p(-11) du PBM (260, 282).

D'autres classifications plus détaillées ont ainsi été proposées pour caractériser les interactions PDZ/PBM. Une première analyse sur 82 PDZ (28 issus de Caenorhabditis elegans et 54 de Homo sapiens) répartit les domaines en 16 classes sur la base, cette fois-ci, des cinq derniers résidus (279). Une autre analyse sur 289 PDZ d'espèces différentes (<65% d'identité de séquences) a proposé une répartition en 25 classes en ne prenant compte que la nature de deux résidus clés des domaines, l'acide aminé en sortie de brin β2 et celui en première position N-terminale de l'hélice (283). Aucune étude ne converge cependant vers un classement universel des PDZ. Cette volonté de les catégoriser n'est à l'évidence plus adaptée, compte tenu de de la diversité des interactions des PDZ avec leurs cibles. Il existe par exemple des domaines PDZ capables

de reconnaître des PBM de différentes classes, tels que le PDZ-3 de Par-3, capable d'interagir avec des PBM de classes I et II ou le domaine PDZ de nNOS qui reconnait des PBM de classe II et III (275, 284, 285). En ce sens, une étude sur 157 domaines PDZ de souris et sur 217 peptides issus de ligands naturels conforte cette vision montrant que les domaines PDZ forment plutôt un continuum d'affinités et de spécificités avec leurs ligands (53).

c. Prédiction des interactions PDZ-PBM

Les analyses à grande échelle d'interactions PDZ-PBM qui ont participé à la classification des domaines PDZ ont également permis le développement d'outils de prédiction des séquences préférentiellement reconnues par chacun des domaines PDZ (53, 279). Ces outils de prédiction se basent soit sur des données de structures primaires (53, 286-288), soit sur des données structurales (289, 290) ou expérimentales, en phage display (279). Certains utilisent les deux types d'informations (290, 291).

La possibilité de prédire la séquence consensus de reconnaissance relative à chaque PDZ représente aujourd'hui un challenge important qui permettrait une meilleure compréhension du réseau d'interaction de ces domaines avec leurs partenaires, ainsi que de son évolution (292, 293). Il serait alors possible de mieux appréhender l'impact d'une mutation au sein d'un PDZ sur ses interactions avec d'autres protéines et son éventuelle implication dans une pathologie. Au-delà de la résolution de l'intéractome des PDZ, cela faciliterait la conception d'inhibiteurs spécifiques comme agents thérapeutiques ou encore permettrait de mieux comprendre la façon dont certains virus, codant pour des PBM, perturbent les voies de signalisation des cellules à leur profit (62, 97). Cependant, il s'agit d'un challenge très difficile au vu de la taille réduite des séquences reconnues, du nombre très important de PDZ et de PBM dans la cellule et des faibles affinités mises en jeu.

B. Modes d'interactions alternatifs

Les domaines PDZ, comme abordé dans la première partie de ce manuscrit, peuvent interagir avec des partenaires autrement que par le mode canonique d'interaction précédemment décrit. En effet, certains sont capables de reconnaitre des motifs de reconnaissances internes, de former des homo ou des hétéro-dimères ainsi que d'interagir avec des lipides.

a. Motif interne

Il existe aujourd'hui deux modes d'interaction démontrés entre un domaine PDZ et un motif interne à la séquence de la protéine partenaire. Le premier concerne l'interaction du domaine PDZ de la syntrophine avec la protéine nNOS. Cette dernière possède un domaine PDZ avec une extension C-terminale qui adopte une structure en épingle à cheveux et se loge dans la poche de fixation du domaine PDZ de la syntrophine (Figure 21) (294). Cette structure de nNOS mime la présence d'un résidu hydrophobe carboxyle terminal avec une phénylalanine interne et permet l'interaction. Le PDZ de la protéine nNOS forme alors avec le PDZ de la syntrophine un complexe PDZ-PDZ de type « *head to tail* ». La protéine nNOS interagit de la même manière avec le second domaine PDZ de PSD95 (295). Une étude menée par Brenman *et al* a démontré la relevance physiologique de l'association de ces protéines via leurs domaines PDZ (296, 297).

Le deuxième mode a été révélé plus récemment par Penkert *et al* avec le domaine PDZ de la protéine PAR6 qui reconnaît un motif interne de la protéine PALS1 (Figure 21). La structure cristallographique du complexe PAR6-PDZ/PALS1 montre que la boucle GLGF adopte une conformation atypique pour permettre la fixation du motif interne, (rmsd des atomes du squelette de 7 Å par rapport à la structure de PAR6-PDZ en interaction avec un PBM canonique C-terminal) (298).

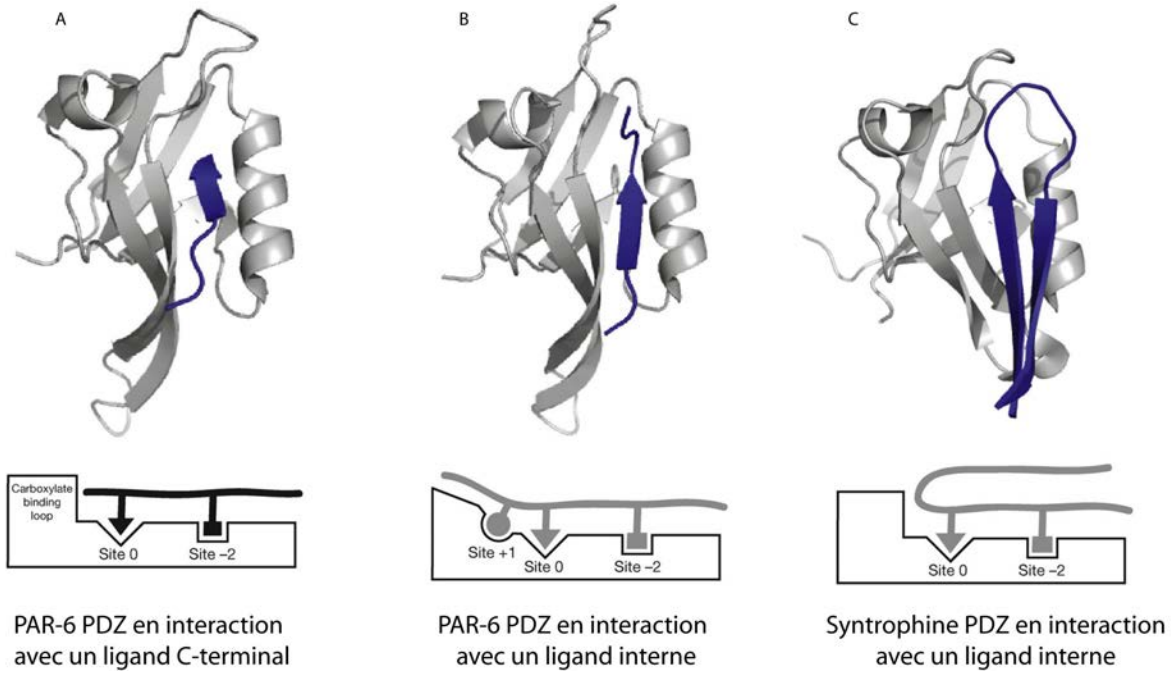


Figure 21 : Interaction des domaines PDZ avec un motif interne
Structure cristallographique et représentation schématique du mode d'interaction de domaines PDZ en complexe avec différents ligands C-terminaux ou internes. (A) Domaine PDZ de Par6 en complexe avec le peptide C-terminal VKESLV-$_{COOH}$ (PDB code 1RZX) (B) Domaine PDZ de Par6 en complexe avec un ligand interne de PALS1 (PDB code 1X8S) (C) Domaine PDZ de la Syntrophine en interaction avec un ligand interne de nNOS (PDB code 1QAV). Adapté de Penkert *et al* (2004) ; Ivarsson *et al* (2012) (298, 299).

Les descriptions d'interactions de domaine PDZ avec des motifs internes sont aujourd'hui rares, sans doute parce que l'identification de ces motifs est particulièrement difficile. Il est vraisemblable que ce mode d'interaction joue un rôle biologique important et soit décrit plus régulièrement à l'avenir (300). Une étude par des expériences de double-hybride chez la levure avec les domaines PDZ de *C. Elegans* indique que le nombre d'interaction de domaines PDZ avec des motifs internes de reconnaissance est aujourd'hui sous-estimée (301). La relevance biologique de ces interactions reste toutefois à démontrer.

b. Dimérisation

Un autre type d'interaction non canonique des PDZ est la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères. Plusieurs modes d'auto-association des PDZ ont été mis en évidence.

Une étude de Utepbergenov *et al*, montre que les protéines de la famille ZO (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) sont capables, *in vitro* et *in vivo*, de former des homo- ou des hétéro-dimères via leur domaine PDZ-2 (302). Les structures cristallographiques des homodimères des domaines PDZ-2 des protéines ZO-1 et ZO-2 montre un échange intermoléculaire des brins β2 du site de fixation, chaque domaine restant compétent pour l'interaction avec un PBM (Figure 22) (303, 304). Il est intéressant de noter que ce mode de dimérisation permet, *in vitro* et *in cellulo*, une interaction spécifique de ZO-1 avec la connexin-43 dont les résidus en amont de la position p(-3) du PBM interagissent avec une poche formée à la surface de dimérisation (289).
Dans un autre mode de dimérisation dit « back to back », les domaines PDZ dimérisent via la surface opposée au site d'interaction au PBM, ce qui laisse ainsi le site d'interaction au PBM accessible. Le domaine PDZ-6 de GRIP1 et celui de SHANK dimérisent de cette manière (Figure 22) (305, 306).
Pour finir, les domaines PDZ des protéines de la famille MAST ou de la protéine GRASP dimérisent *via* les brins β2-β3 de leur surface d'interaction (307, 308). Ces domaines PDZ restent néanmoins compétent pour la fixation à un PBM.

L'état d'oligomérisation des protéines via leur domaine PDZ peut dépendre de la fixation d'un PBM. Ainsi, la fixation d'un PBM au domaine PDZ de SHANK induit l'oligomérisation de la protéine *in vitro* et *in cellulo* (309). À l'inverse la protéine GRASP, en l'absence de ligand, forme des homo-diméres ou homo-tétramères dans le cytoplasme en fonction de sa concentration. L'ajout d'un ligand endogène de GRASP *in vitro* déplace l'équilibre oligomérique vers le monomère (308). De même, la fixation d'un ligand au domaine PDZ des protéines de la famille MAST favorise la forme monomérique (260).

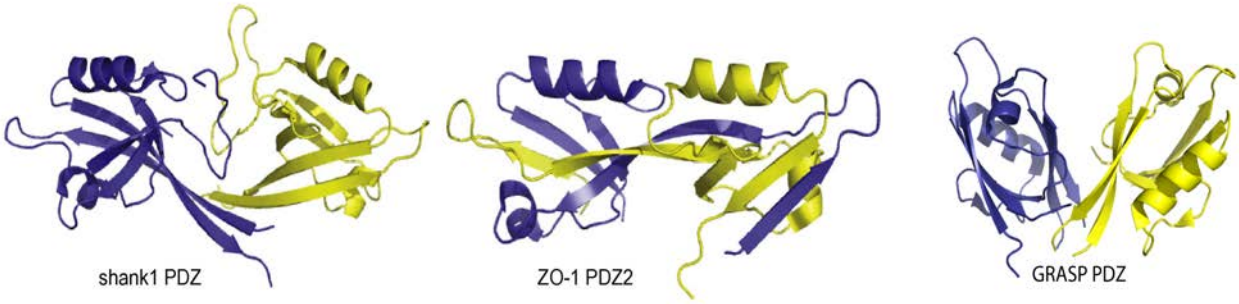


Figure 22 : Dimérisation des domaines PDZ.
(A) Structure cristallographique du domaine PDZ de Shank1 (code PDB 1Q3P). (B) Structure cristallographique du dimère du domaine PDZ2 de ZO-1 (code PDB : 2RCZ). (C) Structure cristallographique du domaine PDZ de GRASP (code PDB 2EG0). Adapté de Ivarsson *et al* (2012) (299).

Une étude à large échelle a permis d'évaluer la fréquence de ces interactions PDZ-PDZ *in vitro.* Des domaines PDZ de souris (157 sur un total de 240) (53) ont été testés sur micro-arrays pour leurs capacités à former des dimères. Cette étude montre que ~30% des domaines testés forment, en solution, un complexe avec des constantes de dissociation comprises entre 0,5 et 25µM (310). Ces résultats montrent que la dimérisation des PDZ pourrait être un mécanisme répandu dans la transduction du signal. Si peu de données *in vivo* viennent à ce jour étayer cette hypothèse (296, 303, 309, 311), elles représentent néanmoins un enjeu pour les années à venir (260).

c. Motif lipidique

En plus des substrats protéiques, les domaines PDZ sont capables d'interagir *in vitro* avec des substrats lipidiques, les phosphoinositides (PIP). Les domaines PDZ-1 et PDZ-2 de la synténine interagissent avec des PIP avec une constante de dissociation proche de 20µM. Les domaines PDZ provenant des protéines PTP-Bas, PAR-3 ou PICK1 interagissent avec des PIP_2 avec une affinité plus faible, comprise entre 30 et 90 µM (312). Plus récemment, les domaines PDZ-2 des protéines ZO-1 et ZO-2 ont été également décrits comme interagissant avec des PIP avec une constante de dissociation proche du micromolaire (K_D = 1-2 µM) (313).

Différentes études à grande échelle alliant approche *in vivo* et *in vitro* ont identifié davantage de domaines PDZ capables d'interagir avec des lipides, suggérant que ce mode d'interaction n'est pas marginal (314, 315). En effet, il a été récemment montré que, sur 70 PDZ humains testés, 40% ont une affinité sub-micromolaire pour des vésicules lipidiques (316). Ces affinités obtenues sont comparables à celles observées avec des domaines d'interaction lipidiques (317).

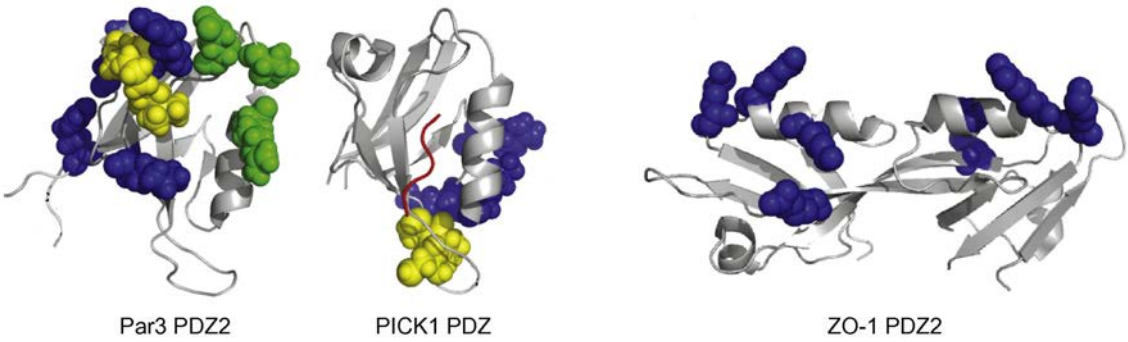


Figure 23 : Interaction des domaines PDZ avec des lipides
Les domaines PDZ interagissent avec les PIP de différentes manières. Le domaine PDZ2 de PAR-3 (Code PDB 2OGP) interagit à la fois avec les charges négatives des lipides grâce à des interactions électrostatiques non spécifiques (Bleu), en pénétrant dans la membrane (résidus impliqués en jaune) et *via* un site d'interactions au PIP (en vert) (314). Le domaine PDZ de PICK (Code PDB 2PKU) interagit avec les lipides membranaires *via* un motif conservé Cys-Pro-Cys (Jaune) et une surface chargée positivement (Bleu). Un PBM lié au domaine PDZ est indiqué en rouge. L'analyse de mutagénèse du PDZ2 de ZO-1 a identifié, au niveau de la surface d'interaction au PBM, des résidus basiques importants pour l'interaction avec des PIP (bleu) (313). D'après Ivarsson *et al* (2012) (299).

À ce jour, aucune structure de domaine PDZ en interaction avec des PIP n'est disponible. Des études d'interaction de PIP avec des mutants de PDZ indiquent cependant que la surface d'interaction avec les lipides est la même qu'avec les PBM (Figure 23) (312, 313, 318). De ce fait, la fixation des substrats lipidiques et peptidiques pourrait se faire de manière exclusive. Cette propriété pourrait avoir un rôle important dans la fonction biologique de ces PDZ où la fixation des substrats protéiques se ferait de manière compétitive aves les lipides de la membrane plasmique ou de différents organelles de la cellule (319). La relevance physiologique de ces interactions est aujourd'hui avérée. L'interaction des PDZ de la protéine Synténine-1 avec les PIP joue un rôle dans le recyclage des syndecanes (récepteurs transmembranaires), la propagation cellulaire et les mouvements directionnels chez le poisson zèbre (320, 321). Les domaines PDZ de la

protéine synténine-2 en interagissant avec des PIP nucléaires, impactent quant à eux la division ou la survie cellulaire (321).

Il est clair que des études plus approfondies sur l'implication de l'interaction des domaines PDZ avec les lipides sera nécessaire afin d'apprécier pleinement l'implication des PDZ dans les processus biologiques de la cellule.

3) Régulation des interactions

Les domaines PDZ sont au cœur du réseau de signalisation de la cellule. Ils recrutent des partenaires et forment des complexes multi-protéiques. Le nombre important de domaines PDZ dans le génome humain ainsi que le très grand nombre de ligands posent la question de la régulation de l'ensemble de ces interactions qui ont lieu au sein de la cellule. Cette question est d'autant plus importante lorsque l'on considère la redondance des courtes séquences PBM ainsi que le recouvrement de spécificité des domaines PDZ.

Le niveau d'expression des protéines est évidemment un facteur primordial de cette régulation. La concentration intracellulaire va ainsi contrôler, en fonction des affinités, les interactions avec des partenaires dans la cellule. La localisation cellulaire des protéines contenant des PDZ est également importante pour leur implication dans les différentes voies de signalisation cellulaires. Leur présence au niveau de la membrane en font des « médiateurs» privilégiés des protéines membranaires (e. g. canaux ioniques, récepteurs, etc …) (244, 322, 323). Les interactions des PDZ avec leurs cibles dépendent du contexte protéique. La présence de motifs ou de domaines adjacents à un domaine PDZ module leur fonction. Enfin, diverses modifications post-traductionnelles ou facteurs environnementaux peuvent intervenir dans la régulation des interactions des PDZ avec leurs ligands.

A. Affinité des interactions

L'affinité des interactions mettant en jeu des domaines PDZ avec des substrats peptidiques, lipidiques ou même des interactions PDZ-PDZ est de l'ordre du micromolaire (310, 316, 324). Ceci place les domaines PDZ dans la même gamme d'affinités que d'autres types de modules d'interaction tels que les domaines SH2, PTB ou SH3 (238, 325, 326). Cette affinité moyenne des domaines PDZ pour leurs ligands est adaptée à leur fonction de transduction et de régulation du signal. Cela implique des interactions transitoires entre les protéines, et une certaine modulation de la réponse en fonction des changements de signaux (327).
Le réseau de liaisons hydrogènes, formé lors de la liaison d'un PBM avec un domaine PDZ, joue un rôle essentiel dans l'affinité du complexe et plus particulièrement celles formées par le groupement carboxylate du PBM. Lorsque ce dernier est substitué par des groupements chimiques de natures diverses (amide, alcool, hydrazide ou encore méthyl-ester) l'affinité du complexe chute de façon conséquente (d'un facteur 20 à 100) (328, 329). On constate ainsi par titrage calorimétrique isothermal (ITC) que la contribution enthalpique, est majoritaire lors d'une interaction PDZ-PBM reflétant la contribution majeure des interactions polaires.

B. Modifications post-traductionnelles

Les interactions PDZ-PBM sont, au même titre qu'un très grand nombre d'interactions protéiques, sensibles aux modifications post-traductionnelles réversibles permettant une régulation efficace de la transduction du signal.

La phosphorylation d'un résidu au sein du PBM, ou en amont, peut diminuer ou supprimer l'interaction avec le domaine PDZ. La phosphorylation du résidu en p(-5) du PBM de LRP4 abolit l'interaction avec les domaines PDZ de PSD-95 et de SAP-97 (330). Celle du résidu en p(-2) du PBM de la sous-unité NR2B interfère avec la fixation avec PSD-95 et SAP102 (331). Un autre exemple la phosphorylation du résidu en p(-7) de ErbB2 empêche la fixation à un deuxième point d'ancrage au domaine PDZ de Erbin mais sans pour autant empêcher la fixation du PBM (282). Cette phosphorylation joue cependant un rôle important car une fois ErbB2 phosphorylée, elle n'interagit plus *in vivo* avec la protéine Erbin (332).

À l'inverse, la phosphorylation du PBM peut améliorer l'interaction avec un domaine PDZ. L'interaction du domaine PDZ de NHERF-1 avec la protéine MRP-2 est améliorée suite à la phosphorylation de la sérine en p(-3) du PBM de cette dernière (333).
La phosphorylation n'est s'ailleurs pas le seul exemple de modification post-traductionnelle qui régule des interactions PDZ - PBM. En effet, l'acétylation de la lysine en p(-2) du PBM de PTEN module l'interaction avec ses partenaires (334).

De la même manière que des modifications post-traductionnelles des PBM peuvent modifier l'interaction avec les PDZ, celles des domaines PDZ le peuvent également. La phosphorylation d'un résidu de l'hélice α2 du site d'interaction du domaine PDZ de Dlg-1 interfère, *in vitro* et *in vivo*, avec l'interaction du PBM de la sous-unité NR2A (Figure 24A)(335). De la même façon la phosphorylation d'une sérine dans la boucle GLGF du PDZ-2 de NHERF-1 diminue l'interaction avec les canaux CFTR ainsi que leur activité (336).

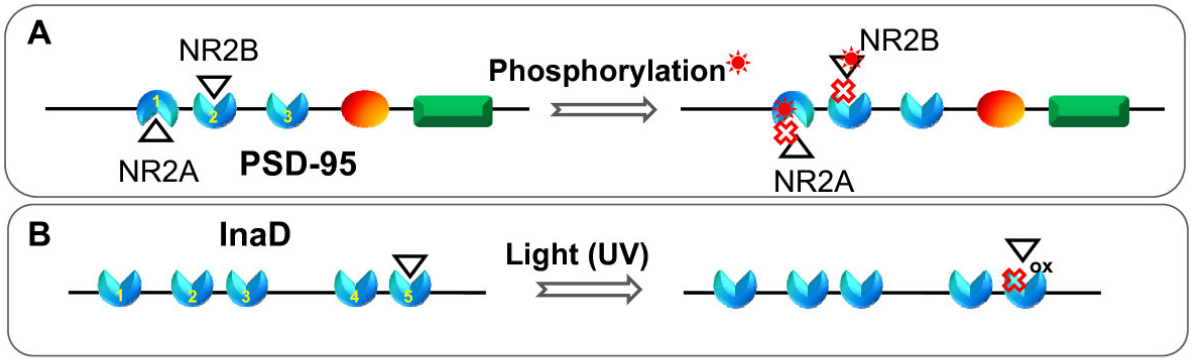


Figure 24 : Modifications post traductionnelles des PBM et des domaines PDZ qui modulent l'affinité des complexes PDZ/PBM.
(A) Inhibition de l'interaction des domaines PDZ de PSD-95 avec le PBM de NR2A et NR2B due à la phosphorylation du PBM ou du domaine PDZ (symbolisée par une croix). (B) Suppression de l'interaction du PDZ-5 de la protéine InaD avec un ligand par la formation d'un pont disulfure (=ox) dans la poche de fixation du PDZ-BS. D'après Lee *et al* (2010) (252).

C. Facteurs environnementaux

Les domaines PDZ sont également sensibles à divers facteurs environnementaux tels que des changements de pH ou de force ionique (337). Ces variations peuvent directement affecter la constante de dissociation de l'interaction d'un domaine PDZ avec son ligand en influençant principalement deux résidus conservés des domaines PDZ (338). D'une part, l'histidine située sur l'hélice α2 des domaines PDZ de classes I, qui

interagit avec une sérine ou une thréonine en position p(-2) du PBM, est sensible aux variations de pH. La protonation de ce résidu dans le cas du PDZ-3 de PSD-95 est responsable de l'augmentation de la constante de dissociation pour ses ligands à bas pH (338). D'autre part, l'arginine (ou lysine) située sur la boucle GLGF, qui stabilise une molécule d'eau participant à la fixation du PBM, interagit aussi avec un ion chlorure qui peut en cas de forte concentration entrer en compétition pour des ligands du PDZ-3 de PSD-95 (338). La relevance physiologique de cette interaction demeure incertaine.
De tels changements environnementaux peuvent se produire au niveau de la densité post-synaptique (localisation préférentielle de la protéine PSD-95) lors d'une hyperpolarisation du neurone ou d'une ischémie (339, 340).

Un autre facteur environnemental qui influence l'interaction PDZ-PBM est le potentiel redox intracellulaire. L'équipe de Ranganathan a montré que la protéine INAD, essentielle dans les cellules photo-réceptrices de la drosophile, possède un de ses domaines PDZ (PDZ-5) en deux conformations selon le potentiel redox. La conformation réduite adopte le repliement structural canonique des PDZ capable de fixer un PBM. La forme oxydée présente, quant à elle, une poche de fixation au ligand déformée en raison de la présence d'un pont disulfure intramoléculaire entre deux cystéines de l'hélice α2 et du brin β3 (Figure 24B). Cette étude montre que l'équilibre entre les deux conformations du PDZ-5 est dépendant de la lumière et participe au processus de la vision de la drosophile (341).

D. Allostérie des domaines PDZ

La fixation d'un PBM peut avoir des répercussions à longue distance à la surface d'un domaine PDZ (figure 25) (324, 342). Par exemple, La fixation d'un ligand au domaine PDZ2 de PSD95 perturbe les résidus des brins β3, β4 et de l'hélice α1 sans que ces derniers aient eu de contact direct avec celui-ci (342). Des outils informatiques ont été développés afin de mettre en évidence les résidus conservés qui pourraient participer à ces réseaux allostériques (343, 344). Des données expérimentales ont d'ailleurs étayé cette idée de communication allostérique à travers ces réseaux de résidus conservés (342, 345).

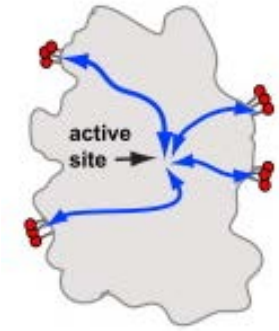


Figure 25 : Transfert d'informations à travers la structure tridimensionnelle.
Représentation schématique du phénomène d'allostérie avec les chemins énergétiques représentés par des doubles flèches bleues. Les surfaces distales, affectées par la fixation du substrat sont représentées avec des boules rouges. D'après Reynolds *et al* (2011) (345).

De tels mécanismes au sein de modules protéiques peuvent être un moyen de communication dans le transfert du signal à d'autres domaines en *cis* ou en *trans*. Ce signal peut se traduire par une modification de l'interaction ou de l'affinité du domaine « récepteur » avec un ligand (346). Plusieurs études ont mis en évidence une relation entre la dynamique du domaine PDZ et l'affinité du domaine PDZ pour son ligand (347-349). Pour certains d'entres eux cette relation est dépendante de la présence d'extensions supplémentaires au domaine PDZ en N- et/ou C-terminal.

E. Structures additionnelles

Le repliement canonique des domaines PDZ est composé de 5 brins-β et deux hélices-α. Cependant, comme nous venons de le voir, certains domaines PDZ présentent des extensions N- ou C-terminales. Ces extensions participent à la transduction du signal en modulant l'affinité des PDZ pour leurs ligands. Une analyse bio-informatique sur la base de prédiction de structures secondaires estime que ces extensions sont susceptibles d'être présentes dans environ 40% des domaines PDZ humains testés (107 sur 267 PDZ totaux) (240). Jusqu'à alors négligées lors des études de régulation des interactions des domaines PDZ avec leurs partenaires, elles sont de plus en plus étudiées. Ces extensions ont été décrites comme pouvant stabiliser les domaines PDZ, participer à des assemblages intra- et inter-moléculaires ou encore d'augmenter la surface d'interaction avec des ligands.

a. Extensions stabilisatrices

La présence de structures additionnelles dans certain domaine PDZ contribue à diminuer la dynamique intrinsèque du domaine PDZ et ainsi modifier ses propriétés d'interaction avec ses ligands.
Le domaine PDZ-3 de PSD95 illustre ce mode de régulation dans lequel une hélice C-terminale supplémentaire α3 interagit avec ses brins β2-β3 et diminue l'entropie du système en réduisant la flexibilité de ses chaines latérales, ce qui améliore d'un facteur 21 l'interaction avec son ligand CRIPT (348). Un cas similaire est rencontré pour le domaine PDZ-2 de NHERF1 qui possède une extension C-terminale structurée en « hélice-boucle-hélice » qui augmente la stabilité du domaine PDZ ainsi que l'affinité pour ses ligands (350).

b. Assemblage macromoléculaire

Ces extensions peuvent également jouer un rôle dans l'assemblage macromoléculaire d'une protéine. Par exemple, la protéine Par-6 possède un domaine PDZ qui a la capacité de fixer des PBM classiques mais également des motifs internes tel que Pals1. Ce domaine possède en N-terminal du brin β1, soit sur la face opposée au site d'interaction au PBM, une séquence de reconnaissance avec la protéine Cdc42. Lorsque cette protéine s'y fixe, elle entraîne une rigidification de zones hautement dynamiques du domaine PDZ ce qui a pour conséquence d'augmenter d'un facteur 13 son affinité pour ses ligands tels que Pals1 ou Par-3 (349, 351).
Ce domaine PDZ a également la capacité de fixer des PBM internes. Il est intéressant de noter que, *in vitro*, la fixation de ces motifs internes n'est pas régulée par la formation du complexe avec Cdc42. Ceci tiendrait de la conformation atypique de la boucle GLGF lors de son interaction avec un motif interne (298). L'assemblage macromoléculaire du domaine PDZ, via son extension, peut moduler l'affinité du domaine PDZ pour un seul type de ligand et ainsi aiguiller la protéine dans diverses voies de signalisation. En revanche, les travaux de Hurd *et al* montrent que, *in vivo*, l'interaction de Cdc42 avec le domaine PDZ de Par-6 module aussi la reconnaissance du motif interne Pals1 (352).

c. *Intégrité structurale multi-domaine*

Dans certains cas, le maintien de l'intégrité structurale du domaine PDZ est dépendant de la présence de structures supplémentaires. Le domaine PDZ-4 de GRIP isolé présente une poche d'interaction déformée et le PDZ-5 isolé est non structuré en solution. Ces deux domaines adoptent un repliement canonique uniquement lorsqu'ils sont exprimés en tandem (PDZ4-PDZ5). Cette intégrité structurale du tandem de PDZ est assurée par deux extensions structurales (353).
Les extensions peuvent également être indispensables pour former des interactions intramoléculaires avec un domaine adjacent. Ceci est observé pour une extension N-terminale en brin β qui permet l'interaction entre le PDZ-1 de l'harmonine et le domaine hélicoïdal N-terminal-1 (ND-1) (354).

d. *Augmentation de la surface d'interaction*

Certaines extensions ont aussi un rôle direct dans l'interaction avec des partenaires. Dans le cas de l'harmonine, l'extension N-terminale forme un deuxième point d'ancrage au PBM et améliore ainsi l'affinité et à la spécificité du domaine pour certains ligands capable d'interagir avec cette poche, tels que « sans » (354).

La famille des protéines MAGUK est caractérisée par la présence d'un « supramodule » PDZ-SH3-GuK, une entité structurale composée des domaines PDZ, SH3 et Guanylate kinase. Cette topologie fut décrite pour les deux protéines ZO-1 et DLG1 de la famille MAGUK (355, 356). La séquence hélicoïdale en C-terminal du domaine PDZ participe à l'orientation du domaine SH3 au sein du supramodule. Ce dernier est alors positionné en contrebas de la poche canonique de fixation au PBM et interagit avec le ligand du domaine PDZ en allongeant la surface d'interaction du PDZ. L'absence des deux autres domaines SH3 et Guk en aval du domaine PDZ diminue *in vitro* l'affinité du domaine PDZ pour ses ligands d'un facteur 10 (356).

Ces séquences additionnelles longtemps négligées peuvent ainsi tenir des rôles importants dans la régulation de la reconnaissance de partenaires des domaines PDZ. La prise en compte des résidus en amont et en aval des domaines PDZ est un point essentiel pour une meilleure compréhension de la régulation de ces domaines (50).

4) Assemblage multi-domaines

L'association de domaines PDZ entre eux ou avec d'autres domaines permet l'émergence de nouvelles propriétés fonctionnelles pour les protéines. L'étude indispensable de ces multi-domaines, notamment d'un point de vue structural, se heurte à de nombreux problèmes expérimentaux tant ils sont souvent difficiles à produire, et présentent fréquemment de fortes propriétés de flexibilité et des problèmes de stabilité.

A. Les tandems PDZ-PDZ

Une des caractéristiques des plus marquantes des domaines PDZ est la récurrence avec laquelle on les retrouve en plusieurs copies dans une même protéine. Parmi les protéines humaines contenant au moins un domaine PDZ, 30% en contiennent au moins deux, et 18% trois ou plus. La protéine MUPP1 est celle qui en contient le plus avec treize copies. Cette multiplicité au sein des protéines est plus élevée pour les PDZ que pour d'autres types de domaines de reconnaissance tels que les domaines SH2 ou SH3 (Figure 26).

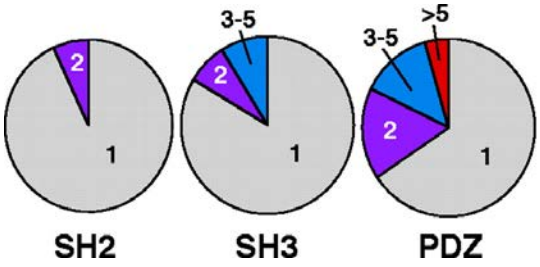


Figure 26 : Combinaisons en multiples copies de domaines dans les protéines humaines

Répartition des domaines de signalisation PDZ, SH2 et SH3 prédite par protéine par SMART (234). Les résultats sont classés selon que les protéines contiennent 1 (gris), 2 (violet), 3-5 (bleu), >5 (Rouge) copies d'un type de domaine. D'après Harris *et al* (2001) (238).

Cette multiplicité permet aux protéines composées de nombreux PDZ de former des plateformes d'interactions pour complexes multi-protéiques. Dans certaines de ces protéines, deux domaines PDZ s'associent pour former un tandem d'où émergent des

propriétés d'interaction propres, différentes de chacun des domaines PDZ isolés ou même de la simple somme des deux PDZ (357). Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'ils sont proches l'un de l'autre, séparés par un court linker. Ainsi, le tandem PDZ-1-PDZ2 de PSD95 interagit de manière synergique avec des ligands dimériques et/ou multimériques. En effet, il possède une meilleure affinité et spécificité vis à vis de partenaires tels que les récepteurs à NMDA ou les canaux à potassium (244, 358).

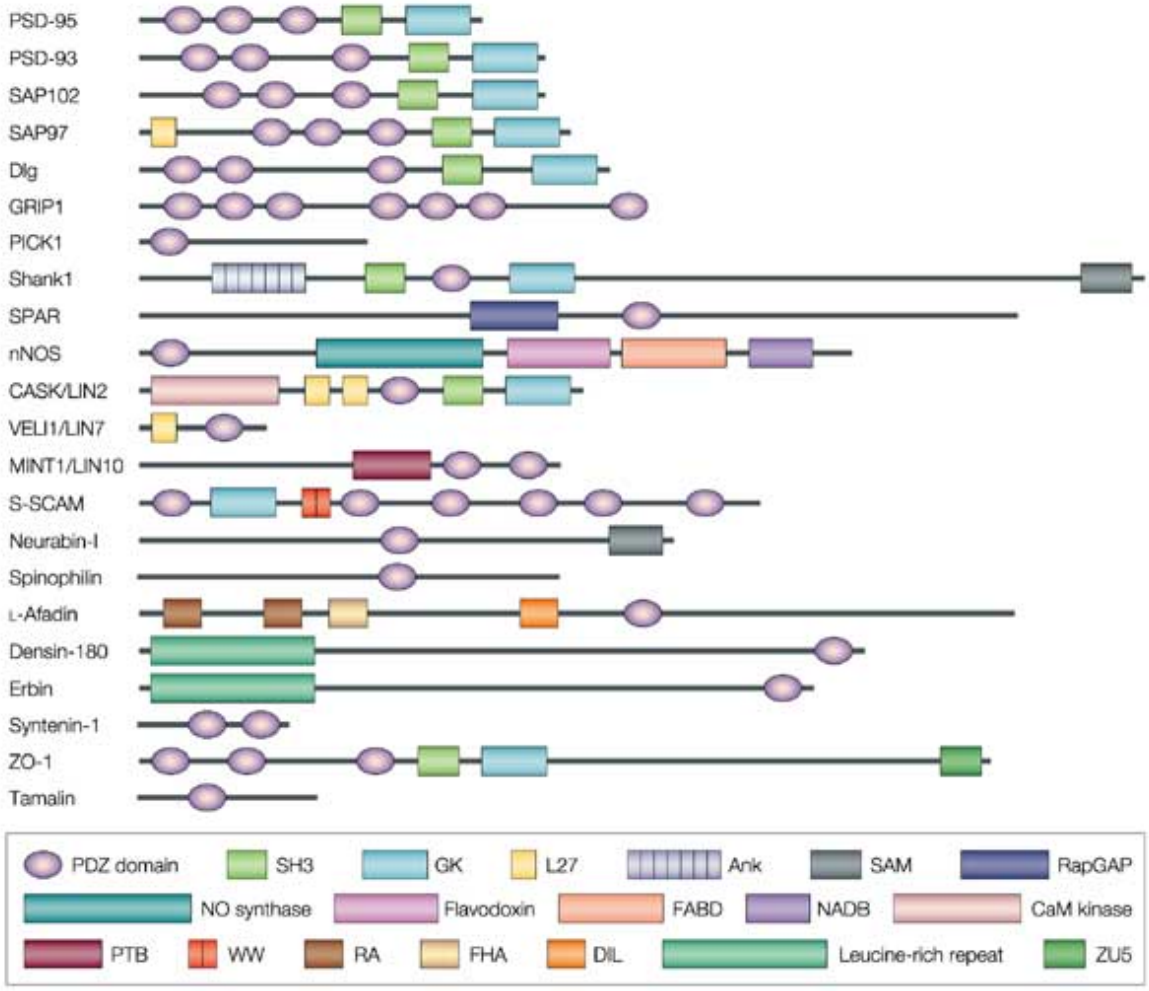
Le tandem PDZ2-PDZ3 de PAR-3, en fixant à la fois des PIP et le PBM de PTEN, protéine tyrosine phosphatase spécifique des PIP, est adapté pour le maintien du gradient de PIP dans les cellules polarisées tels que les neurones (314, 359).

Enfin, le tandem PDZ1-PDZ2 de la synténine en fixant à la fois des PIP de la membrane et des PBM de partenaires protéiques joue le rôle de lien entre les signaux de PIP et de protéines membranaires (244, 312, 360).

B. Les Supramodules de PDZ

On retrouve également au sein des protéines contenant des domaines PDZ une très grande variété de domaines de signalisation. D'après une analyse bioinformatique effectuée par SMART, environ 45% des protéines ayant des domaines PDZ contiennent au moins un autre type de domaine. Il peut s'agir de domaines de reconnaissance tels que PTB, PB1, DH, WW, FHA, SH3, PX, FERM, BRO1, LIM ou bien des domaines catalytiques comme des domaines PTP, protéases, Guk ou des Ser/Thr kinases (liste non exhaustive) (Figure 27). Cette hétérogénéité de domaines permet aux protéines d'interagir de manière polyvalente avec leurs partenaires et de participer de façon efficace à diverses voies de signalisation (19). Ces protéines présentent alors autant de points de régulation dans le système très complexe et imbriqué des voies de signalisation chez les organismes supérieurs.

Pour certaines de ces protéines, les domaines PDZ forment avec d'autres domaines des supramodules. Ils sont, au même titre que les tandems, des entités structurales distinctes qui ont des propriétés propres d'interaction. Peu de ces supramodules ont été structuralement caractérisés à ce jour.

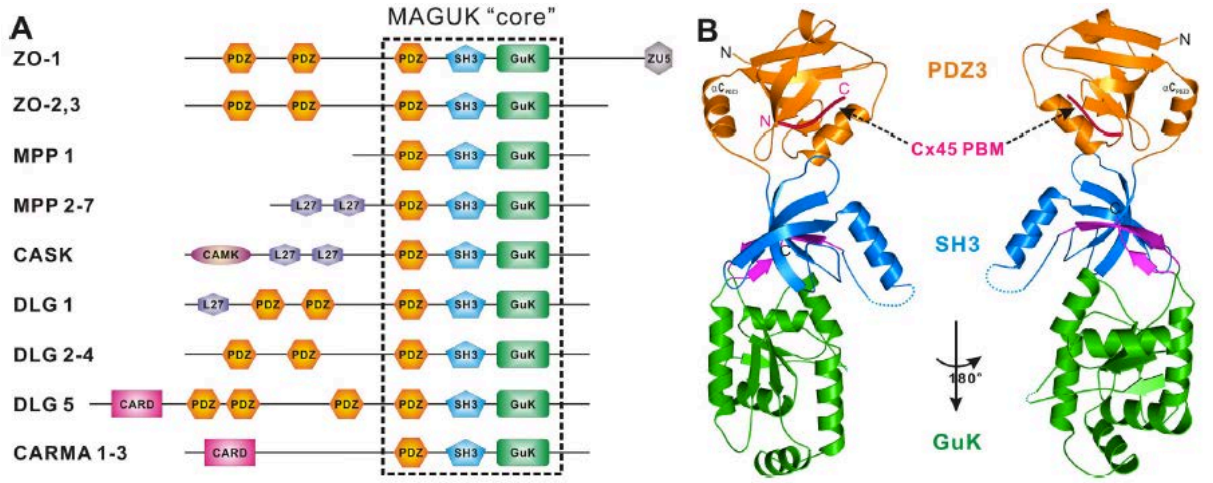


<u>Figure 27 :</u> Exemples de protéines possédant un ou des domaines PDZ.
Cette figure illustre la nature modulaire et la variété des domaines d'interaction protéique. Les domaines PDZ sont représentés par des ellipses violettes. Sont aussi représentés : Ank, ankyrin repeats; CaM kinase, calmodulin-dependent kinase (CaMK)-like domain; DIL, dilute domain; FABD, FAD binding domain; FHA, forkhead-associated domain; GK, guanylate kinase-like domain; L27, domaine initiallement trouvé dans LIN2 et LIN7; NADB, NAD-binding domain; NO, nitric oxide; PTB, phosphotyrosine-binding domain; RA, RAS association domain; RapGAP, Rap GTPase-activating protein; SAM, sterile # motif; SH3, Src homology 3 domain; WW, domain ; ZU5, domain présent dans ZO-1 et dans le récepteur netrine UNC5. Les protéines: Dlg; discs large; GRIP1, glutamate-receptor- interacting protein 1; LIN7, lin7 homologue; LIN10, lin10 homologue; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; PICK1, protein interacting with C-kinase 1; PSD-93, postsynaptic density protein 93; PSD- 95, postsynaptic density protein 95; SAP97, synapse-associated protein 97; SAP102, synapse-associated protein 102; Shank, SH3 and ankyrin repeat-containing protein; SPAR, spine-associated RapGAP; S- SCAM, synaptic scaffolding molecule; ZO-1, zona occludens protein 1. D'après Kim *et al* (2004) (361).

a. Supramodules de reconnaissance

Parmi les supramodules de reconnaissance, la protéine α-syntropine possède un domaine PDZ et un domaine PH qui interagissent de manière synergique avec les lipides et améliore l'affinité du supramodule pour les lipides (362).

Comme nous l'avons vue précédemment, la famille très étudiée des protéines MAGUK est caractérisée par la présence d'un supramodule PDZ-SH3-Guk. Elle comprend de nombreuse protéines telles que ZO-1 à ZO-3, MPP-1 à MP-7, CASK, DLG-1 5 et CARMA-1 à -3 (Figure 28). Nous avons vu que l'affinité du domaine PDZ pour certains partenaires est dépendante de la présence des domaines adjacents SH3-Guk dans la famille MAGUK. De manière réciproque, l'interaction du partenaire GukHolder de la protéine DLG avec les domaines SH3-Guk est elle même dépendante de la présence du domaine PDZ au sein du supramodule et de la fixation d'un PBM (363, 364). Cette régulation intramoléculaire n'est pas due à de simples effets de gêne stérique mais à des propriétés particulières de liaisons des partenaires au sein du supramodule (356, 363). Ceci est un très bon exemple pour illustrer comment des propriétés d'interactions propres émergent de l'association de différents domaines au sein d'un supramodule.



<u>Figure 28 :</u> Organisation en domaine des protéines MAGUK et structure du complexe ZO-1 PDZ3-SH3-GuK/peptide Cx4.

(A) Schéma sur l'organisation en domaine des protéines MAGUK. Le « supra domaine » PDZ3-SH3-Guk est mis en évidence avec un carré en pointillés. (B) Structure du complexe ZO-1 PDZ3-SH3-GuK/peptide Cx45. Le domaine PDZ3 est indiqué en orange, le domaine SH3 en bleu, le domaine Guk en vert. Le cinquième brin du domaine SH3 et le brin suivant du domaine Guk sont représentés en magenta et le peptide Cx45 en rose. D'après Pan *et al* (2011) (356).

b. Supramodules à activité catalytique

Certains domaines PDZ sont également associés à des domaines catalytiques. Le seul exemple connu à ce jour de régulation catalytique par des domaines PDZ est celui de la famille de sérine-protéases HtrA, impliquée dans le processus de contrôle et de dégradation des protéines mal repliées ou endommagées chez les bactéries et organismes eucaryotes. HtrA est composée d'un domaine protéase et de un ou deux domaines PDZ.

La protéase DegS d'*E. coli* de la famille HtrA est inhibée de façon allostérique par son domaine PDZ adjacent et la fixation d'un PBM rétablit l'activité enzymatique (365). Cette régulation a également été démontrée pour des protéines homologues bactériennes et humaines (366-369). Bien que plusieurs structures de ces protéines aient été obtenues sous différentes formes, Apo ou Holo, le mécanisme moléculaire sous-jacent à cette régulation est très complexe et n'est pas encore pleinement compris, d'autant que certaines de ces protéases adoptent différents niveaux d'oligomérisation, via des interactions PDZ - PDZ intermoléculaires, dont va dépendre l'activité enzymatique (370).

5) Vers une nouvelle vision des domaines PDZ

La prédominance des domaines PDZ dans les métazoaires indique qu'ils ont évolué en réponse à la complexification des voies de signalisation dans les organismes multicellulaires. Ils participent à la transduction du signal via le transport, la localisation et l'assemblage de complexes multi-protéiques. Ces fonctions prennent origine dans la multiplicité des domaines PDZ au sein des protéines, leur association avec d'autres domaines d'interaction, ainsi que leur capacité à s'oligomériser. Ils jouent le rôle de plateformes d'interaction et participent à la ramification des voies de signalisation (371).

L'ensemble des interactions impliquant les domaines PDZ est soumis à de nombreuses régulations. Ces domaines sont ainsi autant des acteurs que des régulateurs, aussi bien spatiaux que temporels, de la transduction du signal.

Ces dernières années, l'étude des domaines PDZ au sein de supramodules alimente cette vision. Ces organisations multi-domaines confèrent aux protéines des fonctions spécifiques et uniques. L'étude future des domaines PDZ au sein de ces organisations modulaires permettra certainement de faire émerger de nouvelles propriétés structurales et fonctionnelles.

Notre étude s'inscrit dans cette l'optique d'une meilleure compréhension du rôle joué par les domaines PDZ sur l'activité d'une protéine lorsqu'ils sont associés avec d'autres domaines, et notamment des domaines catalytiques comme dans le cas de la tyrosine phosphatase PTPN4 .

CHAPITRE IV - PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE - MEGAKARYOCYTE 1 (PTP-MEG1 OU PTPN4)

La protéine PTPMeg1 fut identifiée dans des cellules de la moelle osseuse dont elle tient son nom, les Megacaryoblastes (372). Elle fut ensuite nommée PTPN4 dans une revue qui référença l'ensemble des PTP alors identifiées (149). Composée de 926 acides aminés, elle possède une masse moléculaire de 105 910 Da. Le gène codant pour cette protéine est situé sur le chromosome 2q14.2 (373). Elle ne contient pas de segment transmembranaire et appartient à la famille des protéines tyrosine phosphatases non-réceptrices (E.C 3.1.3.48) (149). Cette protéine est composée d'un ensemble de domaines et de motifs qui participent à ses fonctions biologiques.

Il existe une protéine homologue à PTPN4 qui partage la même composition en domaines et en motifs mais qui possède des fonctions biologiques différentes. Cette protéine, PTPN3 sera traitée de manière succincte et en parallèle à PTPN4 dans le but de compléter notre vision de PTPN4.

1) Organisation structurale de PTPN4

PTPN4 est composée de 3 domaines identifiés et d'un domaine proposé sur la base d'alignements de séquences. Les trois domaines identifiés sont un domaine FERM en N-terminal, un domaine PDZ central et un domaine catalytique PTP en C-terminal de la séquence. Le domaine supposé est un domaine FA en aval du domaine FERM (Figure 29). PTPN4 est également composée d'un ensemble de motifs, tous situés au centre de la protéine entre le domaine FA et le domaine PDZ. Ces derniers sont des motifs Pro-rich de fixation au domaine SH3, des motifs de clivage PEST et différents sites de phosphorylation qui, une fois phosphorylés, peuvent former des sites de fixation au domaine 14-3-3 (Figure 30).



Figure 29 : Organisation en domaine de la protéine tyrosine-phosphatase PTPN4.
Le domaine FERM (noir) est en position N-terminale, suivi du domaine supposé FA (vert), le domaine PDZ (rouge) est situé au milieu de la protéine et le domaine tyrosine phosphatase (bleu) en position C-terminale.

PTPN3 présente quant à elle la même organisation en domaine, à l'exception du domaine FA (374). PTPN4 possède avec elle une identité de 54% sur l'ensemble de la séquence. L'identité de séquences est de 64% pour leurs domaines PTP, 71 % pour leurs domaines PDZ et 55% pour leurs domaines FERM (375, 376).

```
  1 MTSRFRLPAG RTYNVRASEL ARDRQHTEVV CNILLLDNTV QAFKVNKHDQ GQVLLDVVFK
 61 HLDLTEQDYF GLQLADDSTD NPRWLDPNKP IRKQLKRGSP YSLNFRVKFF VSDPNKLQEE
121 YTRYQYFLQI KQDILTGRLP CPSNTAALLA SFAVQSELGD YDQSENLSGY LSDYSFIPNQ
181 PQDFEKEIAK LHQQHIGLSP AEAEFNYLNT ARTLELYGVE FHYARDQSNN EIMIGVMSGG
241 ILIYKNRVRM NTFPWLKIVK ISFKCKQFFI QLRKELHESR ETLLGFNMVN YRACKNLWKA
301 CVEHHTFFRL DRPLPPQKNF FAHYFTLGSK FRYCGRTEVQ SVQYGKEKAN KDRVFARSPS
361 KPLARKLMDW EVVSRNSISD DRLETQSLPS RSPPGTPNHR NSTFTQEGTR LRPSSVGHLV
421 DHMVHTSPSE VFVNQRSPSS TQANSIVLES SPSQETPGDG KPPALPPKQS KKNSWNQIHY
481 SHSQQDLESH INETFDIPSS PEKPTPNGGI PHDNLVLIRM KPDENGRFGF NVKGGYDQKM
541 PVIVSRVAPG TPADLCVPRL NEGDQVVLIN GRDIAEHTHD QVVLFIKASC ERHSGELMLL
601 VRPNAVYDVV EEKLENEPDF QYIPEKAPLD SVHQDDHSLR ESMIQLAEGL ITGTVLTQFD
661 QLYRKKPGMT MSCAKLPQNI SKNRYRDISP YDATRVILKG NEDYINANYI NMEIPSSSII
721 NQYIACQGPL PHTCTDFWQM TWEQGSSMVV MLTTQVERGR VKCHQYWPEP TGSSSYGCYQ
781 VTCHSEEGNT AYIFRKMTLF NQEKNESRPL TQIQYIAWPD HGVPDDSSDF LDFVCHVRNK
841 RAGKEEPVVV HCSAGIGRTG VLITMETAMC LIECNQPVYP LDIVRTMRDQ RAMMIQTPSQ
901 YRFVCEAILK VYEEGFVKPL TTSTNK
```

Figure 30 : Localisation des sites fonctionnels sur la séquence de PTPN4.
Les motifs apparaissent selon le code couleur suivant : motif PEST (gris), motifs de fixation aux domaines SH3 (orange), motif potentiel de fixation aux domaines 14-3-3 (souligné en ondulé) et des sites de phosphorylation identifiés chez l'homme (souligné en gras) et chez la souris (souligné en pointillé). Les domaines de PTPN4 sont représentés dans le code couleur suivante : FERM (gras), FA (vert), PDZ (rouge) et PTP (bleu).

Il est intéressant de noter que chez *Monosiga brevicollis* où fut identifiée la plus « ancienne » des tyrosines kinases[‡], l'une des 4 phosphatases (parmi les 39 PTP) orthologues aux PTP humaines est apparentée à PTPN4 et PTPN3. Ces phosphatases ont donc été conservées à la seule différence que la protéine parente de *M. brevicollis* possède deux domaines PDZ (136).

[‡] Voir page 30.

A. Les motifs de reconnaissance

a. Site de protéolyse

La protéolyse joue un rôle important dans la régulation des protéines au sein de la cellule. Elle participe non seulement à la dégradation des protéines intracellulaires pour réguler le turn-over des protéines, mais aussi à l'activation de certaines protéines (377). La présence de motifs riches en proline, glutamate, sérine et thréonine (PEST) favorise leur dégradation. Plusieurs protéines possédant ce motif ont été décrites comme ayant une durée de demi-vie courte, inférieure à une ou deux heures (Figure 31) (378). Ces motifs PEST sont reconnus par différentes protéases telles que les caspases, la calpaïne ou encore par le protéasome (379, 380).
PTPN4 comprend un seul site PEST potentiel (378, 381). Il est situé entre les domaines FERM et PDZ (résidus : 436-461).



Figure 31 : Sensibilité des motifs PEST à la protéolyse. D'après Rechsteiner *et al* (1996) (377).

PTPN4 est protéolysée *in vitro* par la trypsine et libère un fragment d'environ 55 kDa. Le poids moléculaire de ce fragment correspondrait à un clivage au sein du motif PEST qui contient des sites de coupure à la trypsine (381). Ce fragment comprend le domaine PDZ et le domaine PTP et possède une activité catalytique sept fois supérieure à celle de la protéine entière. Cette partie C-terminale correspond à une forme active de PTPN4.

La calpaïne, protéase à cystéine cytosolique et dépendante du calcium, clive et active *in vitro* et *in vivo* la protéine PTPN4. Ce clivage a lieu dans des plaquettes en réponse à un ionophore à calcium ou un agoniste de la calpaïne, la thrombine (381). La partie N-terminale de PTPN4 comprenant le domaine FERM a une fonction inhibitrice sur l'activité catalytique de la phosphatase.

Si on se réfère au cas de PTPN3, sa protéolyse par la trypsine augmente également son activité catalytique par un facteur 5 à 10. La trypsine génère un fragment d'environ 39 kDa incluant uniquement le domaine PTP et un fragment d'environ 50 kDa comprenant le domaine phosphatase et probablement le domaine PDZ. Au moment de la découverte de ces résultats le domaine PDZ n'avait pas été identifié. L'activité mesurée lors du test de protéolyse ménagée est corrélée avec l'intensité de la bande de 39 kDa. Le fragment le plus actif de PTPN3 est donc celui qui correspond au domaine PTP (382). Les séquences situées en amont du domaine phosphatase de PTPN3 semblent ainsi jouer un rôle dans la régulation de l'activité catalytique de la phosphatase.

b. Sites de phosphorylation

Dans des cellules d'insectes Sf9, PTPN4 est phosphorylée sur des sérines et thréonines, mais aucune phosphorylation sur des tyrosines n'a été caractérisée. Les sites de phosphorylations se situent entre le domaine FERM et le domaine PDZ, entre les acides aminés 386-450 et 413-473. On évalue de 1 à 2 mol de phosphate par mol de protéine (381). PTPN4 peut être phosphorylée *in vitro* par la kinase C (PKC), une protéine kinase activée par des mitogènes (MAPK), la kinase dépendante de la Calmoduline (CaM) et la protéine kinase A (PKA) dont l'activité est dépendante de la concentration d'AMP cyclique. Ces phosphorylations ne modifient pas l'activité catalytique de PTPN4 (381).

Plus récemment, des phosphorylations de PTPN4 furent identifiées à la fois chez l'homme et la souris, dans le cadre d'études protéomiques par spectrométrie de masse. L'ensemble des sites de phosphorylation est regroupé dans la figure 32 et le tableau 4.

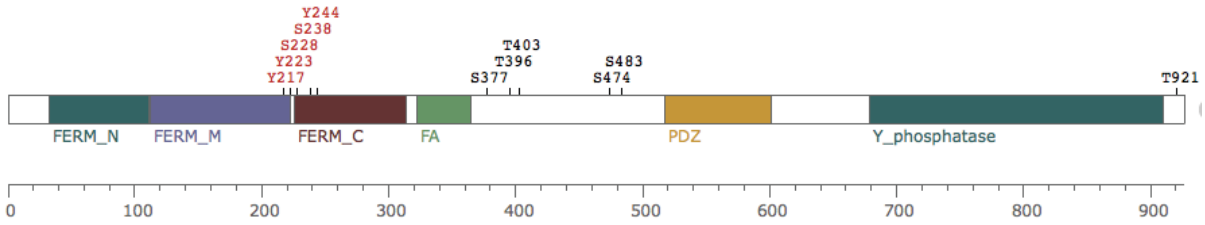


Figure 32 : Phosphorylations identifiées de PTPN4
Les sites de phosphorylations identifiés chez l'homme sont indiqués en rouge et ceux identifiés chez la souris en noir. D'après Phosphosites.

Sites	Humain	Sites	Souris	Références
Y_{217}^{P}	TARTLEL**Y^{P}**GVEFHYA	Y_{217}	AARTLELYGVEFHYA	(383)
Y_{223}^{P}	LYGVEFH**Y^{P}**ARDQSNN	Y_{223}	LYGVEFHYARDQSNN	(383)
S_{228}^{P}	FHYARDQ**S^{P}**NNEIMIG	S_{228}	FHYARDQSNNEILIG	(384)
S_{238}^{P}	EIMIGVM**S^{P}**GGILIYK	S_{238}	EILIGVMSGGILIYK	(384)
Y_{244}^{P}	MSGGILI**Y^{P}**KNRVRMN	Y_{244}	MSGGILIYKNRVRMN	(384)
S_{377}	WEVVSRNSISDDRLE	**S_{377}^{P}**	WEVVSRN**S^{P}**LSDDRLE	(385)
T_{396}	PSRSPPGTPNHRNST	**T_{396}^{P}**	PSRSPPG**T^{P}**PNHRNSS	(386)
T_{403}	TPNHRNSTFTQEGTR	**T_{403}^{P}**	TPNHRNS**S^{P}**FTQEATR	(387)
S_{474}	PKQSKKNSWNQIHYS	**S_{474}^{P}**	PKQSKKN**S^{P}**WNQIHFS	(387)
S_{483}	NQIHYSHSQQDLESH	**S_{483}^{P}**	NQIHFSN**S^{P}**QQDLVTH	(387)
T_{921}	EGFVKPLTTSTNK$_{\text{-COOH}}$	**T_{921}^{P}**	EGFVKPL**T^{P}**TSSNK$_{\text{-COOH}}$	(384)

Tableau 4 : Phosphorylations identifiées de PTPN4
Les séquences des sites de phosphorylation identifiées chez l'homme et la souris. Les sites de phosphorylation sont indiqués en bleu. Données Phosphosites.

Bien que diverses phosphorylations aient été identifiées sur PTPN4, aucune n'a encore été impliquée dans une interaction avec un partenaire, une voie de signalisation, ou un quelconque phénotype.

c. Motifs riches en proline

PTPN4 présente deux motifs pro-rich (389-397 & 462-468) susceptibles d'interagir avec des domaines SH3 (381). Ces deux motifs sont situés entre le domaine FA et le domaine PDZ.

Deux des phosphorylations de PTPN4 (T_{396}P & T_{403}P) sont situées dans ou à proximité du motif N-terminal de fixation au domaine SH3 (P_{389}SRSPPGTP$_{397}$). La phosphorylation de résidus au niveau de ces motifs empêche la fixation du partenaire (388, 389). Elle

pourrait alors jouer un rôle dans la régulation de l'interaction de PTPN4 avec des partenaires et ainsi contrôler l'activité de la phosphatase PTPN4.
Une étude de criblage à haut débit a identifié plusieurs interactants possibles pour le deuxième motif Pro-rich de PTPN4 (K_{461}PPALPPK_{468}) (390). L'un de ces interactants est le domaine SH3 de la kinase Fyn qui pourrait être impliquée dans le contrôle de la plasticité synaptique en phosphorylant un récepteur à glutamate grâce à son interaction avec PTPN4 (207). Un partenaire endogène de ce motif a été récemment identifié, le premier domaine SH3 de la protéine Crk-I, (391).

d. Site 14-3-3

PTPN4 possède un site consensus de fixation au domaine 14-3-3 (R-S-X-S-X-P) RSPS_{360}KP situé en aval du domaine FA. Néanmoins, aucun exemple de complexe impliquant PTPN4 avec un domaine 14-3-3 ni même de phosphorylation de la sérine 360 de PTPN4 nécessaire à l'interaction avec un domaine 14-3-3 n'ont encore été observés. PTPN3 interagit quant à elle *in cellulo* avec la protéine 14-3-3β, composée d'un domaine 14-3-3. Cette interaction dépend principalement de la phosphorylation de deux sérines (RSLS_{359}VE et RVDS_{853}EP) (392). Le second de ces sites présent dans PTPN3 n'est pas conservé chez PTPN4. Cette différence pourrait participer dans la différenciation des fonctions de ces deux phosphatases.

B. Les domaines de PTPN4

a. Le domaine FERM

Le domaine FERM porte le nom des protéines dans lesquelles ce domaine fut identifié : protéine *Four.one*, Ezrin, Radixin, Moesin (35). Constitué de 200 résidus, sa masse moléculaire est d'environ 30 kDa. Il est composé de trois sous-domaines, les lobes -N, -α et -C (ou encore lobes A, B et C) qui ont chacun une structure différente et adoptent ensemble une forme en feuille de trèfle (Figure 33) (393). Le lobe A partage des caractéristiques structurales avec l'ubiquitine. Le lobe B contient quatre hélices-α et est

homologue des protéines de fixation de l'acyl-CoA. Enfin, le lobe C possède des similarités de séquence avec les domaines PH ou PTB (394, 395).

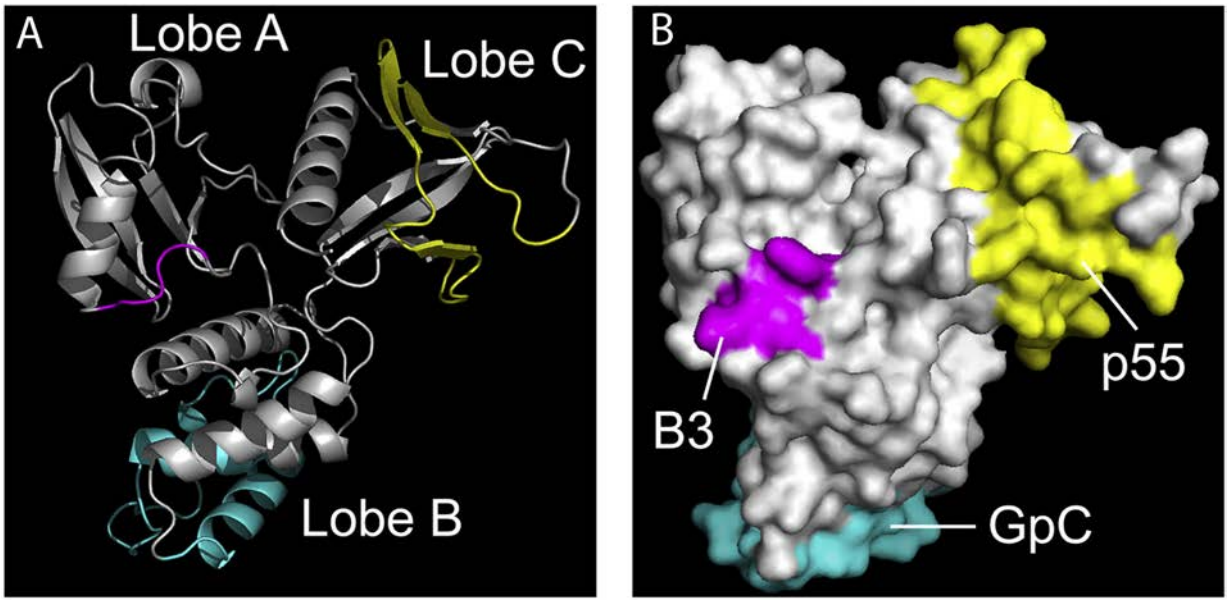


Figure 33 : Organisation structurale du domaine FERM.
(A) Structure en ruban d'un domaine FERM (PDB code : 1GG3). Les trois lobes (A, B et C) y sont indiqués. (B) Surface du domaine FERM illustrant les sites d'interaction avec la protéine Band 3 (B3), la glycophorine C (Gpc) et p55. Le code couleur dans (A) et (B) est le même et correspond aux mêmes séquences. D'après Baines *et al* (2014) (396).

Ces trois sous-domaines confèrent au domaine FERM une large polyvalence d'interaction avec des partenaires de natures diverses, protéique ou lipidique. Chaque domaine a ses propres propriétés d'interaction. Dans le cas de la protéine 4.1, le lobe A interagit avec l'échangeur d'anions AE1 (bande E3), le lobe B s'associe avec la protéine p55 et le lobe C avec la glycophorine C (GPC) (Figure 33) (397, 398). Par ailleurs, le motif YRKS situé dans le lobe C est nécessaire pour la reconnaissance de la phosphatidylsérine et joue ainsi un rôle dans la localisation cellulaire de la protéine 4.1 (399).

L'interaction du domaine FERM avec ses partenaires est soumise à divers mécanismes de contrôle qui dépendent de sa phosphorylation ou de la fixation de protéines ou de lipides. Par exemple, le domaine FERM de la protéine 4.1 contient deux sites de fixation à la calmoduline, l'un dépendant et l'autre indépendant à l'ion Ca^{2+}, qui va moduler l'interaction avec l'échangeur d'anions AE1 ou la GPC en fonction du site occupé (400-

402). Dans le cas des protéines ERM, la forme hypo-phosphorylée du domaine FERM adopte une conformation « fermée » qui masque le site de fixation à l'actine et à CD44 (403). La phosphorylation de ce domaine sépare les lobes A et C et induit une conformation « ouverte », capable d'interagir avec l'actine et avec d'autres protéines (404). Enfin, la fixation de la tête polaire de PIP_2 avec une gouttière basique située à la jointure des deux lobes A et C modifie la structure de FERM et masque le site de fixation pour des molécules d'adhésion cellulaire telles que ICAM1-3 et L1 sur le lobe C (405, 406).

Ces domaines FERM jouent un rôle important dans la localisation cellulaire des protéines. Du fait de la diversité de leurs partenaires, ils représentent une plateforme d'interactions faisant le pont entre les protéines de signalisation intracellulaire, des protéines du cytosquelette et la membrane plasmique. Ils participent ainsi à l'organisation de la structure du cytosquelette et coordonnent la formation de complexes de signalisation (407).

FERM est présent dans de nombreuses protéines et peut être classé, sur la base de l'identité de séquence, en cinq familles : protéine 4.1, protéine ERM, protéine *talin-related*, PTPH (pour PTPH1, premier nom de PTPN3) et *novel band 4.1-like proteins* 4 (NBL4) (35, 408). PTPN4 et PTPN3 appartiennent à la famille « PTPH » des FERM, avec trois autres protéines encore non caractérisées NBL1, NBL2 et NBL3 (409). D'autres NRPTP contiennent un domaine FERM telles que PTPN13, PTPN21 et PTPN14 (376, 410). Le domaine FERM de PTPN21 ne partage néanmoins que 30% d'identité de séquence avec les domaines FERM de PTPN3 et PTPN4, alors que les domaines FERM de ces deux dernières partagent 55 % d'identité de séquence (376)

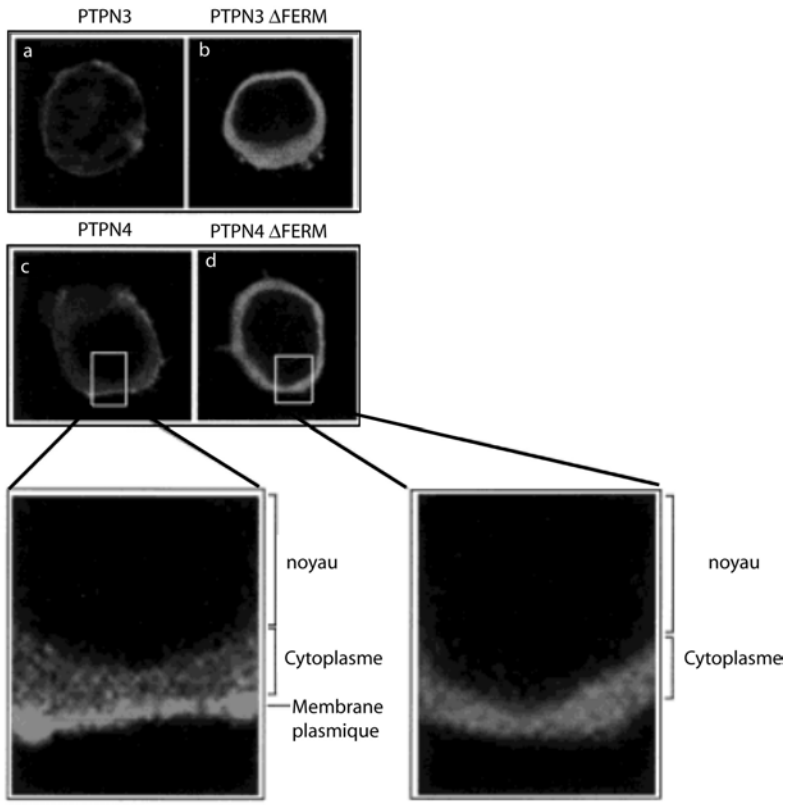


Figure 34 : Localisation cellulaire de PTPN4 et PTPN3 dans des cellules Jurkat T.
Microscopie confocale de cellules Jurkat transfectées avec les phosphatases étiquetées HA et marquées avec des anticorps monoclonaux FITC anti-HA (a - d). Afin de visualiser la différence entre PTPN4 et PTPN4 ΔFERM, deux régions encadrées (c & d) sont agrandies. D'après Gjörloff-Wingren *et al* (2000) (193).

Ces domaines jouent un rôle dans la localisation cellulaire de PTPN3 et PTPN4. Dans des cellules Jurkat, elles sont localisées dans le cytoplasme et à la membrane plasmique. Après suppression du domaine FERM, les deux phosphatases sont exclusivement cytoplasmiques (Figure 34) (193). Ceci fut également observé pour une protéine (PTP-FERM) homologue chez *C. elegans* (411).

Le domaine FERM joue parfois le rôle de régulateur intramoléculaire. Dans le cas de la kinase FAK, l'interaction du domaine FERM avec le domaine Kinase inhibe son activité enzymatique et perturbe la reconnaissance de partenaires (248). Il a été proposé que la partie N-terminale de PTPN4 et PTPN3 comprenant le domaine FERM joue lui aussi un rôle dans la régulation de l'activité catalytique à travers un mécanisme intramoléculaire. Le clivage *in vitro* et *in vivo* de PTPN4 entre le domaine FERM et le domaine PDZ active l'activité catalytique (381, 382) mais aucune donnée sur cette possible régulation intramoléculaire n'est encore disponible aujourd'hui.

Les domaines FERM peuvent également interagir avec différentes protéines, mais aucun partenaire des domaines FERM de PTPN4 ou de PTPN3 ne sont connus à ce jour.

Lors de la découverte du domaine FERM par une étude de protéolyse ménagée de la protéine 4.1R, un domaine adjacent a été également découvert, produisant un fragment de 16kDa (412). Sur la base d'alignements de séquences on constate que ce fragment présente une similarité de séquences avec des régions en aval de domaines FERM d'autres protéines de la famille 4.1 ainsi qu'avec d'autres protéines humaines (Figure 35) (413). Il fut ainsi nommé « domaine adjacent aux FERM » (FERM *Adjacent* ; ou domaine FA) (413).

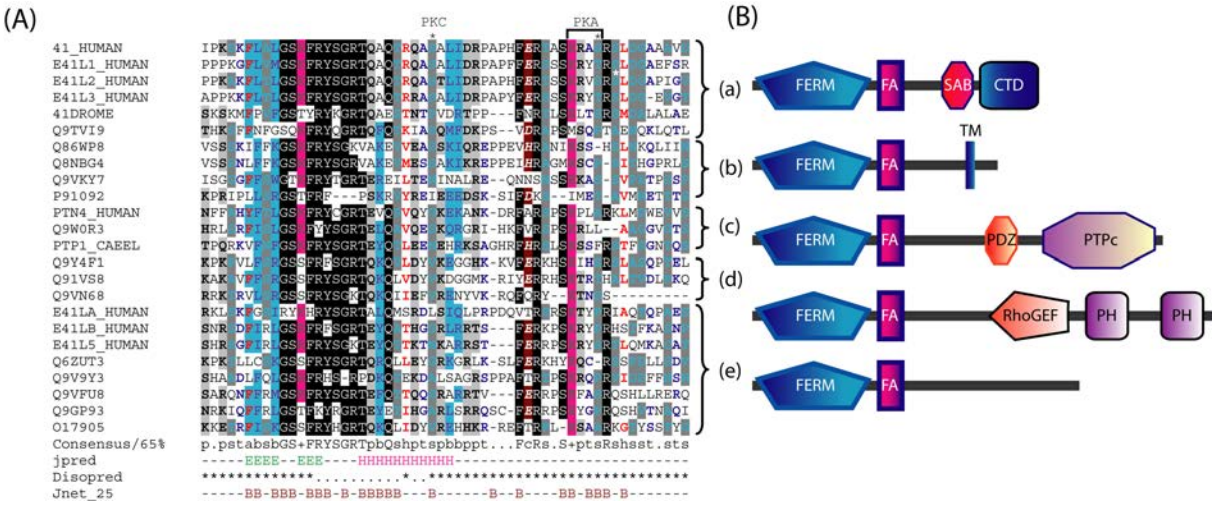


Figure 35 : Conservation d'un domaine FA en C-terminal de domaine FERM de différentes familles de protéines.

(A) Alignement de séquences de protéines issues de l'homme, de la drosophile et du nématode. Les séquences présentées ici sont toutes adjacentes en C-terminal à des domaines FERM. La présence du motif consensus de la kinase PKA et PKC sur la protéine humaine 4.1R est indiquée. Les astérisques indiquent des phosphorylations physiologiques de la protéine 4.1R. Les prédictions de structures secondaires sont représentées en dessous de l'alignement. Jpred : E correspond à des prédictions de feuillets β, H à des hélices α. Disopred : * correspond à des régions prédites comme désordonnées. Jnet : B correspond aux régions inaccessibles au solvant.
(B) Exemples de classes de protéines contenant des domaines FA. Illustration schématique de l'organisation en domaines des protéines. (a) Famille des protéines 4.1 qui peuvent présenter en C-terminal un domaine CTD. (b) Un groupe de protéines peu caractérisées qui possèdent un domaine FERM, un domaine FA et un segment trans-membranaire en C-terminal. (c) La protéine tyrosine-phosphatase non-réceptrice PTPN4 humaine. Le domaine FA n'a pas été identifié dans les autres NRPTP qui contiennent un domaine FERM (PTPN3, PTPN13, PTPN21, PTPN14). (d) CDEP est un facteur d'échange nucléotidique pour des protéines GTPase de la famille Rho. (e) Un ensemble de protéines ne possédant pas de domaines supplémentaires identifiables par SMART. Celui-ci comprend les protéines Band 4.1-like 5 et NBL-4. D'après Baines *et al* (2006) (413).

Ce domaine possède des sites de phosphorylation reconnus par PKA ou PKC qui, lorsqu'ils sont phosphorylés, diminuent l'interaction du lobe B avec certains de ses partenaires (GPC, Duffy et XK) (414-416). Il aurait ainsi un rôle dans la régulation de la fonction du domaine FERM. Il n'est cependant pas présent de manière systématique dans les protéines contenant des domaines FERM. Celles qui contiennent ce domaine FA forment ainsi une sous-classe des protéines à domaine FERM. Parmi les tyrosine-phosphatases possédant un domaine FERM, seule PTPN4 possède un domaine FA. Même sa plus proche homologue, PTPN3, ne présente aucune homologie de séquence avec un domaine FA. Nous ne connaissons néanmoins que peu de choses sur ces domaines FA tant du point de vue structural que du point de vue de la régulation des fonctions biologiques des protéines.

b. Le domaine PDZ

Le domaine PDZ de PTPN4 appartient à la Classe I et reconnaît ainsi le motif consensus X-(S/T)-X-Φ-COOH. Il n'interagit pas ou avec une très faible affinité (>1 mM) avec des PBM de la classe II (259).

Sa structure sans ligand a été résolue par RMN dans le programme de Génomique/Protéomique Structurale RIKEN au Japon (PDB code : 2CS5). Un second groupe de génomique structurale à Toronto au Canada a résolu la structure du domaine PDZ de PTPN4 par cristallographie par diffraction aux rayons X à une résolution de 1,9 Å (PDB code : 2VPH). La construction utilisée comprend en C-terminal du domaine PDZ une extension incluant un motif PBM afin de former des dimères artificiels facilitant l'obtention de cristaux. Ces structures ne sont associées à aucune publication.

Deux structures du domaine PDZ de PTPN4 en complexe ont été résolues au laboratoire (259). Une première structure en interaction avec un PBM d'un ligand endogène GluN2A, à une résolution de 1,9 Å (PDB code : 3NFL). La deuxième avec un ligand viral, le PBM de la protéine G d'une souche atténuée du virus de la rage, à une résolution de 1.4 Å (PDBcode : 3NFK).

L'ensemble de ces structures montre que l'interaction avec un ligand s'effectue de manière canonique impliquant les 5 acides aminés C-terminaux du partenaire (Figure 36).

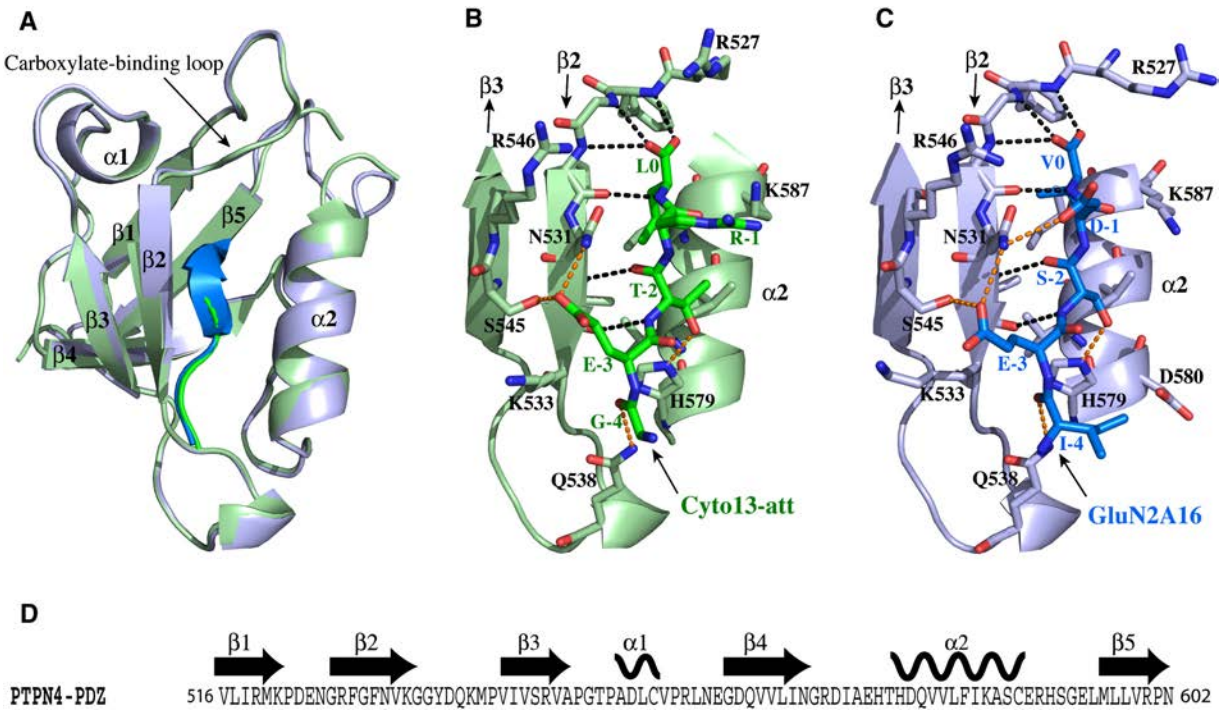


Figure 36 : Structures de PTPN4-PDZ en complexe avec Cyto13-att et GluN2A-16
(A) Superposition des complexes de PTPN4-PDZ avec Cyto13-att (13 derniers acides aminés de la protéine G de la souche atténuée du virus de la rage) (Vert dans A et B) et GluN2A-16 (16 derniers acides aminés du récepteur GluN2A) (bleu dans A et C). Seuls les cinq derniers acides aminés de chacun des ligands sont visibles dans les structures cristallographiques. (PDB code 3NFK et 3NFL). (B et C) Vue détaillée du site de fixation au PBM du domaine PDZ de PTPN4. Les résidus importants sont illustrés en bâton suivant le code couleur CPK. Les liaisons hydrogène sont en pointillés, celles qui impliquent les chaines latérales des peptides sont en orange et les liaisons peptidiques avec les peptides sont en noir. (D) Éléments de structure secondaire suivant la séquence du domaine PDZ de PTPN4. D'après Babault *et al* (2011) (259).

c. Le domaine PTP

Les domaines phosphatase de PTPN4 et de PTPN3 composent le groupe des PTP NT5. Celui de PTPN4 possède une activité catalytique maximale à un pH entre 5,0 et 7,5 et à 42 °C (417). En outre, il a été démontré que l'alendronate inhibe son activité enzymatique (418).

La structure du domaine PTP de PTPN4 a été résolue par cristallographie aux rayons X à une résolution 2,5 Å par le programme Phosphatome du consortium de génomique structurale d'Oxford, en Angleterre (167). Ce domaine possède une structure classique et présente l'ensemble des motifs caractéristiques des PTP (Cf chapitre PTP). Concernant la deuxième poche de fixation des pTyr, PTPN4 a été placée dans la classe IV lors de cette étude (Annexe n°2). Dès lors, PTPN4 n'aurait pas la capacité d'interagir

avec un substrat possédant une deuxième pTyr à proximité de la tyrosine substrat (167). La structure de la boucle du second site est défavorable à la fixation d'une pTyr. La présence d'une méthionine dans cette deuxième cavité empêcherait par gêne stérique l'interaction avec un pTyr. De plus, la présence d'une tyrosine dans le second site, à la place d'une arginine qui stabilise le groupement phosphate dans PTPN1, ne favorise pas l'interaction avec une pTyr adjacent au pTyr substrat dans le cas de PTPN4. PTPN4 a par ailleurs une préférence pour des résidus acides en amont (N-ter) de la pTyr (167).

La cystéine réactive du site catalytique des PTP peut subir une oxydation. Dans l'état oxydé, les PTP sont inactives car le groupement thiolate (S^-) de la cystéine catalytique n'est plus compétent pour déphosphoryler son substrat. PTPN4 est sensible *in vitro* et *in cellulo* aux dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS). En présence de 10mM de H_2O_2, la forme oxydée de PTPN4 est très majoritairement SO_3H (419). À la différence de PTPN4, PTPN3 est beaucoup moins, voire pas du tout, sensible à la présence de ROS, et donc à l'oxydation de sa cystéine réactive.
Par ailleurs, la cystéine active de PTPN4 peut être nitrosylée *in vitro* par différents agents nitrosylants alors que PTPN3 y est insensible (419). Les fonctions de PTPN4 pourraient être sous le contrôle de la concentration d'oxyde nitrique intracellulaire, qui joue un rôle de neurotransmetteur.
La différence de réactivité des cystéines de PTPN4 et PTPN3 pourrait jouer un rôle discriminant dans la fonction des deux phosphatases. Les cellules cancéreuse produisent souvent de forts taux de ROS qui peuvent diminuer l'activité basale de certaines PTPs et ainsi augmenter le niveau de phosphorylation de protéines cellulaires (420, 421). On observe une grande proportion intracellulaire de PTPN4 oxydée dans des lignées cellulaires cancéreuses ayant une forte concentration de ROS intracellulaire (419).
Il serait également intéressant d'étudier le rôle de l'influx d'oxyde nitrique dans les neurones sur l'activité de PTPN4 et son implication dans la plasticité synaptique et l'induction de la DLT, dans lesquelles cette phosphatase est impliquée.

2) Les fonctions cellulaires de PTPN4

Une protéine homologue de PTPN4 a été identifiée chez la souris. Elle est enrichie dans les testicules où elle jouerait un rôle dans la spermatogénèse (422). Chez l'homme,

PTPN4 est exprimée dans les cellules et les organes du système immunitaire tels que les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, la rate, le thymus ou plus précisément dans les lymphocytes du sang périphériques, ainsi que dans les cellules Jurkat T qui sont une lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T humains (Tableau 5)(193). PTPN4 est également exprimée dans des cellules de muscle squelettique ou de cerveau, notamment dans le thalamus, dans les cellules de Purkinje du cervelet ainsi que dans des glioblastomes, qui sont une lignée cellulaire de tumeur primitive du cerveau (207, 381, 423). Dans la cellule, elle se trouve aussi bien au niveau de la fraction cytoplasmique, la fraction membranaire, que celle du cytosquelette (98, 193, 381, 423).

PTPase	Moelle osseuse	Foie fœtal	ganglions lymphatiques	LSP	rate	thymus	amygdale	Jurkat
HePTP (PTPN7)	++	+	++	+	+	+	+++	++
TCPTP (PTPN2)	++	+	++	+	++	+	+++	+++
PTP1B (PTPN1)	–	–	+	–	–	–	+	–
SHP1 (PTPN6)	++	+	+++	++	++	+	+++	+++
SHP2 (PTPN11)	++	++	+++	++	++	+	++	+
PEP/Lyp (PTPN22)	+	+	+	+	+	+	+	++
PTP-PEST (PTPN12)	++	+	++	++	+	+	+	+
PTP-HSCF (PTPN18)	–	–	–	–	–	–	–	–
PTP-MEG2 (PTPN9)	–	–	–	–	–	–	–	++
PTPH1 (PTPN3)	++	++	+	–	–	–	+	++
PTP-MEG1 (PTPN4)	+	–	+	++	++	+	–	+
PTP-BAS (PTPN13)	+	+	++	+	+	+	++	–
PTP36 (PTPN14)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
PTEN	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++
LMPTP	+++	++	+++	++	++	+	++	++
PRL-1	++	+++	++	++	+	+	+	++
OV-1	++	++	++	++	++	++	++	++

Tableau 5 : Expression de PTP dans des organes lymphoïdes et cellules humaines.
Les résultats représentent la quantité de produits d'amplification obtenus à partir d'ADNc provenant des organes ou des types cellulaires indiquées. Une quantité identique d'ADN a été utilisée de manière à ce que les quantités soient comparables entre chaque échantillon pour chacune des PTP. Cependant, les PTP ne peuvent être comparées les unes aux autres. D'après Gjörloff-Wingren *et al* (2000) (193)
n.d: non déterminé; LSP: Lymphocytes du sang périphérique.

Les fonctions cellulaires de PTPN4 ne sont à ce jour pas clairement définies. Nous savons qu'elle est impliquée dans les processus de l'immunité dépendants des récepteurs des cellules T, dans l'apprentissage moteur et de la plasticité synaptique qui en dépend et

pour finir, dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire. Elle est également impliquée dans le syndrome de Grave, où elle est surexprimée dans des tissus de patients (424). Ce syndrome est une maladie auto-immune de la thyroïde. Le rôle de PTPN4 dans ce syndrome est encore inconnu.

Nous nous attarderons dans la suite de ce chapitre sur le rôle de PTPN4 dans ces différentes fonctions cellulaires avant de voir plus en détail quels domaines de la phosphatase sont impliqués dans ces fonctions.

A. Régulation des récepteurs des cellules T (TCR)

PTPN3 et PTPN4 sont exprimées dans des cellules du système lymphoïde et régulent les voies de signalisation des TCR. Elles déphosphorylent le motif d'« activation à tyrosine des immuno-récepteurs » (ITAM) situé sur la chaine ζ du TCR (425, 426). Ce motif, une fois phosphorylé, est essentiel pour la transmission du signal des TCR (427).
Ces deux phosphatases sont également impliquées dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'activation du TCR. Leur surexpression inhibe les facteurs de transcription *nuclear factor of activated T cell* (NFAT) et *activator protein 1* (AP-1) impliqués dans la transcription du gène de l'interleukine-2 (IL-2) (193). Le domaine phosphatase a un rôle essentiel dans cette inhibition car, une fois supprimé, l'inhibition de la transcription n'est plus observée (393). L'expression concomitante de PTPN3 ou de PTPN4, *via* l'activation des TCR réduit le pool de phosphorylation des kinases MEK et ERK. Ces kinases font parties de la voie de signalisation des TCR et ont un rôle en amont de l'activation de la transcription du gène de l'IL-2 (397). Cette étude montre que PTPN3 est plus efficace que PTPN4 pour inhiber à la fois NFAT/AP-1 et l'activation des MAPK (397).
Une étude plus récente a montré que la surexpression de PTPN4 a pour conséquence une diminution de l'activation de AP-1 et de NF-κB et ceci dépendamment de son activité catalytique (426). Ces résultats renforcent le fait que PTPN4 est un régulateur négatif des voies de signalisation des TCR. Néanmoins, chez des souris n'exprimant pas le domaine PTP de PTPN4, le développement des cellules T situées dans le thymus et dans les organes lymphoïdes secondaires est normale. De plus, l'absence du domaine phosphatase de PTPN4 n'a aucun impact dans sur la production de cytokines ou encore

sur la réponse immunitaire post-infection bactérienne. En parallèle, l'étude menée par King P. a aussi observée que des souris n'exprimant pas le domaine PTP de PTPN3 montre un développement normal des cellules T, de leur activation ainsi que de la transduction du signal dépendant du TCR. La phosphorylation *in vivo* du segment ζ du TCR ne semble pas affectée par l'absence du domaine phosphatase de PTPN3 (428). La redondance des fonctions de PTPN4 et de PTPN3 fut avancée comme hypothèse pour expliquer l'absence d'effet suite à la suppression de leur domaine PTP chez la souris (426, 428). Cette hypothèse a été écartée sachant que des observations similaires ont été observées chez des souris double déficientes (PTPN3ΔPTP et PTPN4ΔPTP) et triple déficientes (PTPN3ΔPTP, PTPN4ΔPTP et PTPN13ΔPTP) (429). L'implication de ces phosphatases dans la réponse immunitaire à travers la déphosphorylation du segment ζ du TCR, des MAPK et dans la régulation de la transcription de protéines dépendantes des TCR reste encore à éclaircir.

B. Plasticité synaptique - Dépression à long terme

Une protéine homologue à PTPN4 a été identifiée chez la drosophile. Elle joue un rôle dans l'établissement et la stabilisation du réseau d'axones et plus spécifiquement dans les corps pédonculés (CP) (430). L'activité phosphatase de PTPN4 est essentielle dans la formation et l'organisation des axones des CP. La présence du domaine FERM est quant à elle nécessaire à la stabilisation du réseau de ces axones en prévenant la rétractation des CP (430). Ces corps pédonculés sont notamment connus pour tenir un rôle crucial lors de l'apprentissage et la mémoire olfactive.

Chez l'homme, PTPN4 est impliquée dans la plasticité synaptique, et plus spécifiquement dans la dépression à long terme (DLT) qui est associée aux processus d'apprentissage et de la mémorisation (431). Dans les cellules de Purkinje, PTPN4 interagit avec des sous-unités de deux familles de récepteurs ionotropiques à glutamate, qui jouent un rôle central dans la DLT (207, 432-436). Ces sous-unités sont GluRδ2 (ou GluD2) qui fait partie des récepteurs orphelins GluD et GluRε1 (ou GluN2A) qui provient des récepteurs

à glutamate N-méthyl-D-aspartique (NMDA) (437). Elles possèdent en C-terminal un PBM reconnu par le domaine PDZ de PTPN4.

a. Interaction avec la sous-unité GluN2A

La phosphorylation des récepteurs à NMDA par des kinases de la famille Src, dont Fyn, entraîne une augmentation de leur activité et permet l'induction de la potentiation à long terme (PLT) qui participe également à la plasticité synaptique (438). La phosphorylation de GluN2A augmente avec la surexpression dans des cellules de rein humain, de PTPN4 et de Fyn. Cette phosphorylation est dépendante de la présence du PBM en C-terminal de GluN2A ainsi que de l'activité catalytique de la phosphatase PTPN4.

Deux hypothèses sont avancées :

- L'activité phosphatase de PTPN4 serait impliquée dans la réorganisation du cytosquelette à proximité de GluN2A et améliorerait ainsi l'accessibilité du récepteur pour la kinase Fyn (207).
- Fyn interagirait directement avec PTPN4. Le motif Pro-rich de PTPN4 peut interagir avec le domaine SH3 de la kinase de Fyn (390). Ainsi, lorsque le domaine PDZ de la phosphatase reconnaît le PBM de GluN2A, ceci faciliterait l'accès de la kinase au récepteur. Dans le cas d'une interaction directe entre les deux protéines, le rôle de l'activité phosphatase de PTPN4 dans la régulation de la phosphorylation du récepteur GluN2A reste encore à expliquer.

Plus généralement, l'implication de l'interaction de PTPN4 avec GluN2A dans les processus de la plasticité synaptique est encore méconnue.

b. Interaction avec la sous-unité GluD2

L'augmentation de la phosphorylation de la sous-unité GluD2 n'est pas observée en présence de PTPN4, suggérant un rôle différent de cette phosphatase (207).

Le sous-récepteur GluD2, comme PTPN4, est principalement exprimé dans la partie post-synaptique des cellules de Purkinje du cervelet (207, 439). GluD2 participe à

l'endocytose des récepteurs AMPA lors de la DLT et est essentiel pour le développement cérébral, dont la formation des synapses et les fonctions cérébrales telles que la coordination et l'apprentissage moteurs (436, 440). La suppression du gène codant pour PTPN4 chez la souris entraîne un trouble de l'apprentissage moteur ainsi que de la dépression à long terme (441). L'interaction de PTPN4 avec GluD2 serait ainsi impliquée dans les processus d'apprentissage moteur ainsi que dans la DLT.

Dans des cellules de Purkinje déficientes en GluD2, l'induction de la DLT est restaurée après surexpression de GluD2 mais pas avec GluD2ΔPBM auquel il manque les sept derniers résidus codant pour le PBM (442). Chez la souris déficientes en GluD2, l'expression constitutive de GluD2ΔPBM entraîne une altération de la DLT (443). Ces résultats indiquent que le PBM du récepteur GluD2 est impliqué dans l'induction de la DLT. Le PBM interagirait avec le domaine PDZ de PTPN4 pour réguler l'induction de la DLT ainsi que l'apprentissage moteur (432, 442, 444). Cette hypothèse a été récemment confirmée (445). En effet, PTPN4 interagit avec GluD2 via son PBM pour déphosphoryler une tyrosine (Y_{876}) de la partie cytoplasmique du récepteur à AMPA GluA2. La phosphorylation de cette tyrosine empêche celle d'une sérine (S_{880}) essentielle pour l'induction de la DLT (445, 446). L'interaction de PTPN4 avec le PBM de GluD2 régule ainsi l'induction de la DLT (Figure 37).

Deux études menées par l'équipe de King P. montrent cependant que des souris déficientes pour PTPN4 n'ont pas de trouble de l'apprentissage (429, 441). Ce désaccord apparent pourrait avoir comme origine les lignées de souris utilisées lors de ces études qui ne possèdent pas le même contexte génétique (428).

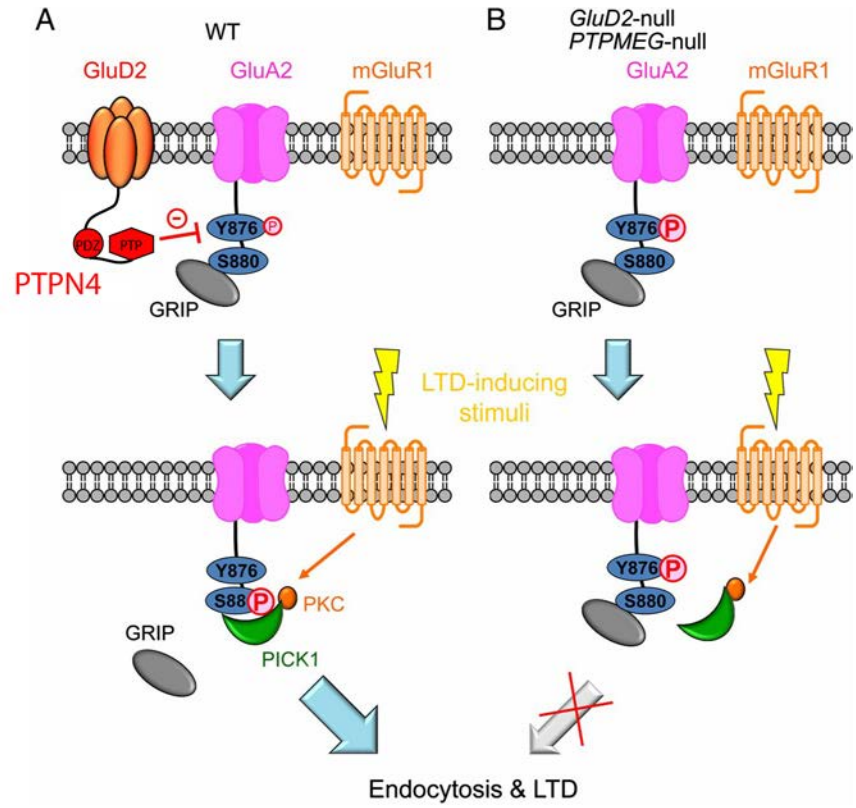


Figure 37 : Modèle de la régulation et de l'induction de la DTL par GluD2
(A) PTPN4 interagit avec le PBM de GluD2 et maintient un faible niveau de phosphorylation de la Y_{876} de la sous-unité GluA2 du récepteur. Un signal inducteur de la DLT induit, par un mécanisme encore inconnu, une déphosphorylation plus forte de Y_{876}. Cette dernière permet, lors d'un stimulus induisant la DLT, la phosphorylation de la S_{880} par PKC amenant au recrutement de la protéine PICK1 au lieu de GRIP et l'endocytose du récepteur AMPA. (B) Dans des cellules de Purkinje ΔGluD2 et ΔPTPN4, un haut niveau de phosphorylation de Y_{876} est maintenu. Lors d'un stimulus induisant la DLT, cette phosphorylation empêche celle de la S_{880} de GluA2 et inhibe l'endocytose de GluA2 et la DLT. D'après Kohda *et al* (2003) (445).

Par ailleurs, l'élévation de la concentration intracellulaire de Ca2+, essentielle lors de l'induction de la DLT (447, 448), pourrait aussi réguler les fonctions de PTPN4 (207, 441). La calpaïne, une protéase dépendent de l'ion Ca2+, est impliquée dans les voies de signalisation de GluD2 dans les cellules de Purkinje (449). Il est intéressant de faire le parallèle avec l'étude de Gu & Majerus qui montre que l'activité phosphatase de PTPN4 augmente lorsque celle-ci est clivée *in vitro* par la calpaïne ou *in cellulo* après l'ajout d'un ionophore de calcium (381). Il serait alors possible que PTPN4 soit activée par clivage lors de l'induction de la DLT. L'étude récente de Khoda *et al,* met par ailleurs en évidence le rôle majeur joué par les domaines PDZ et PTP de PTPN4 lors de l'induction de la DLT (445). Cette hypothèse reste à confirmer. Il pourrait être intéressant d'étudier la

viabilité de l'induction de la DLT dans des cellules de Purkinje dans lesquelles PTPN4 serait mutée de manière à éviter son clivage par la calpaïne. L'étude du clivage de PTPN4 lors de l'induction de la DLT et de sa localisation cellulaire qui pourrait jouer un rôle essentiel pour sa fonction restent aussi à réaliser.

C. Contrôle de l'homéostasie cellulaire

a. Mutations tumorales

La mutation de PTP est observée dans diverses pathologies, et notamment des cancers. L'étude des mutations somatiques établies dans différentes lignées cellulaires pathologiques apporte un grand nombre d'informations sur les régions (motif ou domaine) impliquées dans les fonctions cellulaires d'une protéine (450).

L'analyse des mutations des PTP dans des tumeurs colorectales a mis en évidence des mutations touchant notamment 3 NRPTP : PTPN13, PTPN14 et PTPN3 (224). La majorité des mutations identifiées dans PTPN3 sont situées au niveau du domaine FERM. Une mutation, située entre le domaine PDZ et le domaine PTP, serait responsable de l'expression d'une forme tronquée de PTPN3 dépourvue de son domaine catalytique. Ces observations suggèrent un rôle important des domaines FERM et PTP dans la régulation de la prolifération cellulaire (224, 451).

b. Oxydation de PTPN4 dans les cellules tumorales

L'oxydation de la cystéine du site actif des PTPs est un mécanisme d'inhibition réversible de leur activité catalytique (452, 453). PTPN4 est sensible à l'oxydation de sa cystéine catalytique. PTPN4 est fortement oxydée dans différentes lignées cellulaires tumorales où la concentration de ROS intracellulaire est élevée (419). Aussi, la régulation de l'état oxydé de PTPN4 pourrait jouer un rôle dans certains cancers.

c. *Profil d'expression*

La surexpression de PTPN4 dans des cellules COS-7 inhibe la prolifération cellulaire. Cette propriété est indépendante de son activité phosphatase (423) et ainsi impliquerait les autres motifs qui composent PTPN4. Dans des cellules de carcinomes humains, PTPN4 inhibe la prolifération cellulaire en déphosphorylant Crk-1. L'interaction de ces deux protéines se fait par l'intermédiaire du motif Pro-rich de PTPN4 et du domaine SH3 de Crk-1. L'extinction du gène codant pour PTPN4 dans ces cellules augmente la prolifération cellulaire. PTPN4 possède donc un rôle anti-tumoral dans ces lignées (391). En ce sens, l'expression de PTPN4 est diminuée dans des métastases de ganglions lymphatiques de cancer de la thyroïde, dans des cancers du sein, dans des lignées cellulaires cancéreuses colorectales ainsi que dans des cellules de leucémie myoblastique (454-458).

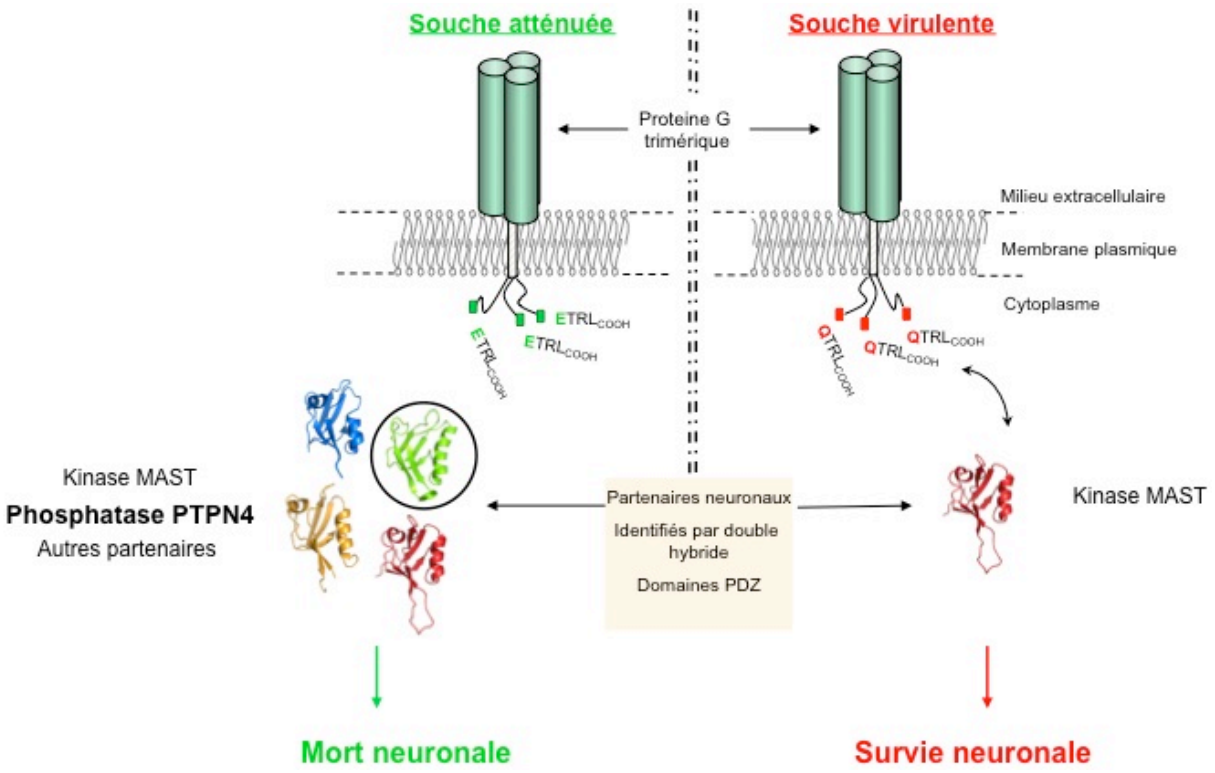
Cependant, l'analyse du niveau d'expression de 22 PTP dans différents tissus gastriques oncogéniques montre que PTPN4 n'est exprimée que dans des lignées cancéreuses et n'est pas détectable dans les lignées saines testées dans cette étude (459, 460). Ces observations ne vont pas dans le sens d'une fonction anti-tumorale de PTPN4 dans ces tissus. De plus, PTPN4 a été associée à un rôle anti-apoptotique par nos collaborateurs. L'extinction de PTPN4 dans des cellules COS-7, fibroblastes de rein de singe, augmente fortement la mort cellulaire (98). Cette fonction a été identifiée lors d'une étude d'une souche atténuée du virus de la rage qui, en ciblant PTPN4, induit la mort des cellules infectées.

d. *Détournement de la fonction cellulaire par le virus de la Rage*

Des souches du virus de la rage modulent de façon différente l'homéostasie cellulaire de neurones en fonction d'une mutation d'un acide aminé de la protéine G virale. Une souche virulente induit la survie des neurones qu'elle infecte, assurant la propagation du virus dans le système nerveux. À l'inverse, une souche atténuée entraîne l'apoptose des neurones infectés (98, 461, 462). La mutation responsable de ces phénotypes est située

en C-terminal du segment cytoplasmique de la protéine G virale qui code pour un PBM. Cette mutation modifie les partenaires neuronaux recrutés par la protéine G des différentes souches virales (Figure 38).

La survie des neurones va dépendre de l'association du PBM de la souche virulente avec le domaine PDZ de la Ser/Thr-kinase MAST2. L'étude de cette interaction et de son rôle dans la contrôle de l'homéostasie cellulaire a été le sujet de thèse d'Elouan Terrien au laboratoire (260). La mutation du PBM viral (Q *vs* E) responsable du phénotype de mort permet à la protéine G d'interagir avec davantage de partenaires neuronaux, notamment PTPN4 (Figure 38) (98).



<u>Figure 38 :</u> Modèle de l'infection des cellules par les souches du virus de la Rage et leur phénotype associé.

Lors d'une infection par la souche virulente (droite), la glycoprotéine virale portant le motif de fixation au domaine PDZ -QTRL$_{COOH}$ interagit avec les kinases cellulaires de la famille MAST et entraîne la survie des cellules. Lors d'une infection par la souche atténuée (gauche), la glycoprotéine virale portant le site de fixation au domaine PDZ -ETRL$_{COOH}$ interagit non seulement avec les kinases de la famille MAST mais aussi avec d'autres partenaires cellulaires, plus particulièrement PTPN4. L'interaction entre PTPN4 et la glycoprotéine déclenche alors l'apoptose des cellules infectées.

L'extinction de l'expression de PTPN4 dans des cellules COS-7 empêche l'induction de l'apoptose par la souche atténuée du virus de la rage. De plus, des peptides codant pour le PBM de la protéine G de la souche atténuée du virus de la rage (PBMatt) et délivrés dans des cellules en dehors de tout contexte d'infection virale sont suffisants pour induire l'apoptose (98). Ainsi, l'interaction de PBMatt avec le domaine PDZ de PTPN4 induit l'apoptose des cellules infectées.

Une étude structurale menée au laboratoire a permis de comprendre comment la simple mutation Q *vs* E en p(-3) des PBM viraux modifie les partenaires recrutés entraînant ainsi les différents phénotypes associés. Cette mutation augmente l'affinité du PBMatt pour le domaine PDZ de PTPN4 (k_d= 160 µM) par rapport au PBMvir (k_d= 570 µM). L'analyse structurale des complexes formés par le domaine PDZ de PTPN4 avec ces PBM révèle que la mutation en p(-3) permet d'établir un pont salin (E) au lieu d'une liaison hydrogène (Q), avec une asparagine du feuillet β2, suffisante pour améliorer l'interaction avec le PBMatt (259). Ce différentiel d'interaction avec PTPN4 a été observé *in cellulo*. L'infection par une souche atténuée entraîne une relocalisation de PTPN4 à la membrane ou se situe la protéine G virale. La relocalisation à la membrane de PTPN4 n'est pas observée lors d'une infection par une souche virulente, ni avec une glycoprotéine tronqué de son PBM. Il a été proposé que la perturbation des interactions de PTPN4 avec ses ligands cellulaires par la protéine G de la souche atténuée inhiberait la fonction anti-apoptotique de PTPN4 et déclencherait ainsi l'apoptose des cellules infectées (98). L'identification des partenaires cellulaires de PTPN4 impliqués dans sa fonction anti-apoptotique est en cours.

De la même façon que la protéine G de la souche atténuée du virus de la rage, des peptides ciblant le domaine PDZ de PTPN4 induisent la mort des cellules. Proposant une compétition avec des partenaires endogènes, le laboratoire a postulé que le peptide le plus affin pour le domaine PDZ de PTPN4 serait le meilleur inducteur de la mort des cellules. Ce postulat entraîna ainsi, sur la base de notre étude structurale, la conception de séquences pro-apoptotiques optimisées. Ce travail a été effectué par l'étudiant en thèse m'ayant précédé, Nicolas Babault (259).

La séquence du PBMatt a d'abord été améliorée en visant la plus forte interaction possible avec le domaine PDZ de PTPN4. Le peptide le plus affin ainsi obtenu est Cyto8-RETEV (du nom de la séquence en acides aminés qui compose son PBM) qui présente une affinité de 1 µM pour le PDZ de PTPN4. Ceci correspond à une augmentation d'un facteur 160 de l'affinité pour PTPN4 par rapport à la séquence initiale du PBMatt. De manière intéressante, une corrélation s'établit entre l'affinité des peptides pour le domaine PDZ de PTPN4 et le niveau d'apoptose induite de glioblastomes, cellules de tumeur extra-crânienne d'enfant. Le peptide Cyto8-RETEV le plus affin pour le domaine PDZ de PTPN4 est ainsi le plus efficace pour induire la mort des glioblastomes (Figure 39) (259).

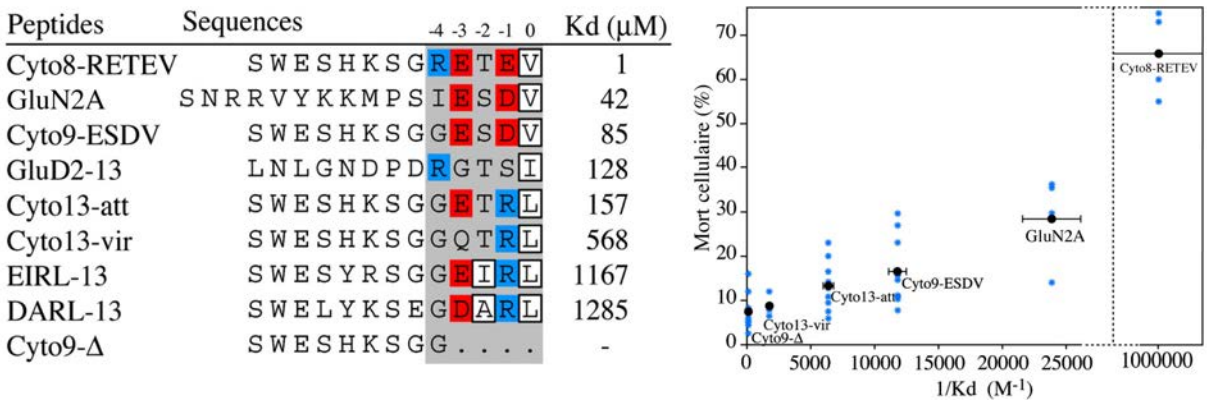


Figure 39 : Modèle de l'infection des cellules par les souches du virus de la Rage et leur phénotype associé.
A gauche : Alignement des peptides en fonction de leurs affinités pour PTPN4-PDZ. Les cinq positions critiques pour l'interaction sont encadrées. Ce sont les résidus qui sont visibles dans les structures de PTPN4-PDZ en complexe. La constante de dissociation des peptides pour PTPN4-PDZ est indiquée en µM. Les résidus acides constituant les PBM sont en rouge, les résidus basiques en bleu, les résidus hydrophobes sont encadrés.
A droite : Représentation du niveau de mort cellulaire (%) induit par les peptides en fonction de leur affinité pour PTPN4-PDZ (M^{-1}). La mort cellulaire est mesurée par l'incorporation d'iodure de propidium après 3 heures de traitement. D'après Babault *et al* (2011) (259)

Aujourd'hui encore, vingt ans après son identification, la fonction cellulaire de PTPN4 est méconnue et le mécanisme par lequel elle contrôle l'homéostasie cellulaire est inconnu. Le ciblage de la phosphatase PTPN4 pourrait néanmoins à l'avenir présenter un intérêt thérapeutique majeur dans le traitement de certains cancers.

3) Implication des domaines PDZ et PTP dans les fonctions biologiques de PTPN4

L'étude des différents domaines de PTPN4 pourrait nous éclairer tant pour l'identification de ses partenaires cellulaires et la régulation de leur interaction que pour apporter une meilleure compréhension de la fonction cellulaire de PTPN4. *In fine*, ces études pourraient conduire à un meilleur ciblage de cette phosphatase et permettre d'induire de manière plus efficace la mort de cellules cancéreuses.

A. Le cas de la phosphatase PTPN4

De l'ensemble de données biochimiques et biologiques de PTPN4 connues à ce jour, plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle concerté de ses domaines PDZ et phosphatase. Premièrement, la partie C-terminale de PTPN4, qui comprend les domaines PDZ et PTP, est résistante à la digestion protéasique et correspond à la forme la plus active de PTPN4 (381). Deuxièmement, il a été proposé aussi bien dans le cas de l'induction de la LTD que dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire que la perturbation de l'interaction du domaine PDZ de PTPN4 avec ses ligands diminue la déphosphorylation de ces derniers, entraînant une dérégulation des voies de signalisation dans lesquelles PTPN4 est impliquée (98, 259, 445).

B. Modèle des homologues PTPN3 et PTPN13

Pour les deux autres tyrosine-phosphatases qui possèdent des domaines PDZ, PTPN3 et PTPN13, leurs domaines PDZ et PTP ont également un rôle crucial dans la régulation de leurs fonctions cellulaires.

Du fait de son interaction avec CD95 (aussi appelé Fas), PTPN13 est un régulateur négatif de l'apoptose, dans les adénocarcinomes de pancréas humain et dans les cellules de cancer du colon (463, 464). Le PBM de CD95 interagit avec les domaines PDZ2 et PDZ4 de PTPN13 (465). Cette interaction est cruciale à PTPN13 pour empêcher la localisation de CD95 à la membrane plasmique, où ce dernier est requis pour induire l'apoptose après fixation à son ligand (FasL) (466). Cette régulation se fait très certainement par la déphosphorylation de CD95 par PTPN13 (466-469). L'utilisation de

peptides mimant le PBM de CD95 et capables d'interagir avec le second domaine PDZ de PTPN13 est suffisante pour induire l'apoptose dépendante de CD95 une fois les peptides délivrés dans des cellules de cancer du colon (464).

PTPN3 induit quant à elle une prolifération oncogénique dépendante de RAS dans des cellules de cancer colorectal en interagissant avec la kinase p38γ de la famille des *Mitogen Asoociated Protein Kinase* (MAPK) (470). Cette kinase possède en C-terminal un PBM qui interagit avec le domaine PDZ de PTPN3. Cette interaction induit la déphosphorylation de cette kinase. Il est établi que la déphosphorylation de P38γ joue un rôle essentiel dans l'induction de la transformation oncogénique RAS-dépendante (471, 472). Un peptide codant pour le PBM de P38γ, empêche la formation du complexe de PTPN3 et P38γ et provoque l'augmentation de la phosphorylation de la kinase. Ce peptide est suffisant, lorsqu'il pénètre dans la cellule, pour bloquer la transformation tumorale. Il est ainsi proposé que PTPN3 régule la prolifération cancéreuse de cellules en déphosphorylant P38γ suite à leur interaction PBM/PDZ (470).

Ces deux exemples mettent en évidence le rôle critique que joue le recrutement d'un partenaire par le domaine PDZ pour contrôler l'apoptose ou la transformation oncogénique. Un mécanisme, similaire à celui de PTPN4, a été proposé pour expliquer leurs fonctions cellulaires impliquant un fonctionnement concerté entre les domaines PDZ et phosphatase pour déphosphoryler des tyrosines présentes sur les partenaires (98, 469, 470).

PROBLÉMATIQUE

L'organisation modulaire des protéines détermine leurs fonctions et leurs régulations. Je me suis intéressé lors de cette thèse sur le rôle fonctionnel et structural des domaines PDZ au sein de protéine tyrosine phosphatases.

Le ciblage des domaines PDZ de ces tyrosine phosphatases, aussi bien par des virus que par des peptides synthétiques, engendre des perturbations drastiques de leurs fonctions cellulaires. L'infection par une souche atténuée du virus de la rage altère les fonctions anti-apoptotiques de PTPN4 et induit la mort des cellules. Ceci est du à l'interaction de la glycoprotéine virale avec le domaine PDZ de PTPN4. Parallèlement, des peptides synthétiques affins pour le domaine PDZ de PTPN4 sont capables de provoquer par eux-mêmes la mort cellulaire. De la même façon, des peptides synthétiques ciblant les domaines PDZ de deux autres PTP homologues de PTPN4, PTPN3 et PTPN13, suffisent pour altérer leurs fonctions et induire soit la survie soit la mort des cellules.

Le ciblage du domaine PDZ de ces phosphatases est ainsi une étape clé dans la perturbation de leurs fonctions cellulaires. Parmi les multiples rôles que peuvent jouer les domaines PDZ dans cette perturbation, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de régulation du domaine PDZ de PTPN4, et de ses ligands, sur l'activité catalytique du domaine phosphatase de PTPN4.
Les domaines PDZ ont en effet la capacité de réguler des domaines catalytiques. Ceci est néanmoins très peu documenté et uniquement décrit dans la famille des protéases HtrA. Elle pourrait cependant se révéler être une fonction plus récurrente. Les domaines tyrosine-phosphatases sont quant à eux caractérisés par leur combinaison avec différents types de domaines qui peuvent directement contrôler leur activité catalytique. La fonction de ces tyrosine-phosphatases est dans certains cas dépendante de leurs domaines adjacents.

Le premier objectif de ma thèse fut ainsi de mettre à jour la régulation de l'activité catalytique de PTPN4 par son domaine PDZ et ses ligands d'un point de vue

enzymatique. De manière réciproque, nous avons étudié par titration calorimétrique isotherme l'influence du domaine phosphatase sur le recrutement de ligand au domaine PDZ. Nous avons par la suite détaillé les mécanismes moléculaires qui régissent cette régulation inter-domaine. Pour cela, une étude structurale en solution à basse résolution des deux domaines fut entreprise. Les résultats de cette étude nous ont alors amenés à caractériser par RMN la dynamique des deux domaines PDZ et PTP, afin de mettre en évidence un mécanisme de communication entre eux deux. L'ensemble des résultats qui englobe cette étude structure-fonction sera détaillé dans la première partie des résultats.

Nous avons voulu par ailleurs identifier quel effecteur cellulaire de PTPN4 protège la cellule de la mort. En effet, les effecteurs de cette fonction restent, jusqu'à présent, inconnus. Peu de ligands cellulaires de PTPN4 ont été identifiés et ceux qui interagissent avec son domaine PDZ ne régulent pas l'homéostasie cellulaire. Nous avons alors entrepris l'identification de la voie de signalisation en aval de PTPN4 et le partenaire de la phosphatase impliqué dans la régulation de la mort cellulaire. Nous nous sommes ensuite intéressés aux propriétés d'interaction *in vitro* de ce partenaire avec les domaines PDZ et PTP de PTPN4. Nous avons analysé l'interaction du PBM du partenaire avec le PDZ de PTPN4 par cristallographie par rayons-X. Nous avons ensuite détaillée par enzymologie la déphosphorylation de ce partenaire par la phosphatase de PTPN4. Nous savons que les domaines combinés aux PTP peuvent participer au recrutement des substrats des phosphatases. Aussi, du fait de la proximité des domaines PDZ et PTP de PTPN4, nous avons étudié comment le PDZ participerait à la présentation du partenaire au site catalytique de la phosphatase. Nous présenterons les résultats obtenus lors de cette étude dans la deuxième partie des résultats.

RÉSULTATS

RÉSULTATS I : RÉGULATION INTRAMOLÉCULAIRE DE L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DE LA PHOSPHATASE HUMAINE PTPN4 PAR SON DOMAINE PDZ

1) Résumé

PTPN4 possède une fonction anti-apoptotique dans la cellule. L'interaction de son domaine PDZ avec un peptide contenant un PBM abolit sa fonction et induit l'apoptose des cellules. Le domaine PDZ de PTPN4 est situé à proximité de son domaine catalytique. Nous avons montré lors de cette étude que ce domaine PDZ a la capacité d'inhiber l'activité catalytique de la phosphatase PTPN4. La fixation d'un ligand au domaine PDZ est suffisante pour lever cette inhibition catalytique. Afin de comprendre comment le domaine PDZ peut contrôler l'activité de PTPN4, nous avons utilisé un ensemble de techniques biophysiques telles que l'ultracentrifugation analytique, le SAXS et la RMN. Nous avons démontré que le supramodule PDZ-PTP adopte une conformation compacte et monomérique suggérant un mécanisme de régulation intramoléculaire. La fixation d'un ligand au domaine PDZ perturbe les interactions transitoires entre les deux domaines et rétablit les propriétés catalytiques de PTPN4. Nos résultats mettent à jour pour la première fois un mécanisme d'autorégulation d'une tyrosine-phosphatase par un domaine PDZ. Cette étude améliore nos connaissances sur la régulation des tyrosine-phosphatases et peut s'appliquer à d'autres tyrosine-phosphatases possédant des domaines PDZ. De plus, elle renforce la notion émergente que les domaines PDZ peuvent, au-delà de leur simple fonction de domaine d'architecture, fonctionner comme des régulateurs des fonctions d'enzyme et ainsi participer à la régulation dynamique des voies de signalisation cellulaire.

2) Article 1 – Maisonneuve *et al* (submitted)

Allosteric Regulation of the Catalytic Activity of the Human Phosphatase PTPN4 by Its PDZ Domain

*†‡Pierre Maisonneuve, *†Célia Caillet-Saguy, §Bertrand Raynal, ‖ Bernard Gilquin, *†Alain Chaffotte, ¶Javier Pérez, ‖ Sophie Zinn-Justin, *†Muriel Delepierre, **Henri Buc, *†Florence Cordier, *†Nicolas Wolff

* Département de Biologie Structurale et Chimie, Unité de Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules, Institut Pasteur, F-75724 Paris, France.
† UMR 3528, CNRS, F-75724 Paris, France.
‡ Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.
§ Plate-Forme de Biophysique des Macromolécules, Institut Pasteur, F-75724 Paris, France.
‖ Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie, CNRS UMR 3528, CEA Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France.
¶ SOLEIL Synchrotron, L'Orme des Merisiers Saint-Aubin, 91190 Gif-sur-Yvette, France.
** Institut Pasteur, F-75724 Paris, France.

Short title: Allosteric regulation of the catalytic activity of PTPN4

Correspondence should be addressed to Nicolas Wolff.
Unité de RMN des biomolécules
Institut Pasteur-URA 2185 CNRS
28, rue du Dr Roux
75724 Paris cedex 15
E-mail: nicolas.wolff@pasteur.fr
tel : +33 (0)1 45 68 88 72 ; fax : +33 (0)1 45 68 89 29

Summary

The human tyrosine phosphatase PTPN4 protects cells against death. Targeting its PDZ domain abrogates this protection and triggers apoptosis. We demonstrate here that this domain inhibits the phosphatase activity of PTPN4. The mere binding of a PDZ ligand is sufficient by itself to release the catalytic inhibition. To understand how the PDZ domain controls PTPN4 activity, we combined biophysical approaches using analytical ultracentrifugation, SAXS, X-rays and NMR. We show that the phosphatase-PDZ supramodule adopts a compact conformation. The PDZ ligand disrupts the transient inter-domain communication, thereby allosterically restoring the catalytic competence of PTPN4. Our results highlight an auto-regulation mechanism of a phosphatase by an adjacent PDZ domain. This study strengthens the emerging notion that PDZ domains can act as regulators of enzyme activity and therefore are active players in the dynamic regulation of signaling pathways.

Introduction

Protein-tyrosine phosphatases (PTPs) represent the largest family of phosphatases. The crucial role of these enzymes as regulators of signal transduction is highlighted by many recent results showing a disruption of PTP function in human diseases [1]. Classical PTPs can be categorized as transmembrane receptor-like (R) or intracellular non-transmembrane (NT) proteins. One of the most striking features of the PTP families is their modular organization [2]. The NTPTPs are characterized by regulatory sequences that flank the catalytic domain and control activity either directly, by interacting with the active site, or more indirectly, by controlling substrate specificity [3, 4]. These non-catalytic sequences can also control subcellular distribution, thereby indirectly regulating activity by restricting access to particular substrates at defined subcellular locations [5].

Three NTPTPs contain PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) modules flanking their catalytic domain: PTPN3 (PTPH1) and PTPN4 (PTPMEG1) proteins, that form the NT5 subgroup, contain a single copy of this domain contrary to PTPN13 (PTPBas) encompassing five PDZ domains. PDZs are globular structures, 80 to 100 residues long, well known for mediating transient protein-protein interactions [6]. Abundant in various species, they play a central role in cell signaling by favoring spatial contacts between enzymes and their substrates, or more generally by assembling and/or regulating protein networks [7].

PTPN4 is composed of three domains: a N-terminal FERM domain (a plasmic membrane interaction domain), a PDZ domain and a C-terminal PTP domain (Figure 1A). Multiple serine and threonine phosphorylation sites, SH3 binding motifs, two PEST sequences and cleavage sites are found in the region upstream of the PDZ domain. PTPN4 is proteolyzed by calpain in human platelets in response to physiological stimuli, leading to enzyme activation [8]. *In vitro*, PTPN4 is cleaved by both trypsin and calpain and is thereby activated. The active form of PTPN4 consists of the PDZ and PTP domains. PTPN4 is involved in T-cell receptor (TCR) cell signaling, long-term depression (LTD) and cerebellar synaptic plasticity [9-11]. Overexpression of the phosphatase negatively regulates cell proliferation in COS-7 cells and suppresses CrkI-mediated cell growth and motility in HEK293T cells [12, 13]. Three endogenous partners of PTPN4 have been reported: the glutamate receptor δ2 and ε subunits, the TCR ξ subunit and the CrkI

oncoprotein [11, 13, 14]. However, the mechanism by which PTPN4 regulates cell proliferation remains unclear.

We previously demonstrated the critical role of PTPN4 in the control of neuronal cell death [15]. In others words, PTPN4 protects cells against apoptosis. Targeting its PDZ domain was shown to abrogate this protection. We established that the efficiency of peptides, encoding a PDZ binding motif (PBM), to trigger cell death is correlated to their *in vitro* affinity for the PDZ domain of PTPN4 [16]. PTPN3, the closest homologous protein of PTPN4, was recently identified as a p38γ-specific phosphatase [17]. Hou and coll. revealed a cooperative oncogenic activity of p38γ MAPK (also named MAPK12 or ERK-6) with PTPN3 through a direct interaction between the PBM of p38γ and the PDZ domain of PTPN3. Although, as was shown for PTPN4, targeting the PDZ domain is the crucial initial step to hijack the phosphatase function, there is still no indication about the regulation of the catalytic activity of this phosphatase by its PDZ domain.

To improve our understanding of the mechanisms regulating PTPN4 activity, we performed enzymatic and structural studies of its PDZ-PTP bidomain. We show that the PDZ domain of PTPN4 downregulates the phosphatase activity through intramolecular interactions. Moreover, a ligand bound to the PDZ domain abrogates this catalytic inhibition. We document the essential role played in this mechanism by the flexible and disordered interdomain linker, a sequence of 33 residues. Our structural results, combining analytical ultracentrifugation, small angle X-ray scattering and NMR, reveal that the PDZ-PTP bidomain adopts a compact conformation in solution that relaxes in the presence of the PDZ ligand.

Experimental procedures

Protein Expression

The PDZ, PDZ-linker and linker-PTP are encoded as an N-terminal gluthathione S-Transferase (GST)-Tagged protein in a pDEST15 expression plasmid for the PDZ and in a pET41 expression plasmid for the PDZ-linker and the linker-PTP. The PDZ-PTP^{WT} and the PDZ-PTP$^{C/S}$ are encoded as an N-Terminal 6 histidine (His) tagged protein in a pET41 and in a pET15b expression plasmid, respectively. A TEV cleavage site is introduced between the N-terminal Tag and the protein sequence. After TEV cleavage, a

non-native N-terminal residue is present due to the TEV cleavage sequence. The vectors were used to transform *Escherichia coli* BL21 (DE3) star cells (Invitrogen). Proteins were expressed and purified according to previously described procedures [16] (see also Supplemental Data). PDZ ligands and the phosphotyrosyl pTyr peptide (ADSEMTGY^{p}VVTR) were synthesized in solid phase using a Fmoc strategy (Proteogenix).

ITC

ITC experiments were performed with an ITC-200 (MicroCal) at 25°C, with buffer A (more information in the Supplemental Data) with 0.5 mM TCEP. Protein concentrations in the cell were initially around 30 µM, whereas peptide concentrations in the syringe were 350 µM. 26 aliquots of 1,5 µl of peptide were injected from the 40 µl syringe into the 200 µl cell, leaving an interval of 180 sec between injections. The enthalpy of binding (ΔH), affinity constant (K_a) and molar binding stoichiometry (N) were obtained directly from the titration curve fitted with the single-site binding model of Origin software.

Analytical ultracentrifugation

Sedimentation velocity experiments were carried out at 25°C. Various protein and protein-peptide complex concentrations (ranging from 3.5 to 14 µM) were centrifuged at 36,000 rpm. The processed data were used to obtain values of sedimentation coefficients at null concentration in our experimental conditions (S0) (Figure S1; see also Supplemental Data), and to get the standard sedimentation coefficients in water at 20°C ($S_{0,w,20}$) (Tab. 2).

Enzymatic assays

Phosphatase activity with phospho-peptides was measured using the EnzCheck® (Invitrogen) continuous spectrophotometric. Reactions were measured in 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 200 µM MESG (2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside), 1 U/ml PNP, 10 nM phosphatase enzyme and various phospho-peptide concentrations ranging from 2.7 µM to 350 µM. pNPP was assayed for concentrations ranging from 19 µM to 10 mM. Specific activities towards pNPP and pTyr peptide were measured at an enzyme concentration of 75 nM and 10 nM, respectively. Further details are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

NMR sample preparation

NMR sample buffer was buffer A at pH 7.5 supplemented to a final concentration of 5 mM TCEP. D2O (12 %) was added to NMR samples. Final concentrations of $^{15}N/^{13}C$ PDZ-linker, ^{15}N PDZ-PTP^{WT}, ^{15}N PDZ-PTP$^{C/S}$ and ^{15}N linker-PTP were 450 μM, 30 μM, 400 μM and 110 μM, respectively. For NMR experiments with complexed PDZ-PTP, the dried unlabeled peptide Cyto8-RETEV at pH 7.2 was added to PDZ-PTP$^{C/S}$ sample reaching a final peptide concentration of 1 mM.

NMR experiments

NMR experiments were carried out at 25°C on a Varian Inova 600 MHz spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara) and on a 950 MHz (Bruker, Germany) equipped with cryoprobes. The sequence specific ^{1}HN, ^{15}N, Cα and CO backbone resonance assignments of PDZ-linker were based on the following experiments: $^{1}H–^{15}N$ HSQC, 3D HNCO, 3D CBCA(CO)NH and 3D HNCACB. $^{1}H–^{15}N$ HSQC-TROSY experiments were performed with time domain data sizes of 1024 × 128, 1024 × 80 and 1024 × 180 complex points for PDZ-linker, linker-PTP and PDZ-PTP$^{C/S}$, respectively. Average (^{1}H, ^{15}N) chemical shift changes between constructs were calculated as $\Delta\delta_{av} = [(\Delta\delta_H)^2 + (\Delta\delta_N \times 0.159)^2]^{1/2}$. Data processing and analysis were performed using NMRPipe (18), NMRView 5.2.2 (19) and Analysis (20). The ^{15}N longitudinal (R_1) and transverse (R_2) relaxation rates were recorded in an interleaved manner at 25°C and at 600 MHz ^{1}H frequency.

SAXS

Synchrotron radiation x-ray scattering data were collected on SWING Beamline at Synchrotron SOLEIL France, using the online HPLC system [21] and data were analyzed using programs in the ATSAS package [22]. The modelization of the PDZ-PTP^{WT} conformations was performed using CNS and DADIMODO. Details of these experiments can be found in the Supplemental Experimental Procedures.

Results

The Phosphatase catalytic activity of PTPN4 is inhibited by the PDZ domain.

Two fragments of PTPN4 were expressed *in Escherichia coli* and purified (see Materials and Methods). The first construct, called linker-PTP, encompasses the C-terminal sequence of PTPN4 from residue 611 to 926 comprising the inter-domain linker and the phosphatase domain. The second construct covers the sequence from residue 499 to 926, and encompasses the PDZ domain, the linker and the phosphatase domain (called PDZ-PTP^{WT}) (Figure 1A). These fragments were first assessed for their ability to hydrolyze p-Nitrophenyl Phosphate (*p*NPP), a widely used non-specific chemical phosphatase substrate. Alternatively, we used a phosphotyrosine-containing peptide (pTyr) derived from the activation loop of p38γ. The p38γ kinase has been described as a cellular substrate of PTPN3, the closest homologous protein of PTPN4 (sequence identity of 51% between their full-length sequences, and of 65 % between their catalytic domain sequences) [17]. Therefore, we postulate that PTPN4 also has the ability to dephosphorylate the activation loop of p38γ.

Both linker-PTP and PDZ-PTP^{WT} dephosphorylated the *p*NPP and pTyr substrates following Michaelis-Menten kinetics. The initial reaction rates at each substrate concentration were independently measured at pH 7.5 and 25°C (Figure 1B). The Michaelis constant (K_M) and the turnover number (k_{cat}) values were deduced by fitting the experimental data to the Michaelis-Menten equation (Table 1). The k_{cat}/K_M ratio (an index of the catalysis efficiency) is nearly 100 fold higher for pTyr peptide than that for pNPP.

Using *p*NPP, the k_{cat} value decreased by 3.3 fold when comparing linker-PTP with PDZ-PTP^{WT} (5.0 ± 0.2 s^{-1} *vs* 1.5 ± 0.1 s^{-1}). This inhibitory effect was exacerbated when using the pTyr peptide as a substrate: k_{cat} decreases by 6.5 fold (11.7 ± 0.1 s^{-1} *vs* 1.8 ± 0.1 s^{-1}). Using PDZ-PTP^{WT} instead of linker-PTP reduces the observed K_M value for *p*NPP as well as for peptidic substrate. The K_M value for PDZ-PTP^{WT} decreases by 2.2 fold and by 3.8 fold compared with the ones calculated for linker-PTP using pNPP and the pTyr peptide, respectively. These compensatory effects explain the small change in the k_{cat}/K_M ratio (1.5 and 1.7) when comparing linker-PTP to PDZ-PTP^{WT} using *p*NPP and the pTyr peptide as substrates (Table 1).

Altogether, these data indicate that the PDZ domain linked to the PTP domain significantly affects the catalytic activity of the PTP domain. The presence of the PDZ domain leads to a mixed inhibition type, since the PDZ-PTP^{WT} affinity for the pNPP and pTyr peptide substrates is better than that of the linker-PTP. Hence, the PDZ domain affects the affinity for the PTP substrate and the catalytic activity of the enzyme in opposing manner.

To check if this inhibition could also occur when the two domains are not tethered, the rates of pNPP hydrolysis of the linker-PTP were measured upon trans-addition of the PDZ domain (construct running from residue 499 to 604; Figure 1A). The catalytic activity of linker-PTP was left unaffected by the presence of the PDZ domain (Figure 1C; left panel). Furthermore, when the PDZ domain is added with a molar ratio 80:1 to the PDZ-PTP^{WT} sample, no influence from the PDZ addition was observed (Figure 1C; right panel). PDZ and PTP domains have to be covalently linked to ensure the inter-domain regulation mechanism in this protein concentration range.

Binding of a PDZ ligand reverses the interdomain inhibition.

We then asked whether the binding of a catalytically inactive ligand to the PDZ domain could affect this catalytic regulation and in turn modulate the phosphatase activity. The PDZ-PTP^{WT} kinetic parameters were measured upon PDZ ligand binding. For this purpose, we used the Cyto8-RETEV peptide, previously shown as the best affine peptide of the PDZ domain of PTPN4 (dissociation constant, K_d, of 1 µM) [16].

Kinetic analysis of PDZ-PTP^{WT} for the hydrolysis of pNPP was achieved at various concentrations of the Cyto8-RETEV peptide with a saturating concentration pNPP of 2.5 mM (Figure 1D). The initial rates (v_0) increased with the addition of the Cyto8-RETEV peptide. The maximal effect with an increase of v_0 of 2.1 fold is observed at a concentration of 20 µM of PDZ ligand, a concentration sufficient to saturate 95 % of the PDZ binding site. Similar stimulating effects were observed upon addition of other unrelated sequences of PTPN4-PDZ ligands (Figure 1E; left panel), such as the C-terminal peptide region of the glycoprotein of an attenuated Rabies virus strain (Cyto13-att) that targets PTPN4 during infection [15].

To determine whether this increase in the activity was strictly dependent on the presence of a PBM, we used two variants of the viral peptide Cyto13-att. The first variant corresponds to a tetrapeptide encompassing the last four residues (ETRL) that are

essential to the PDZ binding. ETRL induced *per se* an enhancement of the PDZ-PTP^{WT} activity (Figure 1E; left panel). By contrast, the peptide Cyto9-Δ4 lacking the last four residues matching the PBM, and therefore unable to bind PTPN4-PDZ, has lost the stimulating ability. To exclude any contribution of a non-specific interaction between the PDZ ligand and the catalytic domain of the PTP in this stimulation, we measured the activity of the isolated phosphatase domain linker-PTP upon addition of Cyto8-RETEV. Under these conditions, the catalytic activity of linker-PTP was unaffected (Figure 1E; right panel). We conclude that the peptide enhances the catalytic activity of the bidomain construct through its binding to the PDZ domain.

The kinetic analysis of PDZ-PTP^{WT} was then carried on with pNPP and pTyr as substrates and in the presence of Cyto8-RETEV at a concentration (40 µM) sufficient enough to ensure the maximal effect of the PDZ ligand on the phosphatase activity (Figure 1B). Both the k_{cat} and K_M values significantly increased in the presence of Cyto8-RETEV at saturating concentration, showing that the release of the inhibition operates with a partial compensation of the effect on the two rate constants (Table 1). The stronger effect of Cyto8-RETEV is reflected by the k_{cat} values. These values are 2.5 fold and 4.7 fold higher than those in the absence of PDZ ligand using pNPP and pTyr substrates, respectively. The increase in K_M values in the presence of Cyto8-RETEV is 2.4 and 3.2 fold higher, respectively (Table 1). The release of the inhibition however seems slightly different between the two substrates. Indeed, the hydrolysis of the less specific substrate, *p*NPP, proceeds with a k_{cat}/K_M ratio that remains almost unchanged in the presence or absence of the effector peptide. On the other hand, pTyr dephosphorylation is activated through an almost complete restoration considering the activity of the monodomain linker-PTP (Table 1). This value is still lower than the one obtained when using the monodomain linker-PTP alone. Despite these differences, the main effect resulting from the occupancy of the PDZ binding site is an almost complete abolition of the inhibitory effect exerted by the PDZ domain on the efficiency of the catalysis.

PTPN4 interdomain regulation operates through an intramolecular process.

Next, we addressed the mechanism by which PBM binding affects PTPN4 catalytic activity. One hypothesis was that the activation of PDZ-PTP^{WT} upon PBM binding was related to the modification of its oligomeric state. Analytical ultracentrifugation (AUC) experiments were performed to characterize the hydrodynamic properties of PDZ-

PTP^{WT} in its free state or complexed with Cyto8-RETEV. Both free and complexed forms of PDZ-PTP^{WT} are present as a single species over a protein concentration range from 3.5 to 14 µM. They display similar sedimentation coefficient values ($S_{20,w}$), 3.43 ± 0.02 S for the free form and 3.46 ± 0.03 S for the complexed form. These $S_{20,w}$ values are in agreement with a compact globular protein of 50 kDa (Table 2; Figure S1). We conclude that the phosphatase regulation by the PDZ domain and its ligand takes place through an intramolecular mechanism within the monomeric form of PDZ-PTP^{WT}.

The binding of the PDZ ligand is not affected by the adjacent regions.

The presence of adjacent domains or regions could be expected to affect the affinity of ligand for PDZ domain as demonstrated for MAGUK proteins [23]. Similar effects were sought here using various extensions of the PDZ domain. Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to yield first the thermodynamic binding characteristics of complexes between the PDZ domain, the PDZ-linker construct (from residues 499 to 637) or the PDZ-PTP^{WT} bidomain, and the peptide Cyto8-RETEV (Figure 1A). This peptide binds to PDZ with a K_d value of 3.2 ± 0.2 µM, an affinity slightly better than that for the PDZ-linker construct (5.3 ± 0.5 µM) and close to the one found for PDZ-PTP^{WT} (3.9 ± 0.5 µM) (Table 3). The interactions within these complexes are mainly driven by a favorable enthalpy contribution (ΔH between -11.6 and -13.7 kcal/mol). Therefore, the presence of the linker or of the phosphatase domain does not affect the binding of the PDZ ligand.

Since the peptide binding to PDZ increases the K_M for the substrate by a factor of 2 to 3, we looked whether we could detect a reciprocal effect of pTyr peptide binding to the phosphatase domain on the binding of PDZ peptide. In order to stabilize the complex formed by PDZ-PTP and the hydrolyzable pTyr peptide, we used PDZ-$PTP^{C/S}$, an inactive variant of the phosphatase. In this mutant protein, the cysteine residue of the active site within the PTP signature motif has been replaced by a serine, avoiding the formation of the cysteinyl-phosphate intermediate [24]. This substrate-trapping mutant is assumed to mainly retain the structural and substrate binding properties of the wild-type phosphatase. The affinities and thermodynamic parameters of peptide Cyto8-RETEV binding to PDZ-$PTP^{C/S}$, free or complexed with pTyr, were determined by ITC and are reported in Table 3. The affinity of Cyto8-RETEV for PDZ-$PTP^{C/S}$ (K_d of 1.4 µM) is of the same order of magnitude as that for the wild-type protein (K_d of 3.9 µM). Moreover, the

affinity of PTP-PDZ$^{C/S}$ for Cyto8-RETEV is barely decreased by the presence of the pTyr peptide (K_d of 2.0 µM). Thus, the binding of a substrate to the phosphatase active site does not affect the affinity of a peptide ligand to the PDZ domain.

The overall compact shape of PDZ-PTP is not affected by PDZ peptide binding

We next made the hypothesis that the PBM binding affects the interdomain interaction of PDZ-PTP^{WT}. The overall structural organization of free PDZ-PTP^{WT} was compared with that of PDZ-PTP^{WT} complexed to PDZ ligand (Cyto8-RETEV) using analytical ultracentrifugation and small angle X-ray scattering techniques (SAXS). To minimize contribution of small aggregates to the scattering, SAXS measurements were acquired in line during elution of the protein sample from a gel filtration column. High quality SAXS data were collected in the apex region of the elution peak. The molecular weights derived from the Guinier analyzes of the SAXS data (scattered intensity as a function of the angle) reveal no sample aggregation. In agreement with the AUC experiments, we found that the free and complexed PDZ-PTP^{WT} behave as a monodisperse distribution of monomers in solution (Table 2). The estimated molecular masses of PDZ-PTP^{WT}, free and complexed, derived from the extrapolated intensity at the origin I(0), are consistent with a globular protein of 50 kDa (Tables 2 & S1).

The SAXS profiles of free and complexed PDZ-PTP^{WT} are very similar, reflecting their common global fold (Figure 2A & 2B). The maximum distance of the protein (D_{max}) and the radius of gyration (R_g) can be derived from the electron pair distance distributions function P(r). The D_{max} and R_g values are respectively 160 Å and 34.7 ± 0.2 Å for free PDZ-PTP^{WT}, and 165 Å and 34.3 ± 0.2 Å for complexed PDZ-PTP^{WT} (Table 2). These values are substantially larger than the ones expected for a spherical protein of 431 residues with calculated values of Dmax≈ 90 Å and R_g≈ 23 Å, highlighting the elongated shape of PDZ-PTP^{WT} [25]. Such an elongated shape is consistent with the frictional ratios (f/f_0) measured by AUC on both the unliganded and liganded forms of PDZ-PTP^{WT}, which are 1.46 and 1.47 values, respectively [26]. The dimensionless Kratky plots ($q^2I(q)$ *vs* q) for both PDZ-PTP^{WT} free and complexed with PDZ ligand are in agreement with a rather compact structure of PDZ-PTP^{WT} (Figure 2C).

The SAXS and AUC data indicate that the overall elongated but compact shape of PDZ-PTP^{WT} is not modified by peptide binding onto the PDZ domain. However, PDZ-PTP^{WT} could exhibit a number of different conformations in solution; a dynamic

averaging caused by such an interdomain motions could then lead to the same average value for the static parameters [27]. Most of these conformations would be locked in an inhibited state, but peptide binding on the PDZ domain would unlock this inhibition by favoring a subpopulation having catalytic properties similar to the one displayed by the isolated catalytic domain.

In order to show that such a conformational degeneracy can account for our data, we generated a subset of conformers from a large random pool that together best fit the experimental data. Therefore, we modeled 12,000 structures of PDZ-PTP^{WT} on the basis of the X-ray structures of PDZ (PDB code: 3NFL) and of PTP (PDB code 2I75) using either Molecular Dynamics (MD) or the Dadimodo genetic algorithm [28]. During the MD and Dadimodo protocols, the two domain structures are fixed and the linker is in random conformations, generating a large amount of interdomain orientations. Dadimodo provides structural models refined against SAXS data. Alternatively, back-calculated SAXS curves are obtained for each of the MD models using CRYSOL and are superimposed onto the experimental SAXS. The χ value, deduced from the difference between the calculated curves and the experimental data, is used to select the best MD models. The SAXS curve averaged on the 10 models with the best χ values is superimposed onto the experimental curve on Figure 3A. Analysis of models calculated using both methods showed that the error function measuring the difference between the experimental and calculated SAXS values is randomly distributed along zero for all q values as expected for random errors. Barycenter distances between PDZ and PTP domains were plotted against the χ values (Figure 3B). Among the 12,000 calculated structures, the 60 models of lowest χ values converge to an inter-barycenter distance of 45.4 ± 5.1 Å for MD and of 45.5 ± 3.9 Å for Dadimodo. Thus, the best models generated by both methods reflect the SAXS data and show that the interdomain distance is comprised between 40 and 50 Å. In order to improve the selection of conformers, the back-calculated AUC sedimentation velocity characteristics were calculated for each of these models. Five selected models that are in agreement both with the experimental SAXS data and the AUC hydrodynamic parameters are shown in Figure 3C. In these structures, the two domains are always in close proximity but display various interdomain orientations. Altogether, our data are thus consistent with an elongated and compact domain organization of PDZ-PTP^{WT} characterized by an interdomain distance of about 45 Å.

Different dynamic behaviors of PDZ-PTP free and complexed probed by NMR

To assess the possibility that the binding of PBM affects the interaction between the two domains, we investigate the conformational and dynamic behaviors of the free and complexed PDZ-PTP bidomain by NMR. As PTP-PDZ^{WT} was expressed at a low level, the PDZ-PTP$^{C/S}$ mutant was mainly used for NMR experiments. ^{15}N transverse relaxation optimized spectroscopy-heteronuclear single quantum correlation (TROSY-HSQC) spectra of PTP-PDZ^{WT} and PDZ-PTP$^{C/S}$ are substantially identical (data not shown). Thus, the mutation C/S does not affect the global protein conformation. The constructs linker-PTP and PDZ-linker (Figure 1A) were also characterized by NMR to compare their spectra with those of PTP-PDZ $^{C/S}$ (Figure 4A). Our previous assignment of the PDZ domain was used to identify the resonances of the PDZ in the PDZ-linker and PDZ-PTP constructs [16]. We have also assigned the resonances of the linker (residue 605 to 637). Most of the PDZ-linker resonances dominate the ^{15}N TROSY-HSQC spectra of PDZ-PTP$^{C/S}$; they were easily identified from an overlay of the HSQC spectra of PDZ-linker and PDZ-PTP$^{C/S}$ (Figure S3A), which indicates that the overall structure of the PDZ-linker domain is not modified in the PDZ-PTP construct. The average ^{1}H, ^{15}N chemical shift perturbations ($\Delta\delta$) of PDZ-linker due to the presence of PTP in the PDZ-PTP$^{C/S}$ construct are modest with $\Delta\delta$ values between the resonances of PDZ-linker and PDZ-PTP$^{C/S}$ lower than 0.054 Å with a mean $\Delta\delta$ value of 0.020 ± 0.012 Å (Figure S3B). Futhermore, upon addition of a PDZ ligand, no substantial chemical shift differences of the PDZ domain residues were observed in PDZ-PTP$^{C/S}$ relative to the isolated liganded PDZ. In conclusion, we did not observe any stable surface of interaction between PDZ and PTP domains through the mapping of the chemical shift perturbations of free and PBM bound PDZ-PTP$^{C/S}$ by NMR.

^{15}N relaxation data provide information about local and global dynamics in proteins. To probe the intramolecular flexibility between PDZ and PTP domains, the ^{15}N longitudinal (R_1) and transverse (R_2) relaxation rates R_2 of PDZ, PDZ-linker and PDZ-PTP$^{C/S}$ with and without PDZ ligand were measured at 25°C and at 600 MHz. The R_2 values (averaged over the PDZ residues) are 10.3 s^{-1} for free PDZ, 15.1 s^{-1} for free PDZ-linker and 32.1 s^{-1} for free PDZ-PTP$^{C/S}$ (Figure 4B). As R_2 is, to a first approximation, a measure of the global rotational correlation time τ_c, we can roughly estimate that PDZ-PTP$^{C/S}$ without a ligand has a τ_c consistent with the one displayed by a 50 kDa protein assuming isotropic

overall rotation (Figure 4C). For PDZ-linker, we noticed a significant increase (4.8 s^{-1}) of the mean R_2 value as compared to the PDZ construct, reflecting the effect of the long linker on the PDZ global dynamic. In both free and complexed PDZ-$PTP^{C/S}$, the linker is highly flexible in the fast timescale and is unstructured. Interestingly, the addition of the PDZ ligand to the PDZ-$PTP^{C/S}$ bidomain drastically reduced the mean R_2 value of PDZ from 32.1 s^{-1} to 17.4 s^{-1}, which tends towards the R2 value of the liganded PDZ-linker monodomain (16.6 s^{-1}). Moreover, the mean R_1 rate (averaged over the PDZ residues) of the PDZ-$PTP^{C/S}$ bidomain (1.19 s^{-1}) increases upon addition of a PDZ ligand (1.33 s^{-1}) and tends towards the R_1 values measured for the isolated liganded PDZ domain (1.43 s^{-1}). Therefore, as monitored both by R_1 and R_2 relaxation rates, the PDZ in the bidomain construct reorients more rapidly in solution, when it is liganded (Figures 4B & 4C). We conclude that the binding of a peptide to the PDZ domain increases the global tumbling of the PDZ domain in the context of the bidomain: transient intramolecular interactions that were restraining PDZ mobility in free PTPN4 are now destabilized in the presence of the PDZ ligand.

Discussion

Our aim was to characterize at the molecular level how the PDZ and PTP domains could interact to regulate the phosphatase catalytic activity of PTPN4. Previous results obtained with the three NT-PTPs containing PDZ domains, PTPN3, PTPN4 and PTPN13, have already pointed out the critical role played by the interaction of PDZ domains with the PBM of their respective ligands for controlling apoptosis or oncogenesis [15, 17, 29]. In these three cases, very different arguments have indirectly implied the PDZ domain in the presentation of a phosphotyrosine residue at the catalytic site. We have previously characterized PTPN4 as an anti-apoptotic phosphatase in neuronal cells [15]. Its function is hijacked either by peptides from viral origin or by tailored peptides targeting the PDZ domain. We document here an unprecedented phosphatase regulation by an adjacent PDZ domain, and the underlying conformational plasticity that controls it. We demonstrate that the catalytic activity of PTPN4 is inhibited by the presence of its PDZ domain and this inhibition is released when the PDZ binding site is occupied. In our study, the peptide that binds the PDZ domain is not a substrate for the phosphatase catalytic site. Nevertheless, it regulates this enzymatic activity. To our knowledge, this is the first time that a PDZ domain has been shown to interfere with the catalytic activity of a phosphatase.

We characterized the auto-inhibited state of the PTPN4 bidomain PDZ-PTP. The PDZ regulatory domain inhibits the adjacent catalytic PTP domain through a mixed-inhibition process oppositely affecting the K_M and k_{cat} of the enzyme. The presence of a peptide bound to the PDZ domain abolishes the auto-inhibition of PTPN4. In turn, there is no simple reciprocal cross-talk between the PDZ and PTP domains: the decrease of affinity for the substrate, as estimated by the Michaelis constant when the PDZ site is occupied, does not correlate with any concomitant decrease of affinity of PDZ for its ligand when the catalytic site is occupied. As these binding processes take place, PDZ-PTP remains under its monomer state. Inhibition and disinhibition processes both imply an intramolecular communication: the binding of a peptide ligand on the regulatory domain most likely affects the active site *via* a distal interaction occurring through a protein interface.

The auto-inhibited PDZ-PTP adopts an elongated but compact organization as monitored by SAXS, AUC and NMR spectroscopy. However, the experimental scattering curves reflect ensemble-average and time-average contributions from conformations present in solution. The conformational space occupied by the PDZ and PTP rigid bodies and by the flexible linker was thoroughly sampled by simulation to identify the conformations that best fit the scattering and AUC data. The interdomain barycenter distances for the models of lowest χ values are indeed consistent with the existence of close contacts between PDZ and PTP domains. But we noticed a broad distribution around this mean value illustrating the potential dynamics of interdomain orientation. NMR data also indicate that PDZ and the PTP domains are not rigidly locked. We did not observe any stable interactions between PDZ and PTP through chemical shift mapping analysis. The two domains have different dynamic behaviours with slightly higher R_2 values for the PTP domain (data not shown). The interdomain linker itself appears flexible and unstructured in PDZ-PTP. It does not stably contact either the PDZ or the PTP domains. However, we show that the tether is required for the inhibition. Thus, the PDZ and PTP domains have partially distinct hydrodynamic properties and present interdomain dynamics even if a compact organization of PDZ-PTP is predominant in solution.

The PDZ ligand plays a regulatory role by efficiently restoring the catalytic activity of PTPN4, with phenomenological parameters quite similar to the ones displayed by the isolated catalytic domain. In parallel, our NMR data indicate a dynamical rearrangement between the domains upon binding of the PDZ ligand, leading to a more relaxed conformation of PDZ-PTP. The peptide binding to the PDZ likely causes partial disruption of the transient interactions between the domains as the ^{15}N relaxation data tend toward those expected for the isolated domains freely tumbling in solution. This interdomain flexibility likely explains the failure of our numerous crystallization attempts with liganded and unliganded PDZ-PTP. In conclusion, the PDZ ligand shifts equilibrium toward the relaxed conformation of PDZ-PTP that could be related to the catalytic active form of the phosphatase.

In this context, the absence of parallel between the changes in K_M values for the substrate, depending whether the PDZ is occupied or free, and the similar dissociation

constants of the PDZ ligand depending whether the catalytic site is occupied or free could be explained by the fact that the measured Michaelis constants do not reflect the affinity of the substrate for the same intermediate ES along the catalytic pathway leading to dephosphorylation. The most documented event susceptible to control such a change for tyrosine phosphatases is the dynamic of the opening/closing transition of the WPD loop, a conserved catalytic motif. Substrate binding is accompanied by a large conformational change in the active site: the WPD loop closes around the pTyr residue of the substrate and provides residues that are essential at two stages of the catalytic cycle [30]. Remarkably, NMR data obtained for YopH and PTP1B phosphatases suggest that phosphorylation levels can be modulated through control of WPD loop kinetics [31]. Allosteric inhibitors of the phosphatase PTP1B can control loop closure, trapping the inactive open conformation of the WPD loop and limiting, in this case, the full enzyme activity [32]. If the tyrosine phosphatases are characterized by the presence of adjacent non-catalytic domains, there is only one example reporting the direct regulation of their catalytic activity by such domains: the SH2 adjacent domains regulate the SHP1 and SHP2 activity by directly blocking the phosphatase active site resulting in competitive inhibition and preventing closure of the WPD loop [3, 33]. Furthermore, binding of a phosphopeptide to these SH2 domains allosterically dissociates the SH2 from the PTP active site and activates the phosphatase. The tertiary structures of PTP1B, SHPTPs and PTPN4 are highly conserved. The phosphatases share a common catalytic mechanism based on mobility of the WPD loop. We propose that the PDZ and linker regions of PTPN4 could allosterically control the catalytic activity without interfering directly with the catalytic site but rather by modulating the kinetics of the WPD loop. The unliganded PDZ inhibits the phosphatase by allowing a larger accessibility of the phosphatase substrate to the catalytic site, most likely by stabilizing the WPD loop in an open state; the peptide binding to the PDZ, by triggering the closure of the WPD loop, would promote simultaneously an enhancement of the activity and a decrease in substrate accessibility. This allosteric mechanism involving the PDZ domain could apply to the oncogenic PTPN3, the closest homologous of PTPN4. PTPN3 and PTPN4 share the same modular architecture and display a high sequence identity. For both proteins, a similar mechanism has been proposed to explain their proliferative and anti-apoptotic functions, implying the cooperation of their PDZ and catalytic domains for the dephosphorylation of a phosphotyrosine residue, present on their respective ligands

[15, 17]. Along these lines of evidence, we propose that PTPN3 phosphatase activity is also regulated by its PDZ domain. This is supported by previous biochemical studies [34].

In the auto-inhibited state of PTPN4, the PDZ binding site of the bidomain appears to be fully accessible. Affinity for the incoming ligand is maintained, suggesting that the peptide binding groove is not occluded by either the linker or by the phosphatase domain. Moreover, the free energy and thermodynamic characteristics of peptide binding are nearly identical for all the protein constructs. The PDZ-PTP bidomain has therefore no distinct PBM binding properties with respect to an isolated PDZ module. On this basis, a direct and stable contact of the peptide with the linker or with the phosphatase domain seems unlikely. The occupancy of the PDZ binding site by the shortest sequence (ETRL) able to bind the PDZ domain is sufficient to activate PTPN4. All these observations support our view that the PDZ ligand destabilizes through allosteric interactions the auto-inhibited state of PDZ-PTP to stimulate its phosphatase activity. Accordingly, peptide binding modulates the overall stability/dynamic of the PDZ domain in the bidomain. The overall structure of the PDZ domain of PTPN4 is not affected by the binding of the PBM; We solved the X-ray structure of the PDZ in interaction with the Cyto8-RETEV peptide (P.M., unpublished data). However, we previously observed by NMR that ligand binding destabilizes all the β-sheets of PTPN4-PDZ with a drastic functional effect [16]. In parallel, Wang and coll. have shown that ligand binding to the two N-terminal PDZ domains of PSD-95 increases the interdomain mobility produced by extra conformational entropy [35]. Cho and co-workers have reported that, in the Crk-II system, intramolecular SH2-SH3 interactions could induce differential effects on the thermodynamic stabilities of individual domains to finely adjust the overall functional response [36]. We conclude that modification of thermodynamical properties of PDZ upon ligand binding could result in the disruption of PDZ/PTP or/and linker/PTP contacts leading to the activation of the phosphatase. The interdomain flexibility of PDZ-PTP is also potentially important for allowing an intermolecular regulation of other partners, for instance in maintaining low levels of phosphorylation of the GluA2 subunit of the AMPA receptors [10].

Up to now, only a few studies have shown that PDZ domains, in addition to their function of recruiting specific partners, could directly regulate the catalytic activity of the enzymes to which they are tethered. For the HtrA2 and DegS proteases, an intramolecular inhibition of the enzyme activity by the corresponding PDZs has been demonstrated. This inhibition is reversible upon addition of the specific PDZ ligand [37]. For PTPN4, the PDZ domain alternatively also plays an inhibitor role when it is empty and an activator role when occupied. Thus, our research contributes to the emerging awareness that catalytic inactive scaffold domains, such as PDZ domains, are not simply passive molecular interactors but also play a role in the dynamic regulation of signaling pathways [38]. Regulation of protein function by intramolecular interaction may be a more common function for PDZ domains that was largely underestimated in the past. Given the abundance of PDZ domains in eukaryotic proteins and their frequent proximity to catalytic domains, it is not unlikely that enzymes can be frequently auto-regulated by their own PDZ domains.

Acknowledgements

We thank P. England, S. Hoos, V. Bondet, E. Frachon (Proteopole, Institut Pasteur), C. Simenel (NMR unit of the Institut Pasteur) for their technical expertise. Paola Turano, Mario Piccioli and the Bio-NMR Project [BIO-NMR-00170] and the PHC GALILEE 2013 program [28105VF] are acknowledged for providing access to NMR instrumentations available at CERM (Firenze, Italy).

Funding

PM was supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Fondation pour la Recherche Médicale [FDT20130927999]. CCS is a recipient of a Bourse Roux postdoctoral fellowship from Pasteur Institute. The authors declare that they have no conflict of interest.

Abreviations

Abreviations used: PTPs, Protein tyrosine phosphatases; R, receptor-like; NT, non-transmembrane; PDZ, PSD-95/Dlg/ZO-1; TCR, T-cell receptor; LTD, long-term depression; PBM, PDZ binding motif; pTyr, phosphotyrosyl; pNPP, para-nitrophenylphosphate; AUC, Analytical ultracentrifugation; ITC, Isothermal Titration Calorimetry.

Références

1 Hendriks, W. J., Elson, A., Harroch, S., Pulido, R., Stoker, A. and den Hertog, J. (2013) Protein tyrosine phosphatases in health and disease. FEBS J. **280**, 708-730

2 Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. Cell. **117**, 699-711

3 Hof, P., Pluskey, S., Dhe-paganon, S., Eck, M. J. and Shoelson, S. E. (1998) Crystal Structure of the Tyrosine Phosphatase SHP-2. Cell. **92**, 441-450

4 Garton, A., Burnham, M., Bouton, A. and Tonks, N. (1997) Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130CAS; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition. Oncogene. **15**, 877-885

5 Tonks, N. K. (2013) Protein tyrosine phosphatases-from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. FEBS J. **280**, 346-378

6 Pawson, T. and Nash, P. (2003) Assembly of Cell Regulatory Systems Through protein interaction domains. Science. **445,** 445-452

7 Harris, B. Z. and Lim, W. a. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. J. Cell Sci. **114**, 3219-3231

8 Gu, M. and Majerus, P. W. (1996) The properties of the protein tyrosine phosphatase PTPMEG. J. Biol. Chem. **271**, 27751-27759

9 Kina, S.-i., Tezuka, T., Kusakawa, S., Kishimoto, Y., Kakizawa, S., Hashimoto, K., Ohsugi, M., Kiyama, Y., Horai, R., Sudo, K., Kakuta, S., Iwakura, Y., Iino, M., Kano, M., Manabe, T. and Yamamoto, T. (2007) Involvement of protein-tyrosine phosphatase PTPMEG in motor learning and cerebellar long-term depression. Eur. J. Neurosci. **26**, 2269-2278

10 Kohda, K., Kakegawa, W., Matsuda, S., Yamamoto, T., Hirano, H. and Yuzaki, M. (2013) The δ2 glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **110**, 946-957

11 Young, J. A., Becker, A. M., Medeiros, J. J., Shapiro, V. S., Wang, A., Farrar, J. D., Quill, T. a., Hooft van Huijsduijnen, R. and van Oers, N. S. C. (2008) The protein tyrosine phosphatase PTPN4/PTP-MEG1, an enzyme capable of dephosphorylating the TCR ITAMs and regulating NF-kappaB, is dispensable for T cell development and/or T cell effector functions. Mol. Immunol. **45**, 3756-3766

12 Gu, M., Meng, K. and Majerus, P. W. (1996) The effect of overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTPMEG on cell growth and on colony formation in soft agar in COS-7 cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **93**, 12980-12985

13 Zhou, J., Wan, B., Shan, J., Shi, H., Li, Y. and Huo, K. (2013) PTPN4 negatively regulates CrkI in human cell lines. Cell. Mol. Biol. Lett. **18**, 297-314

14 Hironaka, K., Umemori, H., Tezuka, T., Mishina, M. and Yamamoto, T. (2000) The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor delta 2 and epsilon subunits. J. Biol. Chem. **275**, 16167-16173

15 Préhaud, C., Wolff, N., Terrien, E., Lafage, M., Mégret, F., Babault, N., Cordier, F., Tan, G. S., Maitrepierre, E., Ménager, P., Chopy, D., Hoos, S., England, P., Delepierre, M., Schnell, M. J., Buc, H. and Lafon, M. (2010) Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. Sci. Signal. **3**, ra5

16 Babault, N., Cordier, F., Lafage, M., Cockburn, J., Haouz, A., Prehaud, C., Rey, F. a., Delepierre, M., Buc, H., Lafon, M. and Wolff, N. (2011) Peptides targeting the PDZ domain of PTPN4 are efficient inducers of glioblastoma cell death. Structure. **19**, 1518-1524

17 Hou, S.-W., Zhi, H.-Y., Pohl, N., Loesch, M., Qi, X.-M., Li, R.-S., Basir, Z. and Chen, G. (2010) PTPH1 dephosphorylates and cooperates with p38gamma MAPK to increase ras oncogenesis through PDZ-mediated interaction. Cancer res. **70**, 2901-2910

18 Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR. **6**, 277-293

19 Johnson, B. a. and Blevins, R. a. (1994) NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. J. Biomol. NMR. **4**, 603-614

20 Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J. and Laue, E. D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. Proteins. **59**, 687-696

21 David, G. and Pérez, J. (2009) 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

22 Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Crystallogr. **36**, 1277-1282

23 Zhang, J., Petit, C. M., King, D. S. and Lee, A. L. (2011) Phosphorylation of a PDZ domain extension modulates binding affinity and interdomain interactions in postsynaptic density-95 (PSD-95) protein, a membrane-associated guanylate kinase (MAGUK). J. Biol. Chem. **286**, 41776-41785

24 Zhang, Z. Y. and Wu, L. (1997) The single sulfur to oxygen substitution in the active site nucleophile of the Yersinia protein-tyrosine phosphatase leads to substantial structural and functional perturbations. Biochemistry-US. **36**, 1362-1369

25 Durand, D., Vivès, C., Cannella, D., Pérez, J., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P. and Fieschi, F. (2010) NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. J. struct. biol. **169**, 45-53

26 Erickson, H. P. (2009) Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. Biol. Proced. online. **11**, 32-51

27 Bernadó, P. (2010) Effect of interdomain dynamics on the structure determination of modular proteins by small-angle scattering. Eur. Biophys. J. **39**, 769-780

28 Mareuil, F., Sizun, C., Perez, J., Schoenauer, M., Lallemand, J.-Y. and Bontems, F. (2007) A simple genetic algorithm for the optimization of multidomain protein homology models driven by NMR residual dipolar coupling and small angle X-ray scattering data. Eur. Biophys. J. **37**, 95-104

29 Yanagisawa, J., Takahashi, M., Kanki, H., Yano-Yanagisawa, H., Tazunoki, T., Sawa, E., Nishitoba, T., Kamishohara, M., Kobayashi, E., Kataoka, S. and Sato, T. (1997) The Molecular Interaction of Fas and FAP-1: a tripeptide bloker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. J. Biol. Chem. **272**, 8539-8545

30 Barford, D., Jia, Z. and Tonks, N. (1995) Protein tyrosine phosphatases take off. Nat. Struct. Biol. **2**, 1043-1053

31 Whittier, S. K., Hengge, A. C. and Loria, J. P. (2013) Conformational motions regulate phosphoryl transfer in related protein tyrosine phosphatases. Science. **341**, 899-903

32 Wiesmann, C., Barr, K. J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D. a., Shen, W., Fahr, B. J., Zhong, M., Taylor, L., Randal, M., McDowell, R. S. and Hansen, S. K. (2004) Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. Nat. Struct. Biol. **11**, 730-737

33 Sugimoto, S., Lechleider, R. J., Shoelson, S. E., Neel, B. G. and Walsh, C. T. (1993) Expression, purification, and characterization of SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2. J. Biol. Chem. **268**, 22771-22776

34 Zhang, S., Eckberg, W., Yang, Q., Samatar, A. and Tonks, N. K. (1995) Biochemical characterization of a human band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase, PTPH1. J. Biol. Chem. **270**, 20067-20072

35 Wang, W., Weng, J., Zhang, X., Liu, M. and Zhang, M. (2008) Creating conformational entropy by increasing interdomain mobility in ligand binding regulation: a revisit to N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. J. Am. Chem. Soc. **131**, 787-796

36 Cho, J.-H., Muralidharan, V., Vila-Perello, M., Raleigh, D. P., Muir, T. W. and Palmer III, A. G. (2011) Tuning protein autoinhibition by domain destabilization. Nat. Struct. Biol. **18**, 550-555

37 Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. a. and Sauer, R. T. (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. Cell. **113**, 61-71

38 Feng, W. and Zhang, M. (2009) Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. Nat. Rev. Neurosci. **10**, 87-99

TABLES :

	PTPN4 constructs	K_M (µM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1}.M^{-1}$)
pNPP	linker-PTP	640 ± 24	5.0 ± 0.2	7810 ± 380
	PDZ-PTP^{WT}	290 ± 10	1.5 ± 0.1	5170 ± 430
	PDZ-PTP^{WT} + Cyto8-RETEV	690 ± 15	3.8 ± 0.2	5510± 170
pTyr peptide	linker-PTP	16.2 ± 0.2	11.7 ± 0.3	722200 ± 2500
	PDZ-PTP^{WT}	4.3 ± 0.7	1.8 ± 0.1	418600 ± 8000
	PDZ-PTP^{WT} + Cyto8-RETEV	12.1 ± 3.3	8.4 ± 1.1	694200 ± 9400

Table 1. Kinetic parameters of the hydrolysis of pNPP and pTyr peptide by various PTPN4 constructs.
The data and error bars are representative of three independent experiments.

		PTPN4 constructs	
		PDZ-PTP^{WT}	PDZ-PTP^{WT} + Cyto8-RETEV
	M_r theoretical (g.mol^{-1})	51718	53231
AUC	Sed coef ($S_{0,w,20}$) (S)	3.43 ± 0.02	3.46 ± 0.03
	f/f_0	1.46	1.47
	M_r *estimated* (g.mol^{-1})	49255 ± 1900	52281 ± 1000
SAXS	R_g (Å)	34.7 ± 0.2	34.3 ± 0.2
	D_{max} (Å)	160	165
	Calc. sed. Coef. (S)	3.44 ± 0.7	-
	M_r estimated from I(0) (g.mol^{-1})	46900 ± 100	47150 ± 100

Table 2. Hydrodynamic parameters of PDZ-PTP^{WT} derived from the analysis of analytical ultracentrifugation and SAXS data.
The normalized sedimentation coefficients (S_0) were processed to get the standard sedimentation coefficients in water at 20°C ($S_{0,w,20}$).

Table 3. Thermodynamic parameters of Cyto8-RETEV binding with different PTPN4 constructs.

PTPN4 constructs	Cell titration	N	K_d (µM)	ΔH (kcal/mol)	-TΔS (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
PDZ	Buffer	0.99 ± 0.01	3.2 ± 0.2	-13.7 ± 0.1	6.2 ± 0.1	-7.50 ± 0.03
PDZ-linker	Buffer	1.03 ± 0.02	5.3 ± 0.5	-12.3 ± 0.4	5.1 ± 0.4	-7.20 ± 0.06
PDZ-PTP^{WT}	Buffer	0.92 ± 0.03	3.9 ± 0.5	-11.6 ± 0.6	4.2 ± 0.7	-7.38 ± 0.08
PDZ-PTP$^{C/S}$	Buffer	0.92 ± 0.01	1.4 ± 0.1	-12.3 ± 0.2	4.4 ± 0.2	-7,99 ± 0.04
PDZ-PTP$^{C/S}$	pTyr peptide	0.90 ± 0.02	2.0 ± 0.3	-10.3 ± 0.3	2.5 ± 0.4	-7.78 ± 0.09

K_d were measured by ITC at 25°C with PTPN4 constructs at a concentration of 30 µM in Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, TCEP 0.5 mM. pTyr peptide at 150 µM was added for the last experiment. ΔH and TΔS correspond to the enthalpy and entropy of the system, respectively.

FIGURES :

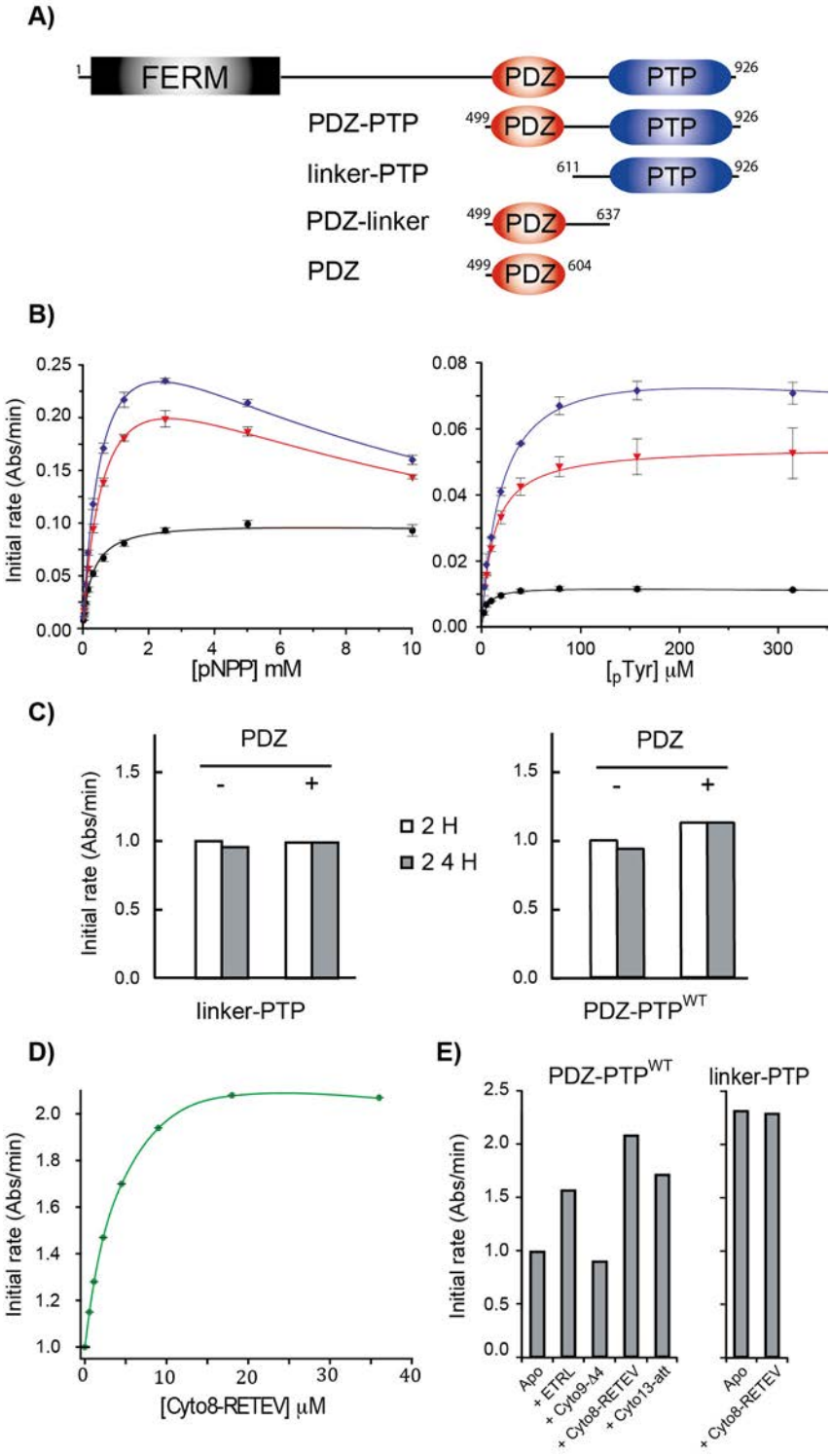


Figure 1. Switch of the phosphatase activity by the PDZ domain and the PDZ ligand.
(A) Schematic representation of the PTPN4 constructs.
(B) Michaelis-Menten plots of initial rates of pNPP (left panel) and of pTyr peptide (right panel) hydrolysis by different constructs of PTPN4 at 75 nM and 10 nM with pNPP and pTyr, respectively; ◆ linker-PTP; ● PDZ-PTP^{WT}; ▼ PDZ-PTP^{WT} in the presence of 40 µM Cyto8-RETEV

peptide. The solid lines are nonlinear least-squares fits of the data to the Michaelis-Menten equation for linker-PTP, PDZ-PTP^{WT}, PDZ-PTP^{WT} in the presence of 40 μM Cyto8-RETEV in blue, black and red, respectively.
(C) The initial rates of pNPP dephosphorylation by linker-PTP (left panel) and by PDZ-PTP^{WT} (right panel). Linker-PTP and PDZ-PTP^{WT} were both at 75 nM in presence of 2.5 mM of pNPP. Values were determined after 2 hours (white bars) and 24 hours (black bars) of pre-incubation of the enzyme with PDZ domain at a concentration of 60 μM (enzyme:PDZ molar ratio of 1:80).
(D) The normalized initial rates of pNPP dephosphorylation by PDZ-PTP^{WT} as a function of Cyto8-RETEV concentration. The concentrations of pNPP and PDZ-PTP^{WT} are 2.5 mM and 75 nM, respectively.
(E) Initial rates of pNPP dephosphorylation by PDZ-PTP^{WT} (left panel) and by linker-PTP (right panel) with 2.5 mM of pNPP and 75 nM of PDZ-PTP^{WT} or linker-PTP. Values were determined in the absence of peptide (Apo) or in the presence of peptide (ETRL at 800 μM, Cyto9-Δ4 at 250 μM, Cyto8-RETEV at 20 μM and Cyto13-att at 1 mM).
The data and error bars are representative of three independent experiments.

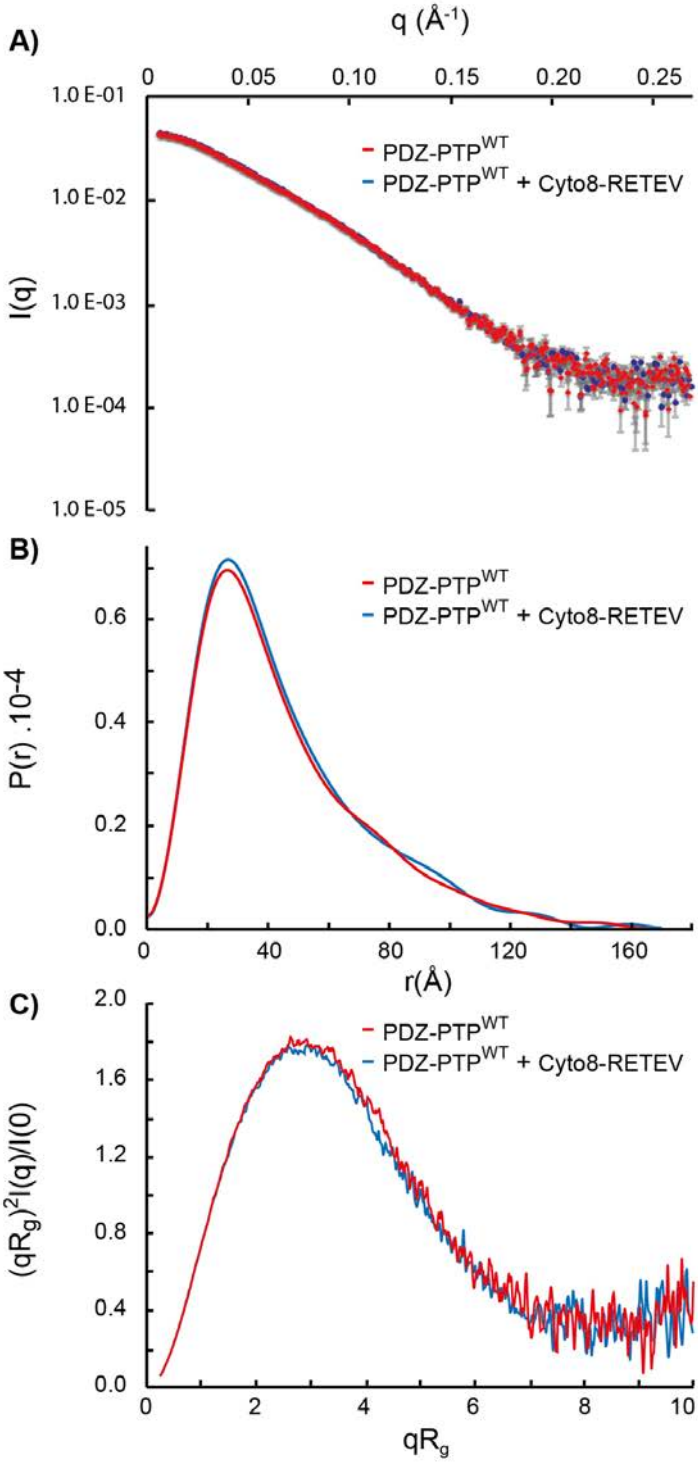


Figure 2. SAXS analysis of PDZ-PTP^{WT} free and complexed to Cyto8-RETEV.

PDZ-PTP^{WT} free and complexed to Cyto8-RETEV data are represented in red and in blue, respectively.

(A) Experimental SAXS data (I(q) versus q) with error bars in black lines.

(B) The P(r) function of the SAXS data, where P is the pair-distance distribution function and r is the distance vector.

(C) Normalized Kratky plots.

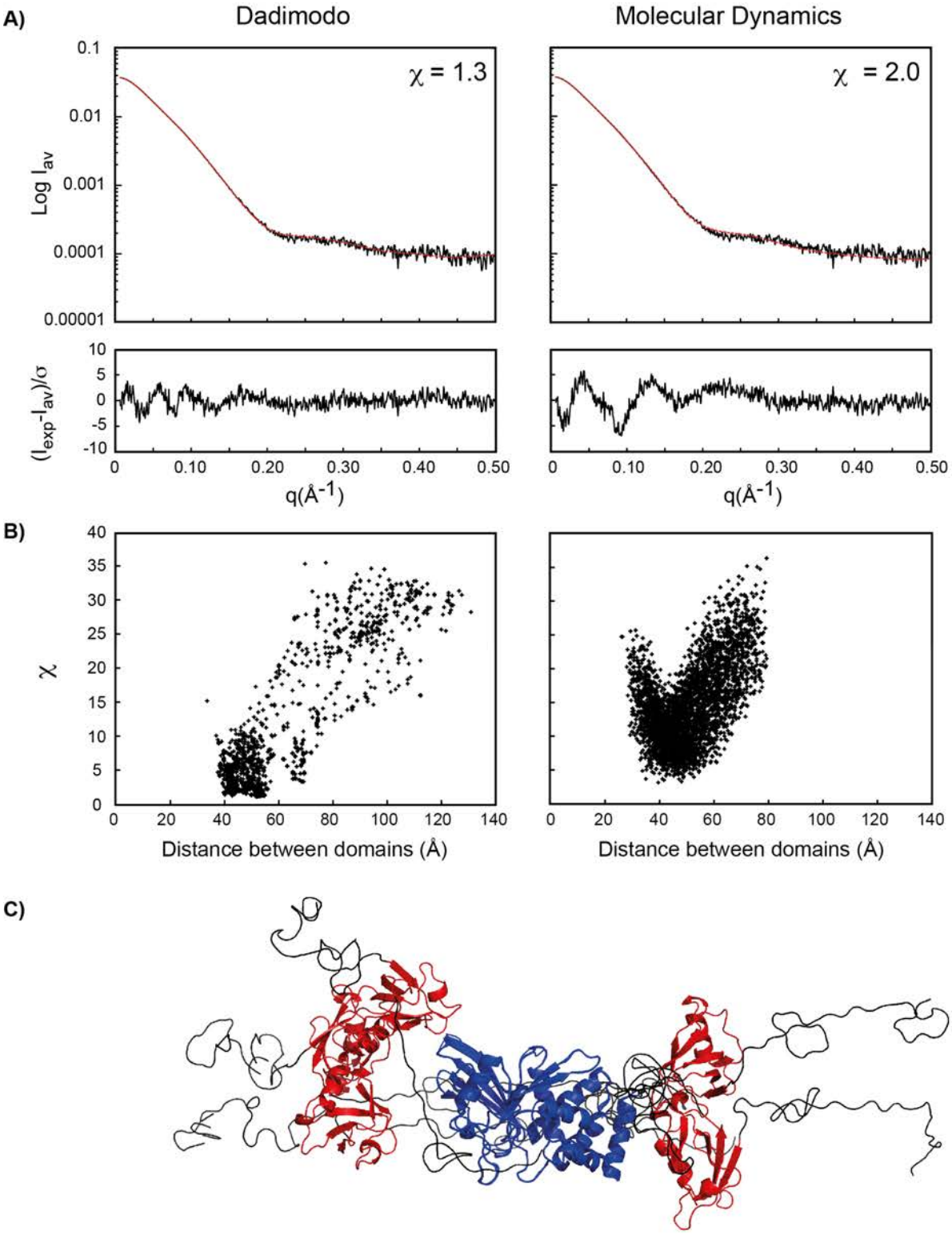


Figure 3. Modeling of PDZ-PTP^{WT}.

Left and right panels of (A) & (B) depict results obtained from Dadimodo and Molecular Dynamics, respectively.

(A) The experimental SAXS intensity (I_{exp}; black) and the fit between the calculated SAXS intensity averaged on the 10 models (I_{av}; red) are plotted as a function of the diffusion vector amplitude, q (Figure S2). The χ values of 1.3 and 2.0 for Dadimodo and Molecular Dynamics, respectively, indicate that the deviations between the calculated and experimental intensities

are close to the experimental errors. The difference between the two intensities divided by the experimental error is plotted (bottom) as a function of q.
(B) χ values versus the distance between barycenters of PDZ and PTP domains for each model. The χ value defined as $[1/N*\Sigma_q((I_{exp}-I_{av})/\sigma)^2]^{1/2}$ scores the difference between these two intensities, σ being the experimental error and N the number of points.
(C) Overlay of five models of PDZ-PTP^{WT} obtained from SAXS data and from cross-validation with hydrodynamic parameters. Those models are superimposed and aligned on the PTP domain. PTP is colored in blue and PDZ in red.

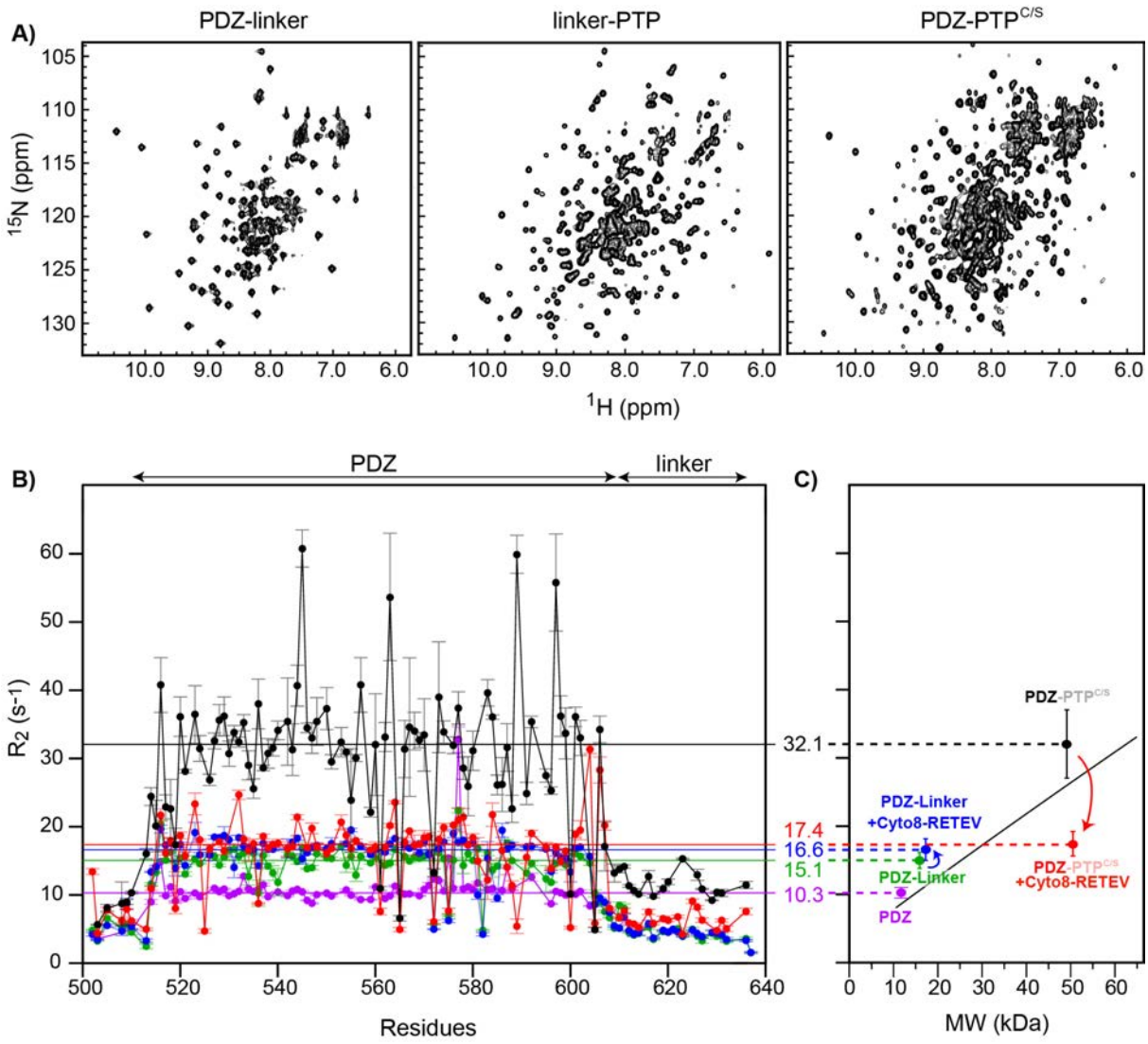


Figure 4. NMR study of several constructs of PTPN4.

(A) 1H-15N HSQC spectra of PTPN4 constructs. From left to right panels: PDZ-linker (350 µM, recorded at 600 MHz), linker-PTP (110 µM, recorded at 600 MHz) and PDZ-PTP$^{C/S}$ (400 µM, recorded at 950 MHz).

(B) Transverse 15N relaxation rates (R2) of the PDZ domain within several constructs of PTPN4. The several constructs used are: free isolated PDZ (magenta), free isolated PDZ-linker (green), free PDZ-PTP$^{C/S}$ (black) and isolated PDZ-linker and PDZ-PTP$^{C/S}$ complexed with the Cyto8-RETEV (blue and red, respectively).

(C) Average R_2 (filled circles) for each construct plotted as a function of the molecular weight (MW). Error bars represent the S.D. of R_2 values. The black line represents the molecular weight–dependent R2 rates calculated using isotropic rotational correlation times from Stokes' law.

Supplemental Information

Allosteric Regulation of the Catalytic Activity of the Human Phosphatase PTPN4 by its PDZ Domain.

Pierre Maisonneuve, Célia Caillet-Saguy, Bertrand Raynal, Bernard Gilquin, Alain Chaffotte, Javier Pérez, Sophie Zinn-Justin, Muriel Delepierre, Henri Buc, Florence Cordier, Nicolas Wolff

Supplemental Results

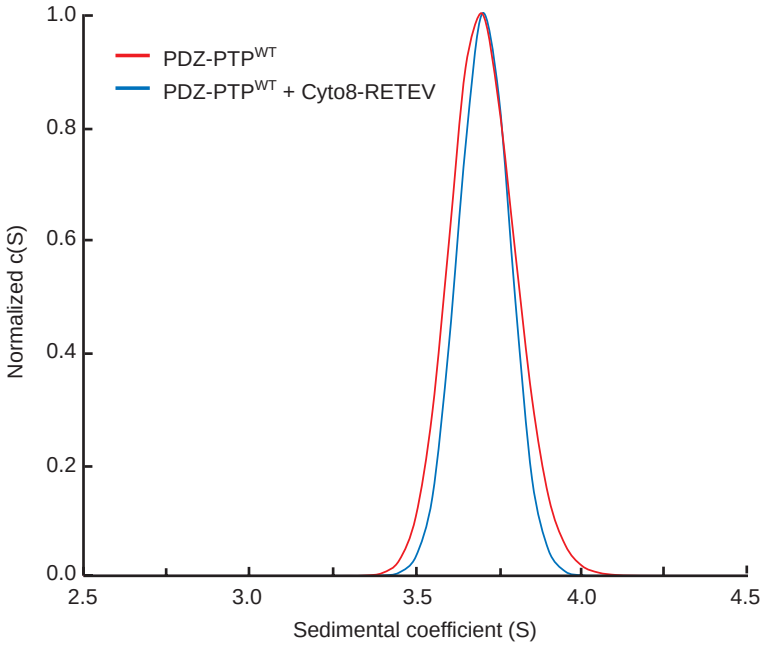


Figure S1: Analytical Ultracentrifugation of PDZ-PTP^{WT} free and complexed to Cyto8-RETEV.
The normalized sedimentation coefficient (S_0) distribution profiles are based on sedimentation velocity experiments performed at 25°C. Sedimentation coefficients are in Svedberg, with 1 S = 10^{-13} s.

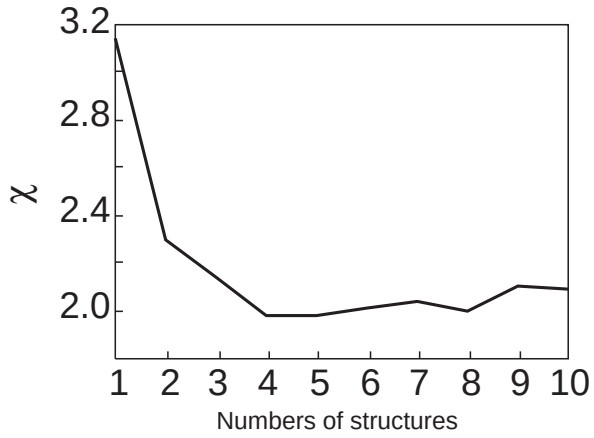


Figure S2: Evolution of the χ values from molecular dynamics models versus the number of models used in the calculation of the average SAXS intensity for PDZ-PTP^{WT}.

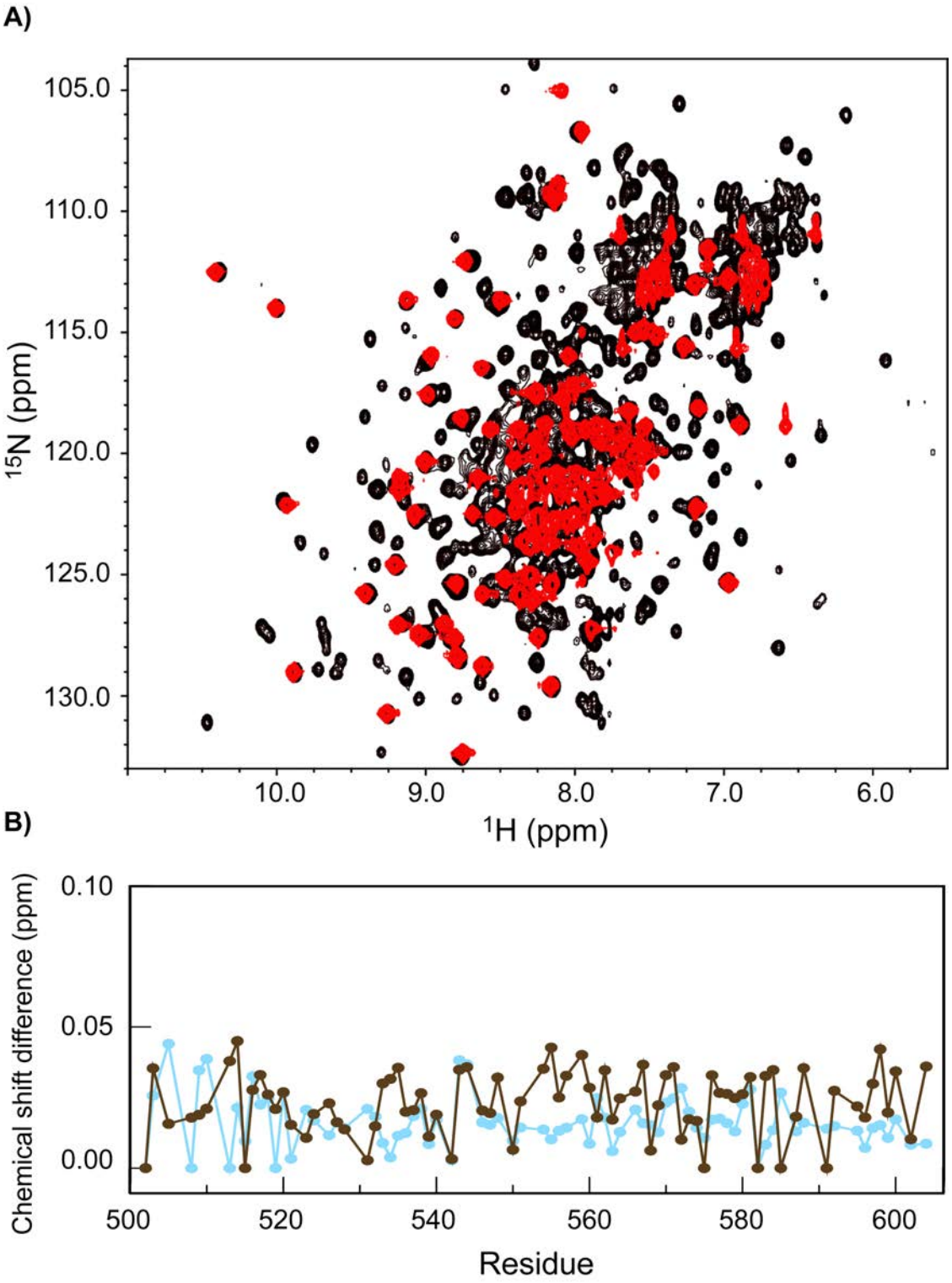


Figure S3: Chemical shift perturbation analysis.

A) Overlay of ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of ^{15}N-labeled PTPN4 constructs: PDZ-linker in red (450 µM, recorded at 600 MHz) and PDZ-PTP$^{C/S}$ in black (400 µM, recorded at 950 MHz).

B) ^{1}H, ^{15}N average chemical shift differences (Δδ) of the PDZ in free PDZ-PTP$^{C/S}$ relative to the isolated free PDZ (brown), and in Cyto8-RETEV bound PDZ-PTP$^{C/S}$ relative to the isolated Cyto8-RETEV bound PDZ (blue).

Table S1: SAXS data collection and scattering-derived parameters, Related to Figure 2.

Parameters corresponding to experiments recorded on PDZ-PTP^{WT} free and complexed to Cyto8-RETEV are referenced as [a] and [b], respectively.

Data collection parameters	
Instrument	SWING beamline, Synchrotron Soleil
Beam geometry	KB mirrors + guard slits
Wavelenght (Å)	1.033
q range (Å^{-1})	0.0006-0.5000
Exposure time (min)	0.017 per frame
Concentration range (mg ml^{-1})	Summit of the HPLC peak at 1.20[a] and 1.18[b]
Temperature (K)	290
Structural parameters	
I(0) (cm^{-1}) [from P(r)]	0.4347 E-01[a]; 0.4472 E-01[b]
Rg (Å) [from P(r)]	37.52[a]; 37.40[b]
I(0) (cm^{-1}) [from Guinier]	0. 4396 E-01 ± 0.0010 E-01[a]; 0.4389 E- 01 ± 0.0010 E-01[b]
Rg (Å) [from Guinier]	34.7 ± 0.2[a]; 34.3 ± 0.2[b]
Dmax (Å)	160[a]; 165[b]
Dry volume calc. from seq. (Å^3)	0.6265 E+05[a]; 0.6265 E+05[b]
Molecular-mass determination	
Partial specific volume (cm^3 g^{-1})	0.729[a]; 0.728[b]
Contrast ($\Delta\rho$ X 10^{10} cm^{-2})	2.97[a]; 2.99[b]
Molecular mass M_r [from I(0)]	46900.0 ± 100.0[a]; 47150.0 ± 100.0[b]
Calculated M_r from sequence	51717.8[a]; 53231.4[b]
Software employed	
Primary data reduction	FoxTrot
Data Processing	FoxTrot
Rigid body modelling	CNS
Computation of model intensities	CRYSOL
3D graphics representations	PyMOL

Supplemental Experimental Procedures

Protein expression and purification

To produce unlabelled proteins, cells were grown in a LB medium for PDZ, PDZ-linker and linker-PTP, and in a Super-Broth medium for PDZ-PTPWT and PDZ-PTP$^{C/S}$. For the ^{15}N and $^{15}N/^{13}C$ protein samples, cells were grown in a bioreactor with M9 minimal medium containing 1.0 g/l $^{15}NH_4Cl$ as the sole nitrogen source or containing 1.0 g/l $^{15}NH_4Cl$ and 4.0 g/l ^{13}C-glucose as the sole nitrogen and carbon sources, respectively. Protein expression was induced at OD600nm 0.8 - 1 with 1 mM IPTG at 18°C for 16 h for PDZ-PTP^{WT}, PDZ-PTP$^{C/S}$ and linker-PTP and at 30°C for 3 h for PDZ and PDZ-linker.

For GST-tagged protein, harvested cells were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl), 2 mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail (Roche), and then disrupted in a French press. The clarified supernatants were loaded onto a GST column (GSTrap HP, GE), and washed with the same buffer. The tag-GST was cleaved overnight at 4°C by the TEV protease (1% M/M) directly injected on the column. The eluted fractions containing the protein were pooled and loaded onto a size exclusion column (Hiload Superdex 75pg, GE) equilibrated with buffer A with 0.5 mM TCEP.

For His-tagged protein, harvested cells were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl), 2 mM β-mercaptoethanol, 40 mM imidazole, protease inhibitor cocktail (Roche), and then disrupted in a French press. The clarified supernatants were loaded onto a Ni^{2+} column (HiTrap Chelating HP, GE), and washed with the same buffer. Proteins were eluted with an imidazole gradient from 40 mM to 250 mM. The eluted fractions containing the protein were pooled and diluted by 5-fold with a free NaCl buffer, loaded on an ion-exchange column (HiScreen Q HP) and then eluted with a NaCl gradient from 0 M to 1 M. If necessary, the tag-His was cleaved by the TEV protease (1 % M/M) overnight at 4°C. Then, the protein solution was loaded onto Ni^{2+} column to remove His-tag and the TEV protease. Cleaved proteins were further purified by gel filtration (Hiload Superdex 75 pg, GE) equilibrated with buffer A with 0.5 mM TCEP. All purification steps were performed at 4°C. Proteins were concentrated using centrifugal filter devices (Vivaspin, Sartorius). Proteins concentration was estimated from its absorbance at 280 nm.

Analytical ultracentrifugation

Experiments were carried out in a ProteomeLab XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) equipped with double-UV and Rayleigh interference detection and using an AN60-Ti rotor and 12 mM thick epon double sector centerpieces. Absorbance and interference profiles were recorded every 5 min. Buffer viscosity (η= 0.9160 cP) and density (ρ= 1.0047 g.mL-1) at 25°C were estimated with Sednterp 1.09. Partial specific volumes at 25°C were estimated based on amino acid sequences using Sednterp 1.09. Data were analyzed with Sedfit 12.1 using a continuous size distribution c(S) model.

Enzymatic assays

Absorbances were measured continuously at 360 nm and 410 nm for phospho-peptide and pNPP, respectively, using a Perkin Elmer UV spectrometer equilibrated at 25°C. Initial linear reaction rates were calculated during a 2-minutes reaction using PECSS software. The K_M and k_{cat} constants were deduced from fitting the Michaelis-Menten equation with the Origin software. The equation takes into account excess-substrate inhibition.

SAXS processing and Modeling

SAXS samples were prepared in buffer A with 0.5 mM TCEP. Samples of PDZ-PTP^{WT} (50 µl) at 6.7 mg/ml were injected into a size-exclusion column (Agilent Bio SEC-3, 4,6 mM) using an Agilent© High Performance Liquid Chromatography system cooled at 25°C and eluted directly into the SAXS flow through capillary cell at a flow rate of 200 µl/min. For the experiments corresponding to PDZ-PTP^{WT} complexed with Cyto8-RETEV, the column was equilibrated with the buffer A with 0.5 mM TCEP and 40 µM Cyto8-RETEV. SAXS data were collected online throughout the whole elution time, with frame duration of 2 s and a dead time between frames of 1 s. The first 30 frames collected during the first minutes of the elution flow were averaged to account for buffer scattering. The 10 frames corresponding to the top of the elution peak were averaged and were used for data processing after baseline subtraction.

The data were analyzed using FOXTROT and PRIMUS (Primary Analysis and Manipulations with Small Angle Scattering DATA) from ATSAS 2.1, from which Guinier

and normalized Kratky plots were generated. From the corrected scattering curves, the pair-distribution functions were computed using GNOM [1].

Models for PDZ-PTP^{WT} of PTPN4 from amino acid 499 to 926 were calculated using CNS, based on the X-ray structure of the PDZ (PDB code 3NFL) and of the PTP (PDB code 2I75) [2] [3]. The two domains were rigid and their centers of mass were located at random distance (less than 80 Å) and then randomly rotated around their respective center of mass. The linker, the N-terminal and the C-terminal part of PDZ-PTP^{WT} fragment were set in random conformations. Over 8,000 models, 3641 models were selected excluded those with high van der Waals bump. The theoretical SAXS curve was calculated for each of these models using CRYSOL (http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/crysol.html). A χ value was obtained, that scored the fit between the experimental (I_{exp}) and calculated (I_{calc}) intensities and was calculated as $[1/N*\Sigma_q((I_{exp}-I_{calc})/\sigma)^2]^{1/2}$, σ being the experimental error and N the number of points. Then, the 10 final models with the best χ values were selected. To correctly account for the conformational variability of the unfolded regions, we calculated an average SAXS intensity (I_{av}) curve from the 10 theoretical intensities (I_{calc}) curves. This average curve results from the presence of the 10 models within the population of PDZ-PTP^{WT}. Comparison of I_{av} and I_{exp} yielded a χ value of 2.0. Figure S3 illustrates how the χ value corresponding to the fit of the average theoretical intensity to the experimental intensity evolves with the number of models used to calculate the average intensity. Because of the limited variability of the relative position of the PTP and PDZ domain in the selected PDZ-PTP^{WT} models, the χ value was already at its minimum using only 4 models (Figure S3).

In the previous approach, the models were filtered using the SAXS data. In order to use an approach refining proteins against SAXS data, we used DADIMODO. Six runs were performed using six different starting points in which the two domains were located in different relative positions and with various conformations of the linker. A set of 2290 models was analyzed. As previously, the average curve based on the 10 models with the best χ values was selected and the comparison of I_{av} to I_{exp} yielded a χ value of 1.3 (Figure 5). Best models obtained by both previous modeling approaches were cross-validated with AUC sedimentation coefficients (Table 2). Cross validation of the models and final selection were performed by comparing the experimental sedimentation

coefficients obtained from ultra-centrifugation analysis with the theoretical sedimentation coefficients calculated with our models using SOMO [4].

Supplemental References

1 Svergun, D. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. J. Appl. Crystallogr. 25, 495-503

2 Babault, N., Cordier, F., Lafage, M., Cockburn, J., Haouz, A., Prehaud, C., Rey, F. a., Delepierre, M., Buc, H., Lafon, M. and Wolff, N. (2011) Peptides targeting the PDZ domain of PTPN4 are efficient inducers of glioblastoma cell death. Structure. **19**, 1518-1524

3 Barr, A. J., Ugochukwu, E., Lee, W. H., King, O. N. F., Filippakopoulos, P., Alfano, I., Savitsky, P., Burgess-Brown, N. a., Müller, S. and Knapp, S. (2009) Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. Cell. **136**, 352-363

4 Brookes, E., Demeler, B. and Rocco, M. (2010) Developments in the US-SOMO bead modeling suite: new features in the direct residue-to-bead method, improved grid routines, and influence of accessible surface area screening. Macromol. Biosci. **10**, 746-753

3) Commentaires

Cette publication s'attache à l'étude du comportement global de la protéine dans ses états auto-inhibé et activé pour permettre par la suite une analyse plus en détail du mécanisme moléculaire de la régulation inter-domaine. Dans cette optique, nous avons débuté une étude du linker pour identifier son rôle dans la communication entre le domaine PDZ et la phosphatase. Ces résultats sont détaillés dans le chapitre suivant.

Un point que j'aimerais aborder concerne le comportement dynamique des deux domaines qui a rendu particulièrement difficile l'étude de PTPN4 par cristallographie aux rayons X. En effet, de très nombreux essais de cristallisation du supramodule PDZ-PTP n'ont pas permis d'obtenir de cristaux. Ces essais ont été effectués à deux températures, 18 °C et 4 °C, à différentes concentrations (de 5 g/L à 10 g/L), avec différentes compositions du tampon du supramodule et avec différents ratios de protéine et de tampon de cristallisation dans la goutte de cristallisation. Ces conditions ont été testées pour le supramodule seul ou avec différentes combinaisons de ligands du domaine PDZ, de phosphate inorganique ou encore de vanadate, qui mime la phosphate inorganique.

4) Résultats complémentaires

Nous nous sommes intéressés au rôle du linker qui relie les deux domaines. Cette question est fondamentale pour une meilleure compréhension du mécanisme de régulation inter-domaine. De nombreuses études montrent que, dans des cas similaires de régulation inter-domaine, le linker a un rôle direct dans la communication des domaines. Il peut interagir avec l'un des domaines, ou les deux à la fois, et permettre ainsi l'établissement d'une communication entre les domaines. Dans certains cas, le linker possède des éléments de structure secondaire sans lesquels il n'y a pas d'interaction avec les domaines. Il peut également contrôler la flexibilité et la dynamique entre les domaines dont leur activité est dépendante (473-475).

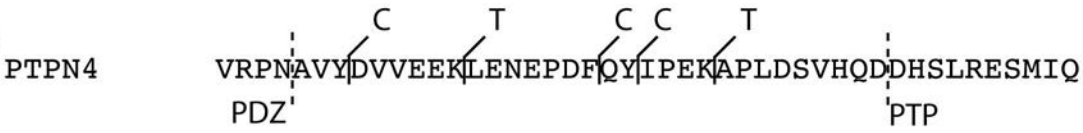
Nous avons ainsi observé que le linker est indispensable pour maintenir la régulation inter-domaine. Nous nous sommes demandés dans un premier temps si ce linker composé de trente-et-un acides aminés possède une structure secondaire. Les prédictions de structure secondaire prédisent une hélice-α dans sa partie N-terminale (Figure 40). L'étude des déplacements chimiques relevés par RMN du linker indique qu'il n'adopte pas de structure secondaire. De plus, les valeurs des temps de relaxation mesurés dans le double domaine PDZ - PTP indiquent une forte flexibilité du linker.



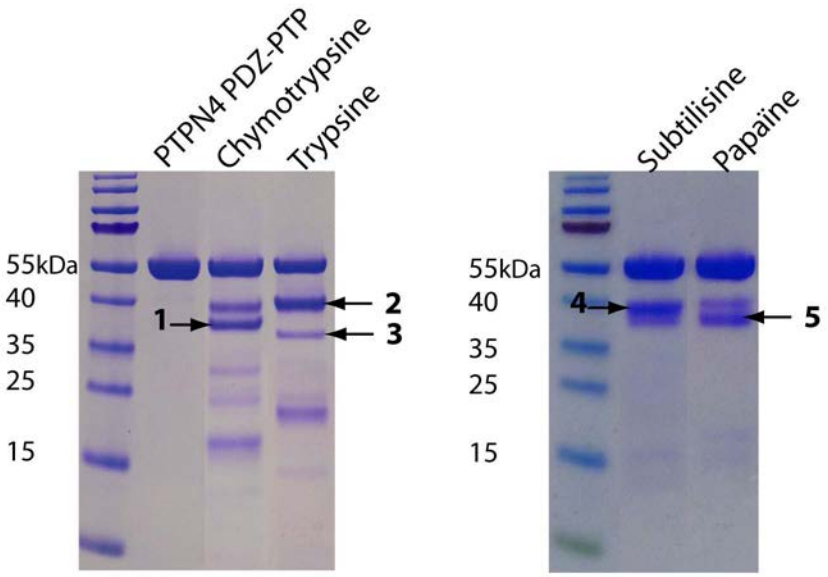
Figure 40 : Prédiction de structure secondaire du linker entre le PDZ et PTP de PTPN4.
Séquence du linker entre le domaine PDZ et PTP de PTPN4 (résidus du linker 605-635).
Les prédictions de structures secondaires sont représentées en-dessous de la séquence. Pour les différents logiciels utilisés : h correspond à la prédiction d'hélice α, e au feuillets β et c à du *non structuré*. (476-479) (http://npsa-pbil.ibcp.fr).

Puisque le linker est décrit comme flexible et non structuré, nous avons voulu tester sa résistance à la protéolyse ménagée. Pour cela quatre enzymes ont été utilisées : la trypsine et la chymotrypsine, qui possèdent des sites de clivage spécifiques au sein du linker (Figure 41A) et deux autres protéases avec des spécificités à large spectre. Le double-domaine PDZ-PTP a été incubé à 37 °C pendant 60 min avec chacune des protéases à un ratio molaire de 1 : 100 (protéase : PTPN4) pour la trypsine et la chymotrypsine et un ratio molaire de 1 : 1000 pour les deux autres. L'analyse des fragments de protéolyse a ensuite été réalisée par gel SDS-Page et par spectrométrie de masse pour localiser les sites de clivage.

(A)



(B)



(C)

N° Bande	N-terminal	Localisation de la séquence	Localisation du clivage
1	GAMSS	N-Terminal	Clivage dans le PTP
2	HSGELM	Boucle du PDZ	Clivage dans le PDZ
3	GAMSS	N-Terminal	Clivage dans le PTP
4	VRPN	En C-Terminal du PDZ	Clivage dans le PDZ
5	SVHQDD	Linker	Clivage dans le Linker

Figure 41 : Analyse par protéolyse ménagée de PDZ-PTP de PTPN4
(A) Séquence du linker de PTPN4 avec indiqués les sites de coupures potentiels de la chymotrypsine (C) et de la trypsine (T). (B) Gel SDS-Page après une heure d'incubation de PTPN4 PDZ-PTP à 37°C avec les différentes protéases. Les bandes les plus intenses dont la séquence N-terminale a été identifiée par spectrométrie de masse sont numérotées. (C) Identification des séquences N-terminales des fragments de protéolyse, avec pour chacune la localisation de la séquence N-terminale du fragment et la localisation du clivage.

La protéine PDZ-PTP est résistante à la protéolyse. Après une heure d'incubation à 37°C avec différentes protéases, la majorité de la protéine (~55kDa) reste non clivée (Figure 41B). L'identification de la séquence N-terminale des fragments dont les bandes sur gel sont les plus intenses montre que, à l'exception du fragment issu du clivage par la papaïne, les sites de clivage se situent au niveau des domaines PDZ et phosphatase. Dans le cas de la papaïne, le clivage se situe à l'extrémité C-terminale du linker précédant la première hélice α de la phosphatase. Ces observations tendent à montrer que le linker situé entre le domaine PDZ et PTP de PTPN4 est résistant à la protéolyse ménagée. Bien que flexible, le linker pourrait interagir avec les domaines PDZ ou phosphatase, au moins à une fréquence suffisante pour être protégé des protéases.

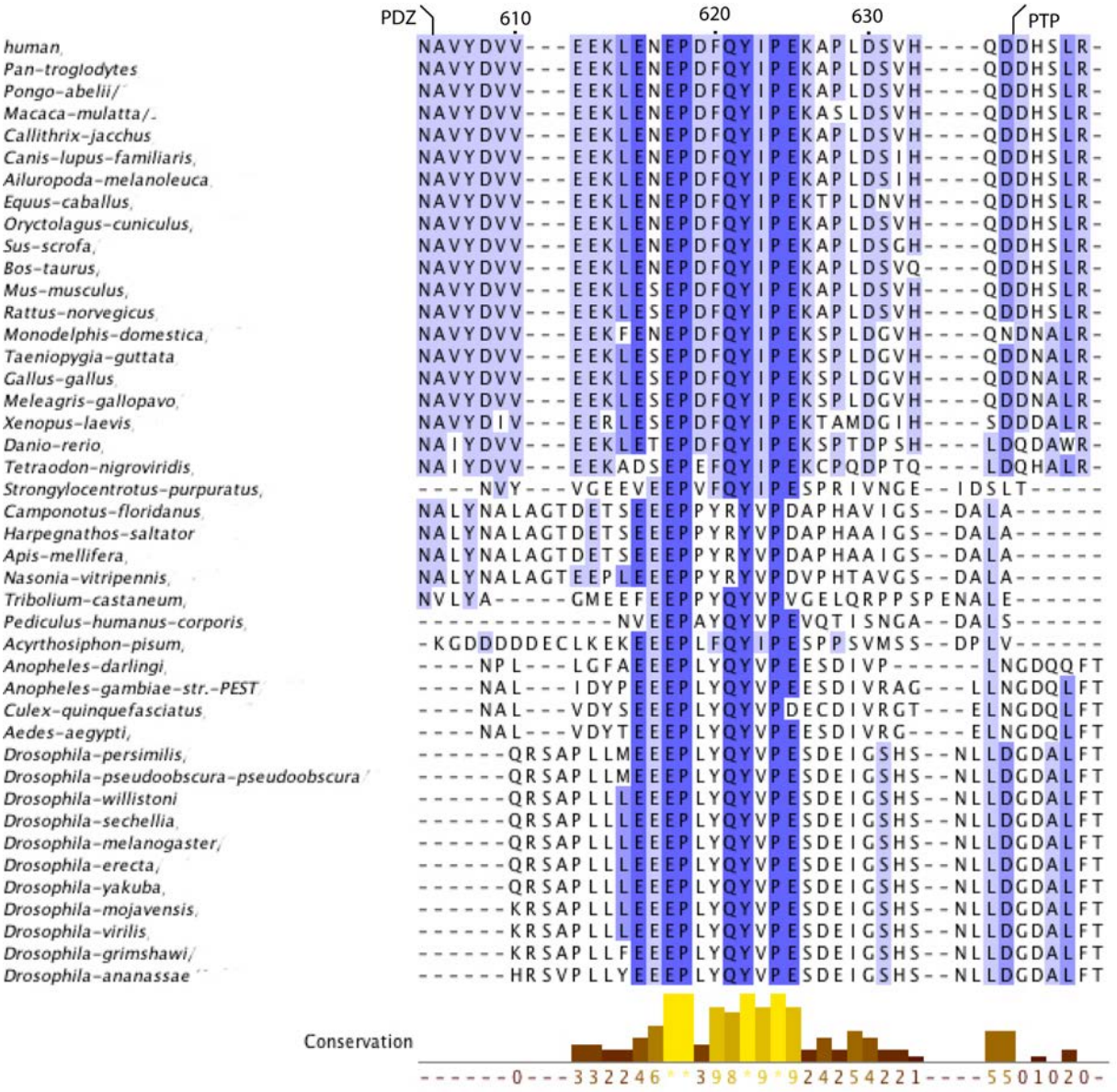


Figure 42 : Alignement de séquences du linker de PTPN4 de différentes espèces.

Les acides aminés les plus conservés sont colorés en bleu. Plus le bleu est foncé, plus les acides aminés sont conservés. Le score de conservation de chaque acide aminé est représenté en dessous de l'alignement sous forme d'histogramme.

L'alignement des séquences du linker de PTPN4 issues de diverses espèces met en lumière que des acides aminés sont fortement conservés. Parmi eux, certains pourraient jouer un rôle important dans la communication inter-domaine, notamment des résidus hydrophobes qui seraient capables d'interagir avec les domaines adjacents (Figure 42). De plus, deux prolines (P_{618} et P_{624}) situées au centre du linker sont strictement conservées et pourraient participer à la dynamique inter-domaine. En effet, les

propriétés entropiques des linkers situés entre deux domaines peuvent avoir des conséquences fonctionnelles sur ces derniers (480).

5) Perspectives

Afin de d'étudier plus en détail les mécanismes moléculaires et dynamiques gouvernant la régulation inter-domaine du supramodule PDZ-PTP de PTPN4, l'attribution par RMN des résonances du domaine phosphatase de PTPN4 est le premier objectif. Cette étape est ardue, du fait des faibles rendements de production en milieu triplement marqué ^{2}H, ^{15}N, ^{13}C du supramodule PDZ-PTP ou du domaine phosphatase isolé (<0,25mg de protéine par litre de culture). Le marquage en deutérium s'est révélé indispensable afin d'améliorer la qualité des spectres. En effet, sur les HSQC du supramodule PDZ-PTP non deutéré obtenues jusqu'à présent, la majorité des résonances du domaine phosphatase ne sont pas visibles. Des essais sont actuellement menés par Celia Caillet-Saguy, post-doctorante au laboratoire, afin d'obtenir un échantillon suffisamment concentré et deutéré pour attribuer et étudier le domaine phosphatase de PTPN4 par RMN. Ce projet est réalisé en collaboration avec le CERM (Center for Magnetic Resonnance) à Florence (Italie), qui possède des spectromètres à très hauts champs et des techniques particulières de RMN, notamment de détection directe en carbone 13.

Il serait alors envisageable d'étudier par la suite l'influence du domaine PDZ et de ses ligands sur le domaine PTP. L'étude des variations de déplacement chimique du PTP pourrait nous permettre de voir une surface d'interaction du point de vue de la phosphatase. D'autre part, l'analyse de couplages résiduels dipolaires (RDC) permettrait de caractériser l'orientation mutuelle des deux domaines PDZ et PTP dans leurs états auto-inhibé ou activé. De manière complémentaire, l'utilisation de marquage paramagnétique qui modifie la relaxation des noyaux des acides aminés situés à proximité de la sonde nous donnerait accès à des informations sur les interactions potentielles entre PDZ et PTP (481, 482). Cette dernière technique de RMN est particulièrement bien adaptée pour l'étude d'interactions transitoires inter-domaines (40, 483).

En dehors de la RMN, plusieurs approches sont envisagées afin d'étudier les interactions inter-domaine et les changements conformationels du PDZ-PTP:

- Le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) est une technique de fluorescence qui permettrait d'étudier les changements conformationels des domaines PDZ - PTP de PTPN4, avec et sans ligand. Cette technique présente l'avantage de pouvoir mettre en évidence qu'une protéine adopte différents états conformationels, même quand certains de ces états sont présents dans une faible proportion, et d'indiquer l'amplitude de ces changements conformationnels (484, 485). Cette technique reste néanmoins particulièrement difficile à mettre en place, notamment en ce qui concerne le choix des sondes de fluorescence et leurs emplacements qui vont dépendre de la contrainte des distances mesurables par FRET.

- Une autre technique envisageable est la spectrométrie de masse couplée aux échanges hydrogène/deutérium. La vitesse d'échange des hydrogènes avec le deutérium est très variable dans une protéine structurée et reflète l'environnement local de chaque acide aminé dans la structure tridimensionnelle, notamment l'accessibilité au solvant.

- Une approche complémentaire consiste à muter différents acides aminés du supramodule et à étudier l'effet de ces mutations sur l'inhibition de l'activité phosphatase ou sur son activation par un PBM. Le choix des mutations à étudier est primordial. Les acides aminés identifiés par l'une des précédentes techniques, pourraient être un bon point de départ. Certaines mutations du linker pourraient également se révéler être intéressantes, notamment celle des deux prolines conservées au centre du linker qui pourraient jouer un rôle dans la dynamique établie entres les deux domaines.

D'un tout autre point de vue, l'étude de la régulation de l'activité du domaine phosphatase de PTPN4 par son domaine PDZ a été encouragée par le possible rôle concerté de ces deux domaines dans les fonctions cellulaires de PTPN4. Le ciblage du domaine PDZ de PTPN4 par une souche atténuée du virus de la rage ou par des peptides

optimisés est l'évènement premier et primordial conduisant à la mort de cellules. Dès lors, nous avons proposé un modèle de compétition entre les peptides viraux ou optimisés et les PBM de partenaires cellulaires pour la fixation au domaine PDZ de PTPN4. Les fortes concentrations de peptides viraux ou optimisés diminuent drastiquement l'interaction de PTPN4 avec ses partenaires et potentiellement entraînent une augmentation de leur phosphorylation. La perturbation de la phosphorylation des ligands endogènes de PTPN4 engendrerait ainsi une perturbation de l'homéostasie cellulaire et induirait la mort des cellules.

Dans ce modèle, il sera indispensable, dans un premier temps, de tester le rôle de l'activité phosphatase de PTPN4 dans sa fonction anti-apoptotique. Dans un deuxième temps, l'implication de la régulation de son activité phosphatase par son domaine PDZ pourrait être explorée *in vivo* par divers mutants de PTPN4 ne présentant plus cette régulation inter-domaine mise à jour lors de ce papier. Pour cela l'identification du mécanisme moléculaire de la régulation intramoléculaire de PTPN4 est essentielle.

RÉSULTATS II : ÉTUDE DE L'INTERACTION DE LA PHOSPHATASE PTPN4 AVEC LA MAPK KINASE P38γ

1) Résumé

À ce jour, les voies de signalisation impliquées dans la fonction anti-apoptotique de PTPN4 ne sont pas connues. La perturbation des interactions de son domaine PDZ avec des partenaires endogènes altère sa fonction et induit la mort des cellules. Avec pour objectif d'élucider ce mécanisme de contrôle de la mort cellulaire, nous avons identifié un ligand endogène du domaine PDZ de cette phosphatase, la MAPK kinase p38γ qui, à travers son interaction avec PTPN4, participerait à la régulation de l'homéostasie cellulaire.

L'extinction de cette kinase entraîne un phénotype similaire à celui de l'extinction de la phosphatase PTPN4 : la mort des cellules. Nous avons mis en évidence leur interaction *in vitro* et *ex cellulo* dans des extraits cellulaires. La protéine p38γ est la seule MAPK kinase à posséder à son extrémité C-terminale une séquence de reconnaissance des domaines PDZ. Ce motif est reconnu par le domaine PDZ de PTPN4 avec une affinité de l'ordre du micromolaire, ce qui fait de la kinase p38γ le ligand endogène le plus affin de PTPN4. Une étude structurale a permis de détailler les bases moléculaires de cette reconnaissance.

De plus, cette reconnaissance PDZ/PBM joue un rôle essentiel dans la formation du complexe entre les protéines p38γ et le supramodule PDZ-PTP issu de PTPN4. Ainsi, nous observons que l'occupation du domaine PDZ de PTPN4 par un PBM empêche la formation de ce complexe.

Par ailleurs, le domaine phosphatase de PTPN4 a la capacité de déphosphoryler la boucle catalytique de p38γ et pourrait de ce fait réguler l'activité de p38γ.

L'étude en solution du complexe par SAXS montre qu'il adopte une conformation compacte, ce qui suggère qu'en plus de la reconnaissance entre le PDZ et le PBM, il existerait des interactions supplémentaires entre la kinase et la phosphatase venant stabiliser le complexe. Ce type d'interaction va dans le sens de notre modèle dans lequel PTPN4 déphosphorylerait ses partenaires recrutés par le domaine PDZ.

2) Article 2 – Maisonneuve *et al* (in preparation)

The Interaction of Human Phosphatase PTPN4 with the MAPK Protein p38g

[1,2,3]Pierre Maisonneuve, [1,2]Célia Caillet-Saguy, [4]Marie-Christine Vaney, [5]Mireille Lafage, [6]Bertrand Raynal, [7]Henri Buc, [5]Monique Lafon, [1,2]Muriel Delepierre, [1,2]Nicolas Wolff

[1] Département de Biologie Structurale et Chimie, Unité de Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules, Institut Pasteur, F-75724 Paris, France.

[2] UMR 3528, CNRS, F-75724 Paris, France.

[3] Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

[4] Unité de Virologie Structurale, Institut Pasteur, CNRS UMR 3569, Paris, France.

[5] Unité de Nueroimmunologie Virale, Institut Pasteur, Paris, France.

[6] Plate-Forme de Biophysique des Macromolécules, Institut Pasteur, F-75724 Paris, France.

[7] Institut Pasteur, F-75724, Paris, France.

Correspondence should be addressed to Nicolas Wolff.
Unité de RMN des biomolécules
Institut Pasteur-URA 2185 CNRS
28, rue du Dr Roux
75724 Paris cedex 15
E-mail: nicolas.wolff@pasteur.fr
tel : +33 (0)1 45 68 88 72 ; fax : +33 (0)1 45 68 89 29

Introduction

PTPN4 is a non-receptor protein tyrosine phosphatase (PTP) that stimulates cell growth, increases cellular motility and protects cells against apoptosis (Gu et al., 1996; Préhaud et al., 2010; Zhou et al., 2013). PTPN4 contains a PDZ module flanking its catalytic domain. PDZ domains are protein-protein interacting domains playing a central role in cell signaling by favoring spatial contacts between enzymes and their substrates, or more generally by assembling and/or regulating protein networks (Harris and Lim, 2001; Lee and Zheng, 2010). Disruption of the complexes formed by PDZ domains and their ligands expressing PDZ binding motifs (PBM) can trigger profound alterations in cell signaling pathways (Aarts et al., 2002; Hou et al., 2010; Yanagisawa et al., 1997). Such disruption of PDZ-PBM complexes can be obtained by treating cells with an excess of cell penetrating peptide encoding a PBM. Indeed, we show that peptides of viral origin encoding a PBM that targets the PDZ domain of PTPN4 (PTPN4-PDZ) can be used to antagonize the function of PTPN4 and promote cell death. The ability of such cell-permeable peptides to promote apoptosis correlates with the affinity they display in vitro for PTPN4-PDZ. We optimized such pro-apoptotic compounds with the Cyto8-RETEV peptide that was the most affine ligand of PTPN4-PDZ and the best inducer of cell death (Préhaud et al., 2010).

The natural ligands of PTPN4-PDZ involved in the regulation of cell homeostasis remain unknown despite several studies exploring the double hybrid-system. Nevertheless, the p38γ-mitogen-activated protein kinase (MAPK) was recently identified as an endogenous partner of the PDZ domain of PTPN3, the closest homologous protein of PTPN4. MAPKs, including extracellular signal-regulated kinases (ERKs), c-Jun N-terminal kinases (JNKs), and p38s, are a major class of kinases involved in signaling cascades that mediate and integrate signals for a coordinated cellular response such as proliferation, transformation, and cell death (Raman et al., 2007). Among MAPK family proteins, p38γ is the only member with its carboxy-terminal sequence (KETPL) serving as a PBM to interact with PDZ domain-containing proteins. Hou *et al.* demonstrated that the Ras dependent oncogenic activity of p38γ resulted from the direct interaction between the PBM of p38γ and the PDZ domain of PTPN3 (PTPN3-PDZ) and from the cooperation of the PTPN3-PDZ and catalytic domains for the dephosphorylation of a phosphotyrosine residue, present on the p38γ substrate (Hou et al., 2010). PTPN3 and

PTPN4, members of the NT5 non-receptor tyrosine phosphatase family, both contain a PDZ module flanking their catalytic domain and display a strong sequence identity (71% for PDZ and 65% for the phosphatase domain PTP). Morevover, silencing PTPN4 or p38γ genes appears to be phenotypically equivalent and resulting inmassive cell death (Kukkonen-Macchi et al., 2011). We surmised that p38γ could be the ligand for PTPN4-PDZ and that the interaction between PTPN4 and p38γ promotes anti-apoptotic signaling.

Here, we show that full-length p38γ and PTPN4-PDZ interact *ex cellulo* in GST-pull down. The C-terminal sequence of p38γ (p38γ-KETPL) encompassing the PBM promotes efficiently death of human glioblastoma upon intracellular delivery targeting PTPN4-PDZ. Moreover, p38γ-KETPL interacts tightly with PTPN4-PDZ and is the most affine endogenous PTPN4 ligand. NMR and X-ray structural data of PTPN4-PDZ complexed to p38γ-KETPL or to the optimized peptide Cyto8-RETEV lead us to identify the structural basis for their recognition by PTPN4-PDZ. Finally, we highlight the predominant role of the PDZ/PBM association in the molecular interactions between the full-length p38γ and the active supramodule PDZ-PTP of PTPN4.

Experimental Procedures

Detection of Cell Death

Peptides were conjugated to the HIV-1 Tat domain and labeled with a FITC molecule as previously described (Préhaud et al., 2010)*. Human grade III U373M Gastrocytoma cells (HTB 17; ATCC) (250,000 cells per well in 1 ml culture medium) were treated with FITC-conjugated peptides (25 mM). Three hours post treatment, cells were detached by trypsin treatment, washed in phosphate buffer (SPB)* Ca^{2+},Mg^{2+}*, and assayed for peptide entry and cell death. Membrane permeation, a marker of cell death, was measured by detecting the passage of PI (Annexin V Kit; R&D Systems). Cells were analyzed by flow cytometry. A total of 30,000 cells was sampled for each analysis.*

GST-pulldown Assay

GST fusion construct containing PDZ domain of PTPN4 (GST-PTPN4-PDZ) were expressed and purified as previously described (Babault et al., 2011) without the TEV cleavage step. GST was purified after a TEV cleavage step of a GST fusion construct.

Purified GST-PTPN4-PDZ or GST were individually incubated with Glutathione Agarose for 1 hour at 4°C with mild shaking. Then, the Glutathione Agarose was collected by centrifugation, washed three times with binding buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, TCEP 0.5 mM). Immobilized GST or specific GST-PTPN4-PDZ were incubated with mild shaking for 1 hour at 4°C with equivalent ratio (v:v) beads: lysate of neuroblastoma cell (SH-SY5Y cells) which are prepared as previously described (Cordier et al., 2012). Glutathione Agarose was washed four times and resuspended in a SDS–PAGE sample buffer. After boiling, the bound proteins were analyzed using 12% SDS–PAGE followed by Western blotting using the anti-p38γ antibody (Cell Signaling, #2307).

NMR Experiments

The ^{15}N-labeled PDZ domain was purified to a final concentration of 112 µM in 280 µl of Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, TCEP 0.5 mM buffer containing 12 % D_2O. All of the NMR hetero-nuclear single quantum correlation (HSQC) spectra were acquired at 25 °C on a Varian Inova 600-MHz spectrometer equipped with a cryogenically cooled triple-resonance pulsed field gradient probe. NMR titration experiments were recorded as previously described to measure PTPN4-PDZ/peptide affinities (Préhaud et al., 2010). The unlabeled Cyto8-KETPL was added stepwise to a final PDZ/peptide ratio of 1:12. The final concentration of peptide was 1.25 mM. The ^{1}H-^{15}N HSQC spectra were recorded for 10 different titration points.

Production of Recombinant Proteins

P38γ is encoded as an N-Terminal 6 histidine (His) tagged protein and is cloned in a pET15b expression plasmid. The constructs of non-labeled and uniformly ^{15}N-labeled and non-labeled PTPN4 PDZ, PTP, PDZ-PTP^{WT}, PDZ-PTP^{CS} were expressed and purified as previously described (Maisonneuve, 2014). The p38γ protein was purified as previously described for His-Tagged protein (Maisonneuve, 2014). PDZ ligands, p38γ-KETPL (SWARVSKETPL), Cyto8-RETEV (SWESHKSGRETEV), and the phosphotyrosyl pTyr peptides TGpY (ADSEMTGpYVVTR), pTGpY (ADSEMpTGpYVVTR) were synthesized in solid phase using a Fmoc strategy (Proteogenix).

Enzymatic Assays

Phosphatase activity with phospho-peptides and *p*NPP was measured as previously described (Maisonneuve, 2014). Reactions were measured with various phospho-

peptide pTGpY concentrations ranging from 1.8 μM to 225 μM.

ITC

ITC experiments were performed with an ITC-200 (MicroCal) at 25°C, with a buffer of 150 Mm Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM and 0.5 mM TCEP. Protein concentrations in the cell were initially around 30.0 μM, whereas peptide or protein concentrations in the syringe were 300 μM. For the competition experiments, the initial concentration of the p38γ-KETPL peptide in the cell was 150 μM. 16 aliquots of 2.4 μl of peptide were injected from the 40 μl syringe into the 200 μl cell, leaving an interval of 180 sec between injections. The enthalpy of binding (ΔH), affinity constant (Ka) and molar binding stoichiometry (N) were obtained directly from the titration curve fitted with the single-site binding model of Origin software.

Crystallization, Data Collection and Structure Determination

Initial crystallization screening was carried out by the vapor diffusion method using a CartesianTM nanoliter dispensing system (Santarsiero et al., 2002). Sitting drops containing 200 nl of protein complex (4.5 mg/ml) and 200 nl of the crystallization solution were equilibrated against 150 μl of the buffer solution in Greiner plates. Screening trials (576 conditions) were performed using commercially available sparse-matrix kits. The crystallization conditions were reproduced and optimized using crystallization solutions generated by the Matrix Maker automated formulation system from Emerald BioSystems. Crystals were grown at 18 °C using the sitting drop vapor diffusion method. The protein solution was mixed with crystallization buffer and equilibrated against a reservoir of crystallization buffer.

The Cyto8-RETEV and p38γ-KETPL peptides used for the PDZ-peptide co-crystallization were added in excess to form more than 95% of complex. The crystallization conditions and mixing ratios of the protein to crystallization buffer are given in Table S1. Crystals were flash-cooled in liquid nitrogen using Paratone-paraffin (50%/50%) oil as the cryoprotectant. X-ray diffraction data were collected on beamline PROXIMA1 at Synchrotron SOLEIL (St. Aubin, France). The data were processed with XDS, SCALA, and other programs from the CCP4 suite (Winn et al., 2011).

Structures were solved by molecular replacement using PHASER (McCoy, 2007) and the atomic model of PTPN4-PDZ (PDB accession code 3NFK). The locations of the bound

peptides were determined from a Fo-Fc difference electron density map. Models were rebuilt using COOT (Emsley and Cowtan, 2004), and refinement was performed using BUSTER (Blanc et al., 2004). The overall assessment of model quality was performed using MolProbity (Lovell et al., 2003). The crystal parameters, data collection statistics, and final refinement statistics are shown in Table 1. All structural figures were generated with the PyMOL program.

Phosphorylation of p38γ

To generate phosphorylated p38γ, a p38γ sample was mixed at a molar ratio of 1:4000 of MKK6-EE:p38γ in a buffer composed of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 100 mM MgCl2, 2 mM ATP. The mixture was incubated overnight at room temperature. Following incubation, the sample was purified by an ion-exchange column (HiScreen Q HP) and then eluted with a NaCl gradient from 0 M to 200 mM over 6 column volumes. Correct phosphorylation of p38γ was verified by ESI-MS.

SAXS

SAXS samples were prepared in a buffer of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.5 mM TCEP. For isolated proteins, a sample of 50 µl at 70 µM of each protein was injected into a size-exclusion column (Agilent Bio SEC-3, 4,6 mM) using an Agilent© High Performance Liquid Chromatography system cooled at 25°C and eluted directly into the SAXS flow through capillary cell at a flow rate of 200 µl/min (David and Pérez, 2009). For the experiments corresponding to the complexes, the column was equilibrated with a buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP) containing the unphosphorylated or the monophosphorylated form of p38γ at 50 µM and a sample of 50 µl at 70 µM of PDZ-PTP^{WT} or PDZ-PTP^{CS} were injected into the size-exclusion column. SAXS data were collected online during the entire elution time, with frame duration of 2 s and a dead time between frames of 1 s. The first 30 frames collected during the first minutes of the elution flow were averaged to account for buffer scattering. The 10 frames corresponding to the top of the elution peak were averaged and were used for data processing after baseline subtraction. Synchrotron radiation x-ray scattering data were collected on SWING Beamline at Synchrotron SOLEIL France and data were analyzed using programs in the ATSAS package (Konarev et al., 2003).

Results

A direct interaction between PTPN4-PDZ and endogenous p38γ was detected by GST pull-down assays using neuroblastoma cell extracts.

To explore a potential interaction between the PBM of endogenous p38γ and PTPN4-PDZ, we performed pull-down analyses using human neuroblastoma SH-SY5Y cell lysates. Purified GST-PTPN4-PDZ or GST alone were incubated with a soluble fraction of SH-SY5Y cells lysates. As shown in Figure 1a, GST-PTPN4-PDZ binds to endogenous p38γ but not to GST alone. The presence of p38γ was initially verified in lysate. The direct interaction was also confirmed with purified recombinant p38γ mixed with Glutathione Agarose bound to GST-PTPN4-PDZ fusion proteins. Thus, the results demonstrate the direct interaction between p38γ and PTPN4-PDZ and support the supposition that p38γ is a potential physiological partner of PTPN4 through PDZ-mediated interaction.

p38γ PDZ binding motif is an efficient inducer of apoptosis in human cell lines expressing PTPN4.

An optimization of pro-death sequences with the help of structural design led us to conceive the best-suited Cyto8-RETEV peptide that was the most affine ligand of PTPN4-PDZ and the best inducer of cell death (Babault et al., 2011). In the same way, the killing efficiency of the Tat-conjugated peptide of the C-terminal PBM of p38γ was estimated in U373 MG (Figure 1b), a human glioblastoma cell line expressing PTPN4. After a three-hour exposure of U373MG to the peptide, a period of time that allows for maximal peptide entry, the induction of cell death was assayed by propidium iodide (PI) assay. Cyto8-RETEV and p38γ-KETPL peptides displayed a similar capacity to enter the cells. Cyto8-RETEV peptide was normalized to 100% level of apoptosis. A two-fold increase of glioblastoma cell death was observed using p38γ-KETPL compared to p38γ-RETEV. Thus, p38γ-KETPL is an efficient inducer of apoptosis in glioblastoma, even better than Cyto8-RETEV. Considering that the affinity of PBM for PTPN4-PDZ is closely correlated to their killing efficiency, these data strongly suggest a high affinity between PTPN4-PDZ and p38γ-KETPL.

p38γ PDZ binding motif has a high affinity for PTPN4-PDZ.

The affinity of p38γ-KETPL for PTPN4-PDZ was measured by NMR titration. $^{15}N/^{1}H$ chemical shift perturbations of the PDZ domain were followed as a function of increasing concentration of the p38γ-KETPL peptide to determine the dissociation constant (K_d). *The* p38γ-KETPL peptide binds to PTPN4-PDZ with K_d of 1.58 ±0.97 μM (Table 2). This affinity is very close to that previously determined for the optimized Cyto8-RETEV (K_d of 1.0 μM). Thereby, the C-terminal sequence of p38γ is the most affine endogenous PTPN4-PDZ ligand compared to the two others already known endogenous partners GluN2A and GluD2 (K_d of 42 μM and 128μM for GluN2A-16 and GluD2-13, respectively) (Babault et al., 2011).

p38γ-KETPL and Cyto8-RETEV peptides have similar binding mode to PTPN4-PDZ.

To investigate the interaction of PTPN4-PDZ with the endogenous ligand p38γ-KETPL or the optimized ligand Cyto8-RETEV, i.e. the two most affine peptides, the crystal structures of the two complexes were solved by molecular replacement at 2.35 Å and 2.09 Å resolution respectively (Table 1).

The structure of PTPN4-PDZ/Cyto8-RETEV and PTPN4-PDZ/p38γ-KETPL are very similar with a root-mean-square deviation (rmsd) of 0.22 Å. PTPN4-PDZ adopts the typical PDZ fold comprising five β-strands and two α-helices (Figure 2a) and possesses the interaction network specific to class I PDZ domains that recognize the consensus peptide sequence X-S/T-X-$\Phi_{\text{-COOH}}$, where X is any residue, and Φ is a hydrophobic residue. The last six C-terminal residues encompassing the PDZ binding motif of Cyto8-RETEV (-GRETEV$_{\text{-COOH}}$) and p38γ-KETPL (-SKETPL$_{\text{-COOH}}$) were well ordered in the crystal. The peptides were inserted into the PDZ-binding pocket in a conventional mode (Figure 2). The interactions of the positions 0, -2 and -3 of both peptides with PTPN4-PDZ are quite similar to the bonding patterns we already observed for the complex between PTPN4-PDZ and the viral peptide Cyto13-att (-ETRL$_{\text{-COOH}}$) (PDB 3NFK). The Cyto8-RETEV sequence has been optimized focusing the residues at positions -1 (R) and -4 (G). Those positions are not involved in the network interaction between the viral sequence and PTPN4-PDZ (Babault et al., 2011). We previously postulated that E at position -1 and R at position -4 in Cyto8-RETEV could induce crucial contact with

surrounding residues of PTPN4-PDZ and consequently improve the affinity for PTPN4-PDZ. Here, we confirmed this hypothesis.

The cationic side chain in the starting viral peptide is unfavorable as it is surrounded by positively charged residues (R527, R546 and K587) of PTPN4-PDZ. The acidic residue in Cyto8-RETEV or neutral residue in Cyto8-KETPL at position -1 are fully exposed to the solvent. However, these residues are H-bonded to PTPN4-PDZ involving the oxygen atom of their peptidic bond and the Hζ of the R527 from PTPN4-PDZ binding site GLGF loop (Figure 2). The basic side-chains at position -4, R for Cyto8-RETEV and K for p38γ-KETPL, form a H-bond with the Cγ carboxyl oxygen of the D580 located at the bottom of the α-helix 2. These additional interactions could mainly explain the variation in the binding free energies of complex formation with Cyto8-att compared to Cyto8-RETEV or p38γ-KETPL, $\Delta\Delta G_0$=RTln(K_D(Cyto8-att)/K_D(Cyto8-RETEV))= 2.8 kcal.mol^{-1} or $\Delta\Delta G_0$=RTln(K_D(Cyto8-att)/K_D(p38γ-KETPL)) = 2.7 kcal.mol^{-1}, corresponding to a 120-fold and 100-fold difference in affinity, respectively.

Thus, similar binding modes of p38γ-KETPL and Cyto8-RETEV with PTPN4-PDZ were found for the key positions of recognition between PBM and PDZ, therefore explain the same strong affinity of p38γ-KETPL and Cyto8-RETEV for PTPN4-PDZ.

The inhibition of the catalytic activity of PTPN4 by its PDZ domain is released when the PDZ binding site is occupied by p38γ-KETPL.

We recently demonstrated that the PDZ domain of PTPN4 down regulates the phosphatase activity through intramolecular interactions and that the mere binding of a PDZ ligand releases this catalytic inhibition (Maisonneuve, 2014). We investigate whether the binding of p38γ-KETPL to the PDZ domain could also affect this catalytic regulation and in turn modulate the phosphatase activity. As we previously reported, the PDZ domain inhibits the catalytic activity of PTPN4 through a mixed inhibition. Indeed, the turnover number (k_{cat}) values decreased by 3.3 fold compared to linker-PTP with PDZ-PTP^{WT} while the Michaelis constant (K_M) value decreased by a 2.2 fold, using *p*NPP as substrate (Table 3). The kinetic analysis of PDZ-PTP^{WT} was then carried on in the presence of p38γ-KETPL peptide at a concentration (40 µM) sufficient enough to ensure the maximal effect of the PDZ ligand on the phosphatase activity. Both the k_{cat} and K_M values significantly increased in the presence of p38γ-KETPL, showing that the release of the inhibitor operates with partial compensation of the effect on the two rate constants

(Table 3). The k_{cat} and K_M values are 2.3 fold and 2.2 fold higher, respectively, in presence than in the absence of p38γ-KETPL.

Altogether, these data indicate that the PBM of p38γ has the ability to modulate the phosphatase activity of PTPN4 with the same characteristics that are previously described with the tailored peptide Cyto8-RETEV.

The PBM of p38γ is the major contributor to the PTPN4/p38γ-unphosphorylated interaction.

We establish that p38γ-KETPL interacts tightly with PTPN4-PDZ and modulates the catalytic activity of the phosphatase. Next, we studied the contribution of this PBM/PDZ interaction to the association between PDZ-PTP^{WT} from PTPN4 and the full-length p38γ by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). First, we noticed that p38γ-KETPL binds PDZ-PTP^{WT} with an affinity (1.54 ± 0.24 µM) similar to that observed by NMR for PTPN4-PDZ with p38γ-KETPL. This indicates that the PTP domain does not affect the PDZ ligand binding. Secondly, the full-length p38γ binds PDZ-PTP^{WT} with an affinity of 4.1 ± 0.3 µM that is slightly higher that the one calculated for the PDZ-PTP^{WT}/ p38γ-KETPL association. As expected, the interactions are mainly driven, in both cases, by an overall enthalpy contribution and with an unfavorable entropic penalty for the full-length P38γ, most likely due to a decreased conformational freedom of the two proteins in the presence of the kinase domain (Table 2). Next, we investigated the contribution of the PBM recognition on the PDZ-PTP^{WT}/p38γ interaction. The addition of the p38γ-KETPL peptide in large excess (i.e 95% of saturation of the PDZ binding site) abrogates the interaction between PTPN4-PDZ and p38γ (Table 2, Figure S1). The PBM/PDZ association is therefore the major contributor to the PDZ-PTP^{WT}/p38γ interaction. However, a residual heat [$\Delta H \approx -4.1$ kcal.mol^{-1}] was observed at the end of the p38γ titration or during the competition experiment. However, this enthalpy does not correspond to the heat of dilution (Figure S1b, inset). This event could be related to a weak binding of PDZ/PBM off-site, which could involve the phosphatase domain and the kinase domain.

The phosphatase PTPN4 discriminates the phosphorylate states of the activation loop of p38γ.

The canonical p38 MAPK-activation involves phosphorylation of threonine and tyrosine residues in the activation loop (**T$_{183}$**G**Y$_{185}$** for p38γ) of the kinase, which induces conformational changes that allow both binding to substrates and catalytic activity of p38 MAPK. We previously demonstrated that PTPN4 efficiently dephosphorylates the mono-phosphorylated activation loop (TG**pY**) of p38γ. Here, we tested if the phosphatase PTPN4 is able to discriminate between distinct phosphorylated states of the activation loop of p38γ. To this aim, the phosphatase domain of PTN4 was assessed for its ability to dephosphorylate the dually phosphorylated (pTGpY) activation loop of p38γ that corresponds to the fully activated kinase. The linker-PTP dephosphorylates pTGpY following Michaelis-Menten Kinetics (Figure S2). The k_{cat} values are similar for both pTGpY and TGpY substrates (11.5 ± 0.7 s^{-1} vs 11.7 ± 0.2 s^{-1}). However, the K_M is enhanced by a 3.5-fold with pTGpY as compared to TGpY (4.7 ± 0.5 µM vs 16.2 ± 0.2 µM). Thus, the catalysis efficiency (k_{cat}/K_M ratio) increase by a 3.4-fold for pTGpY (Table 3). In conclusion, the presence of a phosphorylation on the threonine of the activation loop significantly improves its recognition by the PTPN4 phosphatase.

The PTPN4-p38γ complex has a compact organization regardless of the state of p38γ phosphorylation .

We used small angle X-ray scattering (SAXS) to characterize the conformational organization of the PDZ-PTP^{WT}/p38γ complex and to probe the effect of the p38γ phosphorylation on its overall conformation. We recently reported the conformational analysis of PDZ-PTP^{WT} from PTPN4 by SAXS (Maisonneuve, 2014). The phosphorylated form of p38γ (phospho-p38γ) that we used for the SAXS experiments is mono-phosphorylated on its activation loop (TGpY) using a constitutively active mutant of MKK6. SAXS profiles ($I(q)$ versus q, with intensity I and scattering vector q) and pair-distribution functions of p38γ and the complexes are shown in Figure 3. SAXS data of high quality were obtained using SAXS measurements acquired in line during elution of the protein sample from a gel filtration column.

The SAXS profiles of non-phosphorylated and phosphorylated p38γ are similar, reflecting their common global fold (Figure 3). The maximum distance of the protein (D_{max}) and the radius of gyration (R_g) can be derived from the electron pair distance

distributions function P(r) (Figure 3 inset). The D_{max} and R_g values for unphosphorylated p38γ, are 81.3 Å and 24.02 ± 0.06 Å, respectively, and 84.7 Å and 24.07 ± 0.05 Å, respectively for phospho-p38γ (Table 4). Those values are similar to those obtained with the isoform p38α previously reported (23.7 ± 0.4 Å) (Francis et al., 2011).

Then, an equivalent SAXS analysis was performed for complexes PDZ-PTP^{WT}/p38γ and PDZ-PTP^{CS}/phospho-p38γ. PDZ-PTP^{CS}/phospho-p38γ represents a substrate trapping complex in which PDZ-PTP^{CS} is a catalytically inactive mutant. Both PDZ-PTP^{WT}/p38γ and PDZ-PTP^{CS}/phospho-p38γ complexes behave as a monodisperse distribution of monomers in solution. The SAXS profile of phosphorylated p38γ–PTPN4 complex is similar to the one of the non-phosphorylated p38γ–PTPN4 complex, reflecting a similar global shape of the complexes (Figure 3). The D_{max} and R_g values are, for PDZ-PTP^{WT}/p38γ, 133 Å and 37.58 ± 0.06 Å, respectively, and 127.2 Å and 37.17 ± 0.05 Å, respectively, for PDZ-PTP^{CS}/phospho-p38γ (Table 4). These R_g values are considerably larger than that of p38γ alone but close to that of PDZ-PTP (33.1 ± 0.06 for PDZ-PTP^{WT} and 32.63 ± 0.06 for PDZ-PTP^{CS}). Collectively, these results demonstrate that the p38γ/PDZ-PTP complexes are rather compact. However, we noticed that the D_{max} and R_g values are lower for the phosphorylated p38γ complex, illustrating a slightly more compact shape compared to that of the non-phosphorylated complex.

Discussion

We previously described that PTPN4 functions as an anti-apoptotic protein (Préhaud et al., 2010). However, the proteins that directly interact with PTPN4 to regulate cell growth are poorly known. In this study, we identified the MAP kinase p38γ as a PTPN4-interacting protein. Both p38γ and PTPN4 are well-expressed in human neuroblastoma cells and we show that they interact *in vitro* and in neuroblastoma cell extracts. This interaction is mediated by the PDZ domain of PTPN4 and the PBM of p38γ. p38γ represents the best affine endogenous partner of PTPN4 through the PDZ/PBM interaction with a micromolar affinity. The X-ray structure of the complex highlights that the PBM of p38γ possesses the structural determinants for a high affinity binding by the PTPN4-PDZ. In addition, the C-terminal sequence of p38γ alone is able to mainly recapitulate the thermodynamics properties observed in the full-length p38γ/PTPN4 PDZ-PTP complex. The PDZ/PBM interaction is therefore the major contributor to the p38γ–PTPN4 complex formation. Interestingly, p38γ is unique among the p38 kinase family by the presence of a C-terminal PBM. Thus, the recognition of the kinase PBM by the PDZ domain of PTPs greatly participate to the specificity of the interaction compared to others p38s.

The p38γ/PDZ-PTP complex forms a compact complex as monitored by our SAXS data. This observation suggests that the kinase could interact extensively with the phosphatase despite our first observation describing the PDZ/PBM interaction as the major contributor to the formation of the PDZ-PTP/p38γ complex. Indeed, one would expected an elongated shape considering the unique PBM anchor point located at the flexible and unstructured C-terminal extremity of p38γ. A residual energy has been also observed by ITC that could correspond to supplementary weak interactions between PDZ-PTP and p38γ. Thus, additional contacts likely occur between the phosphatase and the kinase domains contributing to the compact conformation of PDZ-PTP/p38γ complex in solution. Interestingly, such weak interactions have been described between the unphosphorylated p38α kinase and the STEP phosphatase in addition to the essential interaction between the kinase interaction motif (KIM) of STEP and p38α (Francis et al., 2013). We plan to further characterize the large PDZ-PTP/p38γ complex by NMR to identify extra interactions between PDZ-PTP and the

catalytic domain of p38γ. Furthermore, we observe that the phosphorylation of the activation loop of p38γ leads to a more compact conformation of PDZ-PTP/p38γ complex as it has already been observed for the STEP/p38α complex. This slight modification could reflect a reorientation of domains to properly position the p38 activation loop for its further dephosphorylation by the phosphatase domain.

We previously demonstrated that the phosphatase domain of PTPN4 has the ability to hydrolyze the monophosphorylated TGpY activation loop of p38γ (Maisonneuve et al., 2014). Here, we establish that the phosphatase domain of PTPN4 discriminates the phosphorylation states of the Thr of the p38γ activation loop with a better recognition of the dually phosphorylated sequence. This could be achieved by the secondary pTyr substrate-binding pocket present in PTP family (Puius et al., 1997). This pocket in PTPN4 has been classified as inaccessible to pTyr residue but may interact with phospho-threonine or phospho-serine residues (Barr et al., 2009). The secondary binding pocket of PTPN4 could then interact with pThr and discriminate the p38γ phosphorylation state. This is supported by the ability of this site to bind a phospho-mimetic sulfate ion as observed in the X-ray structure (PDB code 2I75). In the same way, the MAP Kinase p38α catalytic activity has already been shown to be dependent of the mono- or dual phosphorylation state of its activation loop (Zhang et al., 2008). Monophosphorylated p38α may serve as a cell control of the signal intensity (Askari et al., 2009). PTPN4 could then regulates the intensity of the p38γ responses to upstream signals by strongly dephosphorylates the dual phosphorylated kinase.

We recently showed that the phosphatase activity of PTPN4 is inhibited by its adjacent PDZ domain. The binding of a PBM to the PDZ domain lifts this inhibition and restores the catalytic properties of the phosphatase (Maisonneuve et al., 2014). Here, we show that the C-terminal sequence of p38γ has also the ability to lift the phosphatase inhibition by interacting with the PDZ domain. This phosphatase activation could serve to enhance the dephosphorylation of the TGY activation loop of p38γ after the first PDZ/PBM recognition step.

Finally, we provide structural and biological evidence of the interaction between the PDZ domain of PTPN4 and the PBM of one of its endogenous binding partners, p38γ. The perturbation of this interaction by the rabies virus (RABV) G protein could be the key of the induced apoptosis by the attenuated strain of RABV. Indeed, the targeting of

the PDZ domain of PTPN4 by the PBM of the viral G protein abrogates the protective role of PTPN4 and triggers apoptosis. Thus, hijacking the p38γ-PTPN4 signaling could be the key of the apoptosis phenotype. This is in agreement with the previous observations that depletion of p38γ or PTPN4 alone triggers apoptosis in several cell lines (Kukkonen-Macchi et al., 2011; Préhaud et al., 2010), which can be mimicked by application of a specific peptide through inhibition of p38γ/PTPN4 interaction.

TABLES :

Table 1. Crystallographic and structure refinement statistics

	PTPN4/ Cyto8-RETEV	PTPN4/ p38γ-KETPL
Crystal Form		
Space group	C2 2 2_1	C2 2 2_1
Unit cell (Å)	77.71, 80.88, 170.23 90.0, 90.0, 90.0	68.56, 76.12, 198.68 90.0, 90.0, 90.0
Molecule per asymmetric unit	4	4
Data Collection [a]		
Resolution range (Å)	46.80-2.09 (2.20-2.09)	49.35-2.35 (2.48-2.35)
Number of unique reflections	30269 (2870)	21504 (2967)
Completeness (%)	94.2 (63.0)	97.5 (93.7)
Multiplicity	4.7 (3.1)	4.6 (3.5)
R_{merge} (%)[b]	4.9 (50.8)	7.6 (49.7)
<I/s(I)>	14.2 (1.7)	12.7 (2.2)
Refinement		
R factor (%)[c]	22.91	22.52
R free (%)[d]	23.95	24.48
Rmsd bond lenght (Å) (angle[°])	0.007(0.97)	0.007 (0.98)
Ramachandran Plot[e]		
Most favored (%)	96.8	96.6
Additional allowed (%)	2.6	3.1
Outliers (%)	0.52	0.26

[a] Values in parentheses refer to statistics in the highest bin.
[b] $R_{merge} = \sum|(I - <I>)/\sum(I)$.
[c] R factor = $\sum|F_{obs} - F_{calc}|/\sum F_{obs}$.
[d] R_{free} was calculated with 5% of the data excluded from the refinement.
[e] Categories were defined by MolProbity.

P38γ	Cell titration	PTPN4 constructs	N	K_d (µM)	ΔH (kcal/mol)	-TΔS (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
P38γ-KETPL	Buffer	PDZ		1.58 ± 0.97	-	-	-
P38γ-KETPL	Buffer	PDZ-PTP$^{C/S}$	0.88 ± 0.02	1.54 ± 0.24	-6.92 ± 0. 18	- 1.00 ± 0.44	-7.93 ± 0.13
P38γ	Buffer	PDZ-PTP$^{C/S}$	0.90 ± 0.01	4.10 ± 0.28	-7.93 ± 0.16	0,58 ± 0.31	-7.35 ± 0.06
P38γ	P38γ-KETPL	PDZ-PTP$^{C/S}$			No titration		

Table 2. Constants of dissociation and thermodynamic parameters of p38γ binding with different PTPN4 constructs.

Kd were measured using ITC at 25°C with PTPN4 constructs at a concentration of 30 µM in Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, TCEP 0.5 mM. pTyr peptide was added at 150 µM for the last experiment. ΔH and TΔS correspond to the enthalpy and entropy of the system, respectively.

	PTPN4 constructs	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1}.M^{-1}$)
*p*NPP	*linker-PTP	640 ± 24	5.0 ± 0.2	7810 ± 380
	*PDZ-PTP^{WT}	290 ± 10	1.5 ± 0.1	5170 ± 430
	*PDZ-PTP^{WT} + Cyto8-RETEV (40 µM)	690 ± 15	3.8 ± 0.2	5510± 170
	PDZ-PTP^{WT} + p38g-KETPL (40 µM)	640 ± 60	3.5 ± 0.4	5543 ± 628
TGpY	*linker-PTP	16.2 ± 0.2	11.7 ± 0.3	722 E3 ± 20.5
pTGpY	linker-PTP	4.70 ± 0.5	11.5 ± 0.2	2450 E3 ± 264.0

Tables 3. Kinetic parameters of the hydrolysis of *p*NPP and phosphorylated TGY-p38γ loop by various PTPN4 constructs.

The initial reaction rates at each substrate concentration were independently measured at pH 7.5 and 25°C. The Michaelis constant (K_M) and the turnover number (k_{cat}) values were deduced by fitting the experimental data to the Michaelis-Menten equation. The data and error are representative of three independent experiments. * Data from Maisonneuve *et al* (2014).

	R_g (Å) Reciprocal space	R_g (Å) Real space	D_{max} (Å)
PDZ-PTP^{WT}	32.86	33.1 ± 0.06	114.5
PDZ-PTP^{CS}	32.35	32.63 ± 0.06	110.8
P38γ	24.02	24.02 ± 0.06	81.3
Phospho-P38γ	24.07	24.07 ± 0.05	84.7
PDZ-PTP^{WT}/ P38γ	37.37	37.58 ± 0.06	133
PDZ-PTP^{CS}/ phospho-p38γ	36.98	37.17 ± 0.05	127.2

Table 4. SAXS analysis of PDZ-PTP from PTPN4, full-length p38γ and the complexes.

FIGURES :

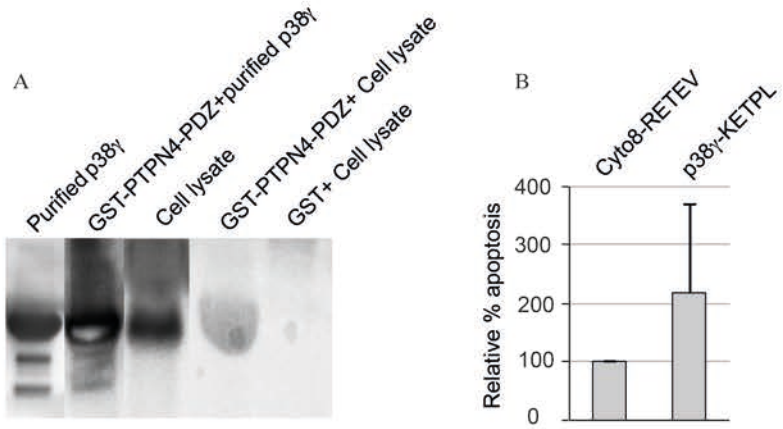


Figure 1: Interaction between PTPN4-PDZ and endogenous p38γ and killing efficiency of cell-penetrating PBM of p38γ.

(A) GST pull-down assay demonstrating *in vitro* binding between PTPN4-PDZ and p38γ. Lane 1 shows the signal from purified p38γ. Immobilized GST-PTPN4-PDZ were mixed with purified p38γ in lane 2. Lane 3 shows the signal of endogenous p38g in lysate SH-SY5Y. Line 4 shows the signal from immobilized GST-PTPN4-PDZ mixed with lysate SH-SY5Y. The control of immobilized GST mixed with lysate SH-SY5Y is shown line 5.

(B) Induction of Death in U373MG Astrocytoma Cells by p38γ-KETPL. Relative cell death by p38γ-KETPL (GRETEV peptide apoptosis taken as 100%). Cell death was induced by a 3 hours peptide treatment in 4 independent experiments.

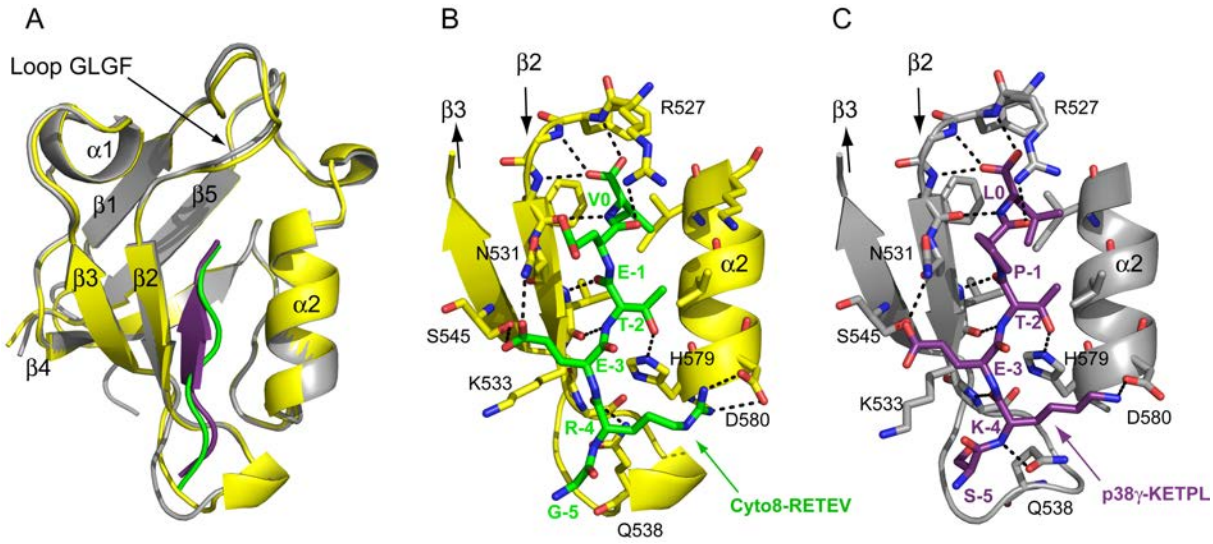


Figure 2: Structure of PTPN4-PDZ bound to Cyto8-RETEV and P38γ-KETPL

(A) Superposition of PTPN4-PDZ bound to Cyto8-RETEV (yellow and green respectively) and p38γ-KETPL (grey and purple respectively). Peptides bind to the PDZ domain through a canonical mode in the PDZ binding site delimited by the β2 strand, α2 helix and the GLGF loop.

(B -C) Close-up views of the PTPN4-PDZ/peptide-binding sites. Important residues are shown as sticks in CPK colors. Peptides form an antiparallel β sheet with the β2 strand via a complete set of intermolecular canonical backbone H-bonds. All H-bonds between PTPN4-PDZ and peptides are indicated by black dashed lines. Color-code for PTPN4-PDZ and peptides is the same as A.

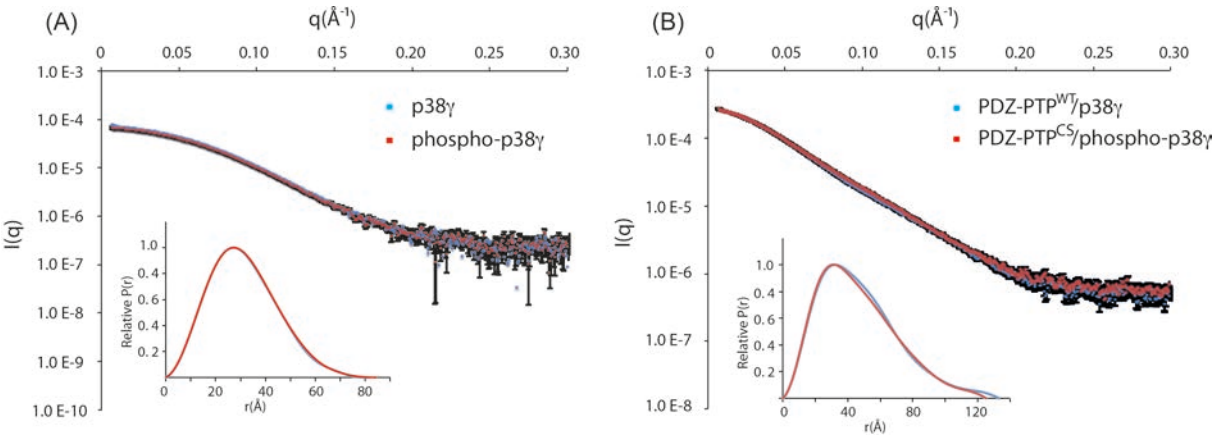


Figure 3: SAXS analysis of p38γ and phospho- p38γ and their complexes with PTPN4.

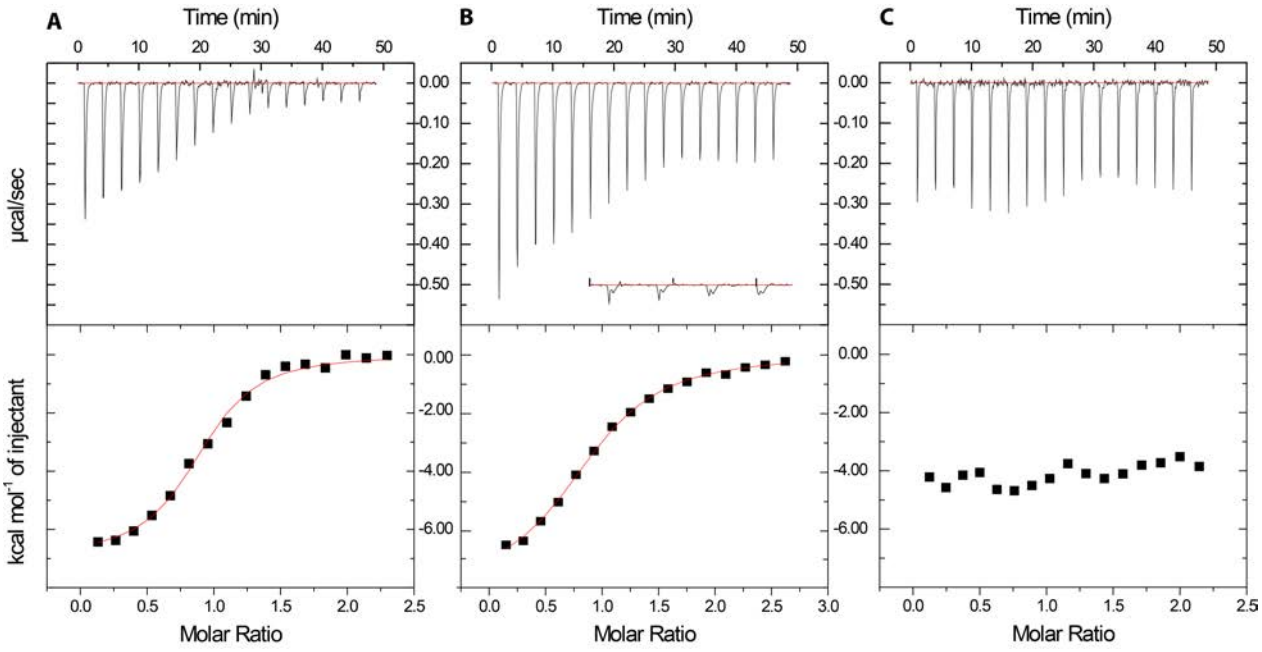
(A) Experimental SAXS data (I(q) vs q), of the p38γ and phospho-p38γ shown as blue and red squares respectively with error bars as black lines. The inset illustrate the P(r) functions of the p38γ and phospho-p38γ with the same color code.

(B) Experimental SAXS data (I(q) vs q), of the PTPN4-PDZ_PTP^{WT}/p38γ and PTPN4-PDZ_PTPCS/phospho-p38γ complexes shown as blue and red squares respectively with error bars as black lines. The inset illustrate the P(r) functions of the PTPN4-PDZ_PTP^{WT}/p38γ and PTPN4-PDZ_PTPCS/phospho-p38γ complexes with the same color code.

Supplemental Information

The Interaction of Human Phosphatase PTPN4 with the MAPK Protein p38g

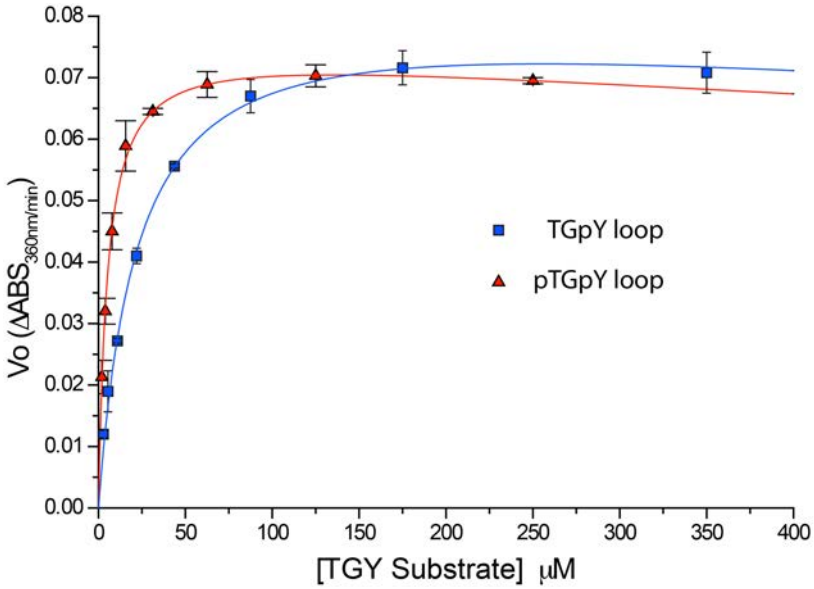
[1,2,3]Pierre Maisonneuve, [1,2]Célia Caillet-Saguy, [4]Marie-Christine Vaney, [5]Monique Lafon, 6Bertrand Raynal, 7Henri Buc, [1,2]Muriel Delepierre, [1,2]Nicolas Wolff



<u>Figure S1</u>: Isothermal calorimetry titrations of PTPN4 PDZ-PTP^{WT} by p38γ-KETPL peptide and full-length p38γ

Raw isothermal titration calorimetry data (upper panels) and derived binding isotherm plotted vs. the molar ratio of titrant fit using a one-site model (lower panels).

(A) PTPN4 PDZ-PTP^{WT} titrated by p38γ-KETPL peptide. (b) PTPN4 PDZ-PTP^{WT} titrated by full length p38γ (the inset correspond to the heat of dilution). (c) PTPN4 PDZ-PTP^{WT} titrated by full length p38γ in the presence of an excess of the p38γ-KETPL peptide.



<u>Figure S2</u>: Hydrolysis of two distinct phosphorylation states of the p38γ activation loop by the catalytic domain of PTPN4

Michaelis-Menten plots of initial rates of mono-phosphorylated TGpY loop (blue) and dual-phosphorylated pTGpY loop (red) hydrolysis by the PTPN4 linker-PTP domain. The data shown are representative of three independent determinations.

	PTPN4-PDZ/Cyto8-RETEV	PTPN4-PDZ/p38γ-KETPL
Protein Buffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 0.5 mM TCEP	50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 0.5 mM TCEP
[Protein] (mg/ml)	4.5 g/L	5g/L
Protein: Peptide ratio	1:2	1:4
Crystallization conditions	23 % PEG 8000 0.1 MES pH 6.0 0.2 Calcium acetate 0.143 mM Ammonium sulfate	1.2 M Sodium di-hydrogen phosphate 0.8 M di-Potassium hydrogen phosphate 0.1 M CAPS pH 10.5 0.2 M Lithium sulfate 0.67 M Non-Detergent Sulfobetaine (NDSB) 201
Protein : Precipitant ration in crystallization drop (µl)	2:1	1:1
Cryo-protectant	Paratone-paraffin (50%/50%) Oil	Paratone-paraffin (50%/50%) Oil

Table S1: related to Table 1: Crystallization conditions of PTPN4-PDZ in complex with peptides

Four molecules in the asymmetric unit are disulfide-bonded by pair, chain A to B and C to D for the PTPN4-PDZ/Cyto8-RETEV and chain A to D and B to C for the PTPN4-PDZ/P38γ-KETPL complex. Each molecule corresponds to the complex formed by PTPN4-PDZ (chains A, B, C and D) and peptides (chains E, F, G and H). The monomeric state of the PDZ domain in complex with peptides in solution being previously confirmed, implying that the intermolecular disulfide bond is due to crystalline conditions (Babault et al., 2011) and (Maisonneuve, 2014).

For the peptide chains of the PTPN4-PDZ/Cyto8-RETEV structure, the electron density of only six of the thirteen residues were well defined in the crystal. For the PTPN4-PDZ/p38γ-KETPL, in two complexes (chains A-E and B-F), the electron density of only six residues of Cyto13-att was well defined, whereas, due to crystal packing in the other complex (chains C-G and D-H), all of the 11 residues of p38γ-KETPL in chain G and H were well ordered. PDZ domains superimpose very well with a Cα RMSD of 0.17 Å and 0.33 Å for the PTPN4-PDZ/Cyto8-RETEV and PTPN4-PDZ/ p38γ-KETPL complexes, respectively, indicating that crystal packing has no influence in the overall structure of the PDZ domain. In the main text, we described the PTPN4-PDZ/Cyto8-RETEV complex formed by the C and G chains and the PTPN4-PDZ/P38γ-KETPL complex formed by the D and H chains.

REFERENCES

Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y.-T., Salter, M.W., and Tymianski, M. (2002). Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. Science *298*, 846-850.

Askari, N., Beenstock, J., Livnah, O., and Engelberg, D. (2009). P38Alpha Is Active in Vitro and in Vivo When Monophosphorylated At Threonine 180. Biochemistry *48*, 2497-2504.

Babault, N., Cordier, F., Lafage, M., Cockburn, J., Haouz, A., Prehaud, C., Rey, F.a., Delepierre, M., Buc, H., Lafon, M., and Wolff, N. (2011). Peptides targeting the PDZ domain of PTPN4 are efficient inducers of glioblastoma cell death. Structure *19*, 1518-1524.

Barr, A.J., Ugochukwu, E., Lee, W.H., King, O.N.F., Filippakopoulos, P., Alfano, I., Savitsky, P., Burgess-Brown, N.a., Müller, S., and Knapp, S. (2009). Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. Cell *136*, 352-363.

Blanc, E., Roversi, P., Vonrhein, C., Flensburg, C., Lea, S.M., and Bricogne, G. (2004). Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. Acta Crystallogr. D *60*, 2210-2221.

Cordier, F., Chaffotte, A., Terrien, E., Préhaud, C., Theillet, F.-X., Delepierre, M., Lafon, M., Buc, H., and Wolff, N. (2012). Ordered phosphorylation events in two independent cascades of the PTEN C-tail revealed by NMR. J. Am. Chem. Soc. *134*, 20533-20543.

David, G., and Pérez, J. (2009). 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.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D *60*, 2126-2132.

Francis, D.M., Różycki, B., Koveal, D., Hummer, G., Page, R., and Peti, W. (2011). Structural basis of p38α regulation by hematopoietic tyrosine phosphatase. Supplement info. Nat Chem Biol *7*, 916-924.

Francis, D.M., Kumar, G.S., Koveal, D., Tortajada, A., Page, R., and Peti, W. (2013). The Differential Regulation of p38α by the Neuronal Kinase Interaction Motif Protein Tyrosine Phosphatases, a Detailed Molecular Study. Structure *21*, 1-12.

Gu, M., Meng, K., and Majerus, P.W. (1996). The effect of overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTPMEG on cell growth and on colony formation in soft agar in COS-7 cells. Proc Natl Acad Sci USA *93*, 12980-12985.

Harris, B.Z., and Lim, W.a. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. J. Cell Sci *114*, 3219-3231.

Hou, S.-W., Zhi, H.-Y., Pohl, N., Loesch, M., Qi, X.-M., Li, R.-S., Basir, Z., and Chen, G. (2010). PTPH1 dephosphorylates and cooperates with p38gamma MAPK to increase ras oncogenesis through PDZ-mediated interaction. Cancer Res *70*, 2901-2910.

Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., and Svergun, D.I. (2003). PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. J Appl Crystallogr *36*, 1277-1282.

Kukkonen-Macchi, A., Sicora, O., Kaczynska, K., Oetken-Lindholm, C., Pouwels, J., Laine, L., and Kallio, M.J. (2011). Loss of p38gamma MAPK induces pleiotropic mitotic defects and massive cell death. J. Cell Sci *124*, 216-227.

Lee, H.-J., and Zheng, J.J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. Cell Commun Signa *8*.

Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2003). Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. Proteins *50*, 437-450.

Maisonneuve, P. Caillet-Saguy, C., Raynal, B., Gilquin, B., Chaffotte, A., Pérez, J., Zinn-Justin, S., Delepierre, M., Buc, H., Cordier, F., Wolff, N. (2014) Allosteric Regulation of the Catalytic Activity of the Human Phosphatase PTPN4 by Its PDZ Domain. (Submited)

McCoy, A.J. (2007). Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. Acta Crystallogr. D *63*, 32-41. Allosteric Regulation of the Catalytic Activity of the Human Phosphatase PTPN4 by Its PDZ Domain

Préhaud, C., Wolff, N., Terrien, E., Lafage, M., Mégret, F., Babault, N., Cordier, F., Tan, G.S., Maitrepierre, E., Ménager, P.*, et al.* (2010). Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. Science sign *3*, 1-10.

Puius, Y.a., Zhao, Y., Sullivan, M., Lawrence, D.S., Almo, S.C., and Zhang, Z.Y. (1997). Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: a paradigm for inhibitor design. Proc Nat. Acad Sci USA *94*, 13420-13425.

Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene *26*, 3100-3112.

Santarsiero, B.D., Yegian, D.T., Lee, C.C., Spraggon, G., Gu, J., Scheibe, D., Uber, D.C., Cornell, E.W., Nordmeyer, R.A., Kolbe, W.F.*, et al.* (2002). An approach to rapid protein crystallization using nanodroplets. J Appl Crystallogr *35*, 278-281.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A.*, et al.* (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr. D *67*, 235-242.

Yanagisawa, J., Takahashi, M., Kanki, H., Yano-Yanagisawa, H., Tazunoki, T., Sawa, E., Nishitoba, T., Kamishohara, M., Kobayashi, E., Kataoka, S., and Sato, T. (1997). The Molecular Interaction of Fas and FAP-1: a tripeptide bloker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. J. Biol. Chem. *272*, 8539-8545.

Zhang, Y.-Y., Mei, Z.-Q., Wu, J.-W., and Wang, Z.-X. (2008). Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states. J. Biol. Chem. *283*, 26591-26601.

Zhou, J., Wan, B., Shan, J., Shi, H., Li, Y., and Huo, K. (2013). PTPN4 negatively regulates CrkI in human cell lines. Cell Mol Biol Lett *18*, 297-314.

3) Perspectives

Notre étude de SAXS indique que le complexe de PTPN4 avec p38γ adopte une conformation compacte. Afin de décrire l'orientation de ces deux protéines en solution, nous avons entamé une étude de dynamique moléculaire utilisant nos données comme contraintes expérimentales, en collaboration avec le laboratoire de Michael Nilges à l'institut Pasteur. L'interaction entre PTPN4 et p38γ est principalement due à la reconnaissance du PBM de p38γ par le domaine PDZ de PTPN4. De ce fait, cette interaction sera utilisée comme contrainte lors du calcul de modélisation. Pour cela, nous disposons de la structure cristallographique du complexe PTPN4-PDZ/PBM-p38γ résolue lors de ma thèse. Par ailleurs, nous savons que la séquence séparant le PBM du domaine catalytique de p38γ est flexible et non structurée. Les résultats de cette étude de modélisation seront alors inclus dans cet article en vue de sa publication.

L'étude du complexe par RMN est une approche indispensable et complémentaire à cette étude de SAXS afin de collecter davantage de contraintes d'interactions, notamment entre les domaines phosphatase et kinase. L'attribution des résonances des atomes du squelette de la kinase entière est en cours au laboratoire par Florence Cordier. Les très bons rendements de production de cette protéine (20 mg par litre de culture) ont permis d'obtenir des échantillons triplements marqués ^{2}H, ^{15}N, ^{13}C, de la kinase à forte concentration (~500 µM) nécessaire pour son étude. Nous avons bénéficié des spectromètres hauts champs de la plate-forme TGIR de Gif-sur-Yvette afin d'optimiser la sensibilité et la résolution des spectres tridimensionnels hétéro-nucléaires collectés. Nous prévoyons dans un premier temps de suivre les perturbations des résonances de p38γ avec l'ajout du supramodule de PDZ-PTP de PTPN4 afin d'identifier la surface d'interaction de la kinase. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux changements de conformation et de dynamique du complexe lorsque la boucle d'activation TGY de la kinase est phosphorylée.

Nous avons également débuté une étude enzymatique de la déphosphorylation de la boucle d'activation de la kinase p38γ entière par le supramodule PDZ-PTP de PTPN4. L'utilisation d'un mutant de la kinase ne possédant pas de PBM à son extrémité C-terminale permettra de préciser le rôle du recrutement de ce motif par le domaine PDZ

de PTPN4 dans l'efficacité de déphosphorylation de la boucle TGY par le domaine phosphatase. Cette étude permettrait alors de proposer un rôle potentiel concerté des domaines PDZ et PTP de PTPN4 pour la déphosphorylation de ses partenaires endogènes.

Des expériences de localisation cellulaire par microscopie confocale sont également en cours avec nos collaborateurs de l'unité de Neuro-immunologie Virale à l'institut Pasteur. Cette étude a pour objectif dans un premier temps, d'étudier la localisation cellulaire de p38γ et de PTPN4, et dans un deuxième temps de montrer que l'utilisation de peptides exogènes codant pour le PBM de p38γ, couplés à la navette Tat, conduit à la perturbation *in cellulo* du complexe PTPN4/p38γ.

DISCUSSION & PERSPECTIVES GÉNÉRALES

L'organisation en domaines des protéines de signalisation permet l'établissement et la ramification du réseau d'interaction protéique ayant pour rôle la transduction du signal dans la cellule. La régulation des domaines au sein de ces protéines a un impact direct sur leurs propriétés de transduction ainsi que sur leur implication dans les voies de signalisation. Les tyrosine-phosphatases, impliquées à large échelle dans les voies de signalisation de la cellule, sont caractérisées par la présence de divers domaines à proximité de leur domaine enzymatique qui peuvent contrôler leur activité catalytique ainsi que leurs fonctions. La tyrosine-phosphatase PTPN4 joue un rôle anti-apoptotique. Elle possède, à proximité de son domaine catalytique, un domaine PDZ qui joue un rôle important dans la régulation de sa fonction anti-apoptotique. Mon objectif, lors de cette thèse, a été d'étudier l'influence du domaine PDZ sur l'activité de la phosphatase et de détailler les mécanismes par lesquels cette régulation s'effectue, ainsi que de décrire son implication dans les voies de signalisation de PTPN4 à travers le recrutement de partenaires.

L'infection de cellules neuronales par une souche atténuée du virus de la rage déclenche l'apoptose des cellules. Le ciblage du domaine PDZ de PTPN4 par la partie cytoplasmique de la glycoprotéine de cette souche virale déclenche ce phénotype. Le domaine PDZ est ainsi la porte d'entrée utilisée par le virus pour détourner la fonction anti-apoptotique de PTPN4. Nous observons le même phénotype de mort cellulaire avec l'utilisation de peptides pénétrants affins pour le domaine PDZ de PTPN4. Ce dernier tient ainsi une fonction centrale dans la fonction anti-apoptotique de PTPN4 et son ciblage représente la première étape cruciale dans l'induction de la mort des cellules.

Il a alors été question d'identifier par quel mécanisme la souche atténuée du virus de la rage ou les peptides pénétrants, en interagissant avec le domaine PDZ de PTPN4, induisent la mort des cellules. Notre modèle est basé sur la compétition entre ces molécules exogènes et un ligand endogène du domaine PDZ de PTPN4, bloquant ainsi la fonction anti-apoptotique de PTPN4. En parallèle, le laboratoire a observé une

corrélation entre l'affinité des peptides exogènes pour le domaine PDZ de PTPN4 et leur efficacité à induire l'apoptose.

Dès lors, nous avons envisagé plusieurs mécanismes par lesquels cette compétition induit la mort cellulaire :

- Une délocalisation cellulaire de la phosphatase PTPN4 modifiant sa fonction.
- Une modification des propriétés de recrutement de partenaires de PTPN4 amenant à la formation de nouveaux complexes protéiques.
- Une régulation directe des propriétés catalytiques du domaine phosphatase situé à proximité du domaine PDZ.

Lors de la première partie de ma thèse, nous avions pour objectif de préciser le rôle du domaine PDZ dans la régulation de la fonction de PTPN4. Nous avons mis en évidence que le domaine PDZ a la capacité d'inhiber l'activité catalytique du domaine phosphatase de PTPN4. Cette inhibition intra-moléculaire peut être levée par la fixation d'un ligand au site de fixation du domaine PDZ. Cette étude représente la première description d'une régulation de l'activité catalytique d'une phosphatase par un domaine d'interaction PDZ.

Le domaine PDZ n'inhibe pas le domaine phosphatase en obstruant son site catalytique. Cette inhibition met donc en jeu un mécanisme de régulation à distance de l'activité catalytique du domaine PTP. Nous supposons que cette inhibition implique la régulation de la dynamique d'ouverture et de fermeture de la boucle catalytique WPD de la phosphatase. Cette boucle a en effet été décrite comme étant régulée de manière allostérique chez PTPN1. Dans l'état auto-inhibé, le supramodule PDZ-PTP de PTPN4 adopte en solution une conformation compacte, compatible avec une interaction inter-domaine. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence par RMN de surface d'interaction stable illustrant le caractère transitoire de l'association inter-domaine. Par ailleurs, la fonction d'interaction du domaine PDZ n'est quant à elle pas influencée par le domaine phosphatase. Son site de fixation reste compétent pour la reconnaissance de partenaires.

La fixation d'un PBM joue également un rôle régulateur sur la phosphatase en levant l'inhibition de son activité catalytique. Cette levée d'inhibition s'accompagne d'une modification importante de la dynamique du domaine PDZ, indiquant une dissociation des deux domaines. La communication entre les deux domaines est rompue et le domaine PDZ n'exerce plus d'inhibition sur le domaine phosphatase. Les propriétés catalytiques de la phosphatase sont alors restaurées.

Bien que les domaines se comportent alors comme des domaines apparemment dissociés, le supramodule conserve cependant une conformation compacte en solution. Le maintien de la proximité de ces deux domaines suggère une contrainte mécanique qui pourrait être due à la présence du linker. D'un point de vue général, les études de régulation inter-domaine incriminent de plus en plus les linkers qui peuvent soit jouer un rôle direct dans la régulation en interagissant avec les domaines, soit contraindre la dynamique inter-domaine *via* une contribution entropique. Nous avons ainsi observé que le linker du supramodule PDZ-PTP de PTPN4 est essentiel pour maintenir la régulation inter-domaine. Bien que celui-ci soit flexible et non structuré, il est partiellement protégé de la protéolyse, suggérant une interaction avec les domaines. Sa participation dans la régulation de l'activité catalytique de la phosphatase de PTPN4 reste donc à détailler, notamment celle qui intervient dans la dynamique inter-domaine modulée par la fixation du PBM.

La levée d'inhibition de l'activité catalytique de PTPN4 est strictement dépendante de la fixation d'un ligand au domaine PDZ et se fait ainsi à distance du site actif de la PTP. Il y a alors une propagation de la perturbation du site de fixation du domaine PDZ jusqu'au site actif de la PTP. Des changements de dynamique de certains domaines PDZ peuvent moduler leur propriété de fixation avec des partenaires ou encore influencer, après fixation d'un PBM, la conformation d'acides aminés éloignés du site d'interaction aux PBM. Ainsi, la fixation d'un PBM au domaine PDZ de PTPN4 pourrait modifier les propriétés thermodynamiques du domaine soit globalement, soit localement avec pour conséquence la déstabilisation de l'association des domaines PDZ et PTP. L'étude structurale du domaine PDZ de PTPN4 avec différentes séquences virales avait notamment mis à jour une perturbation générale du réseau de liaisons hydrogène de

feuillet β qui pourrait être un des mécanismes par lequel la fixation d'un PBM modifierait la dynamique du domaine PDZ et lèverait l'inhibition de l'activité catalytique.

La mise en jeu de régulation inter-domaine dépendante de la dynamique émerge de la littérature, notamment grâce à l'utilisation accrue, et souvent conjointe, de la RMN et du SAXS qui sont particulièrement appropriés à l'étude dynamique de protéines, y compris de masse moléculaire importante. De telles études sont actuellement en cours au laboratoire afin de décrire en détail les propriétés dynamiques et conformationelles du supramodule PDZ-PTP de PTPN4, avec et sans ligand du PDZ.

Le processus par lequel PTPN4 inhibe l'apoptose des cellules n'est pas connu et nous ignorons s'il implique l'activité catalytique du domaine phosphatase de PTPN4. Il est évident qu'il sera essentiel de poursuivre la caractérisation de ce processus, notamment pour définir le rôle que remplit l'activation de la phosphatase dans l'induction de la mort des cellules après fixation d'un ligand exogène. Une possibilité serait que la fixation d'un ligand exogène entraîne la déphosphorylation de partenaires recrutés indépendamment du domaine PDZ. La diminution de leur niveau de phosphorylation induirait alors la mort des cellules. D'après notre modèle initial, l'activité catalytique de PTPN4 pourrait également avoir comme fonction de déphosphoryler un ligand endogène recruté par le domaine PDZ de PTPN4. La compétition avec un ligand exogène du PDZ empêcherait la déphosphorylation du ligand endogène qui, sous sa forme phosphorylée, serait responsable du déclenchement d'une voie d'apoptose. L'identification de ce ligand endogène de PTPN4 s'avère ainsi déterminante pour connaître la voie d'apoptose commandée par cette phosphatase.

Nous avons identifié dans une deuxième partie de ma thèse la MAPK kinase p38γ comme un ligand potentiel de PTPN4. Cette kinase est un candidat pertinent en tant que partenaire de PTPN4 impliqué dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire. L'association de ces deux protéines est principalement due à l'interaction du PBM de p38γ par le domaine PDZ de PTPN4. L'affinité de l'ordre du micromolaire de cette interaction fait de p38γ le ligand cellulaire le plus affin de PTPN4 décrit à ce jour. Cette interaction est ainsi dépendante du PBM de cette kinase, ce qui assure une spécificité de PTPN4 pour cette isoforme qui est la seule des MAPK à posséder un motif d'interaction au domaine PDZ.

L'activité catalytique des MAPK dépend de la phosphorylation de leur boucle d'activation TGY. PTPN4 a la capacité de déphosphoryler la boucle d'activation de p38γ et pourrait *in vivo* réguler son activité. Cette régulation pourrait s'avérer être assez fine, d'autant que PTPN4 reconnaît la boucle TGY avec différentes affinités selon son degré de phosphorylation. Le site d'interaction de la phospho-thréonine de la boucle TGY avec le domaine phosphatase de PTPN4 n'est cependant pas connu. Les domaines tyrosine-phosphatases possèdent une deuxième poche de fixation au pTyr, située à proximité du site catalytique. Dans le cas de PTPN4 cette poche est fermée et présumée incompétente pour la fixation de pTyr. Il a néanmoins été proposé que ces secondes poches d'interaction pourraient interagir avec des pSer ou des pThr. Afin d'identifier le site d'interaction de PTPN4 pour la phospho-thréonine, des essais de cristallogenèse sont ainsi en cours au laboratoire afin d'obtenir des cristaux du domaine phosphatase isolé en interaction avec le peptide pTGpY.

Le recrutement de p38γ par son PBM et la déphosphorylation de sa boucle TGY représentent deux points d'ancrages potentiels pour la formation du complexe PTPN4/p38γ. La conformation compacte en solution de ce complexe observé par SAXS suggère que le recrutement par le PBM pourrait orienter la kinase p38γ de façon à présenter la boucle TGY au site actif de la phosphatase. L'interaction du motif PBM de p38γ avec le domaine PDZ présenterait alors la boucle TGY au site actif de la PTP en concomitance avec l'activation de ses propriétés catalytiques. L'étude enzymatique de la déphosphorylation par PTPN4 de p38γ sauvage ou tronquée de son PBM a débuté au laboratoire afin de révéler le rôle que tient le recrutement du PBM de p38γ dans l'efficacité de déphosphorylation de sa boucle TGY. Cette étude est également prévue par RMN qui s'avère particulièrement efficace pour suivre les ordres et les cinétiques de phosphorylation des protéines. Des essais de cristallogenèse ont par ailleurs débuté dans le but d'obtenir des cristaux du complexe du supramodule PDZ-PTP de PTPN4 avec la forme phosphorylée de p38γ. L'interaction des domaines PDZ et PTP avec p38γ pourrait diminuer leur dynamique inter-domaine, stabiliser leur conformation et permettre ainsi la genèse de cristaux. Au-delà de la description des interactions entre cette kinase et cette phosphatase, nous pouvons également espérer obtenir avec une

telle structure des détails moléculaires des interactions qui existent entre les domaines PDZ et PTP de PTPN4.

L'étude de l'implication du complexe p38γ/PTPN4 dans le contrôle de la mort cellulaire sera à l'avenir indispensable. Afin de mettre en évidence une interaction de PTPN4 avec p38γ *in vivo*, nos collaborateurs du laboratoire de Neuro-immunologie virale ont prévu des expériences de colocalisation cellulaire de ces deux protéines par microscopie confocale, en l'absence ou en la présence de ligands exogènes supposés rompre la formation de ce complexe.

Il est par ailleurs envisageable que PTPN4 soit phosphorylée par p38γ. Cette phosphorylation pourrait modifier le recrutement des partenaires ou encore l'activité catalytique de la phosphatase et constituer ainsi un autre mécanisme de régulation. Nous avons identifié deux sites consensus S/T-P de phosphorylation par les MAP kinases p38 au sein du domaine PTP de PTPN4, dont un au niveau de son site catalytique. La fonction anti-apoptotique de PTPN4 pourrait alors dépendre de sa phosphorylation. L'interaction de son domaine PDZ avec des ligands exogènes empêcherait la phosphorylation de PTPN4 qui, sous sa forme hypo-phosphorylée, ne pourrait plus remplir son rôle de protection des cellules, entraînant leur mort.

En conclusion, ces travaux permettent non seulement de mieux apprécier l'implication des domaines PDZ dans la régulation de la fonction des protéines en renforçant l'idée qu'au delà d'un "simple" rôle de recrutement de partenaires, ils participent également à la régulation de la fonction des domaines avec lesquels ils sont combinés, mais aussi d'élargir nos perspectives dans l'étude des phosphatases, dans la mesure où PTPN3 et PTPN13 possèdent aussi des domaines PDZ.

ANNEXES

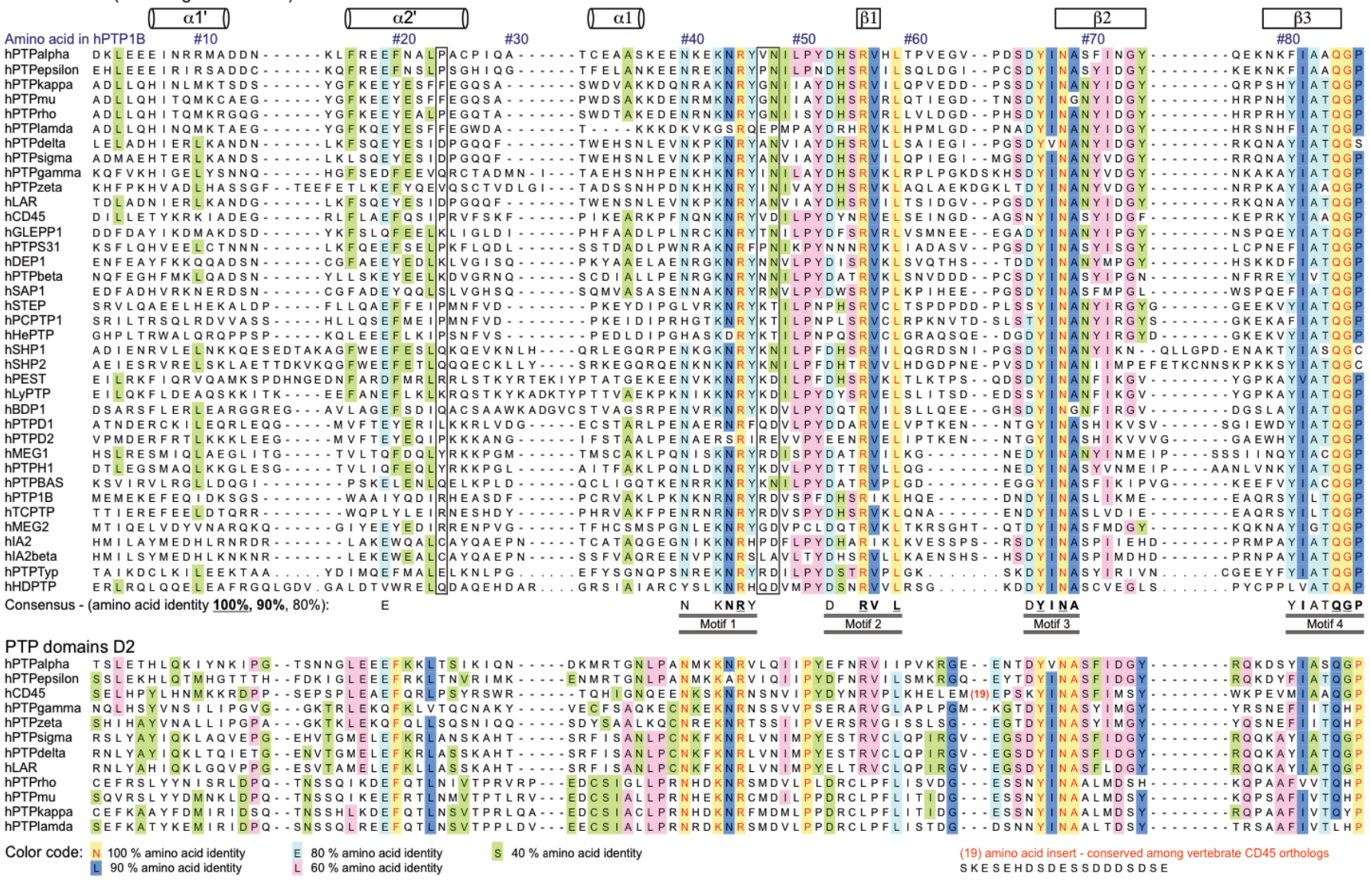
ANNEXE I - ALIGNEMENT DE SEQUENCES DES PTP CLASSIQUES HUMAINES

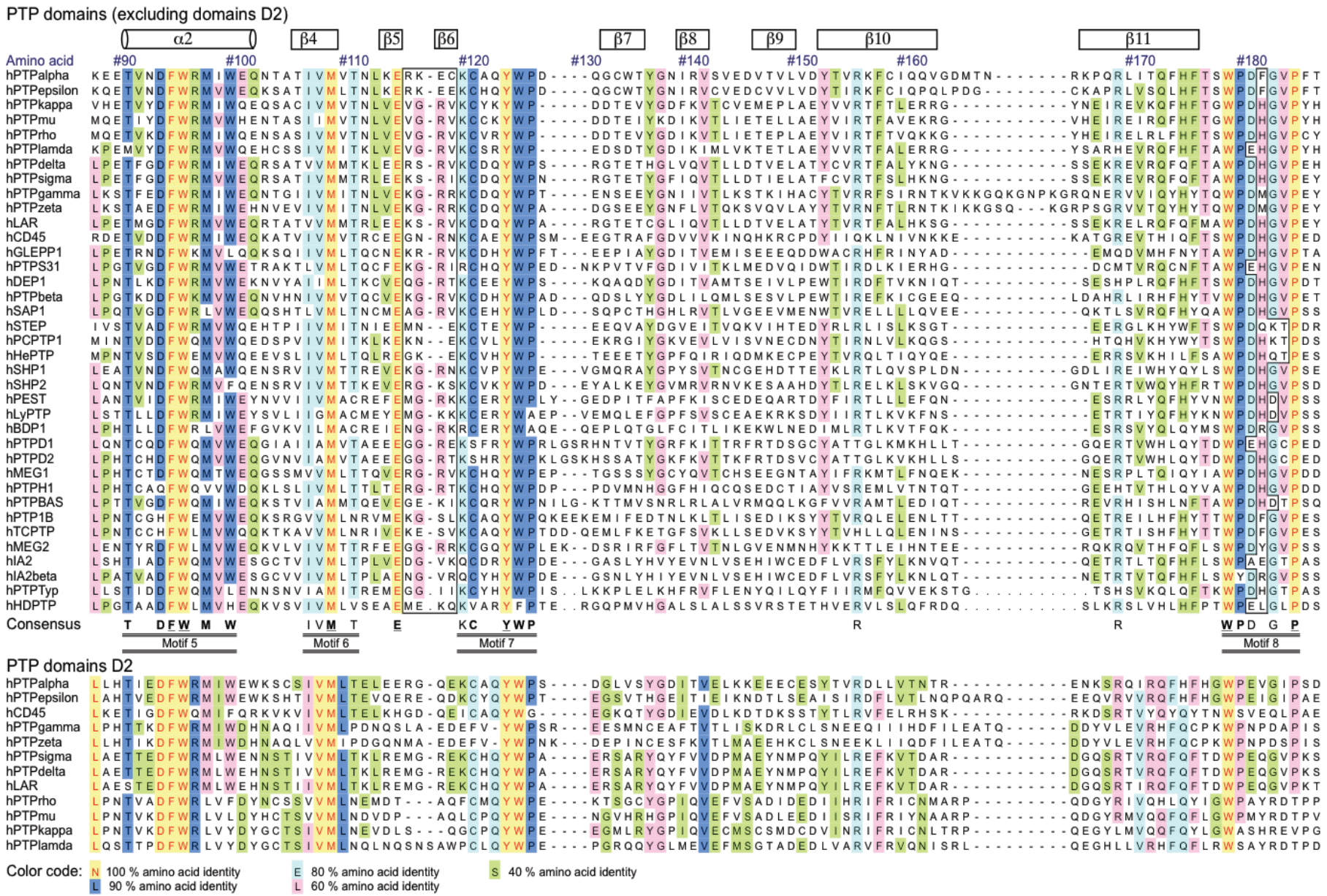
(Andersen et al., 2001) (168)
(Andersen et al., 2004) (373)

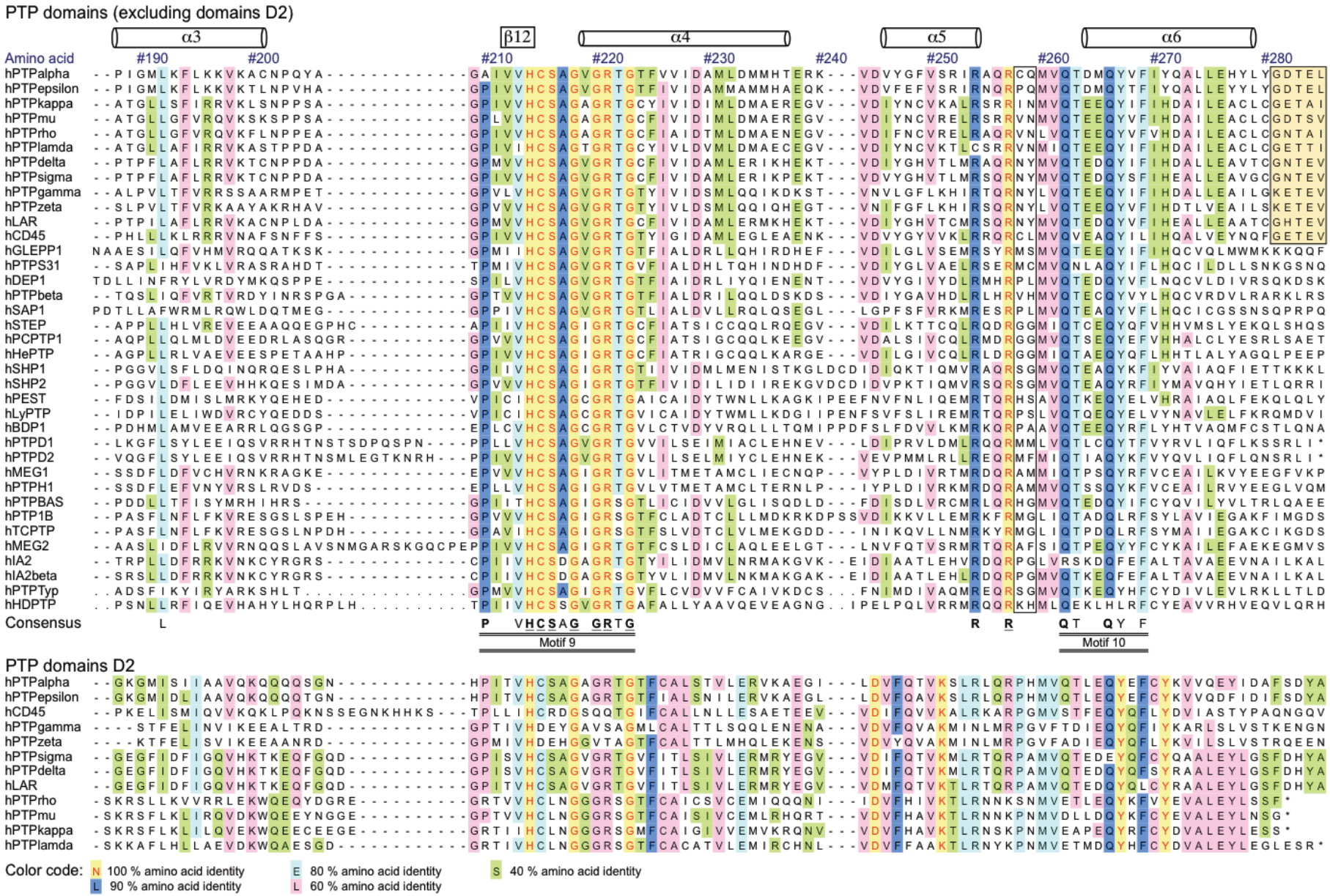
http://ptp.cshl.edu/

ou

http://science.novonordisk.com/ptp/

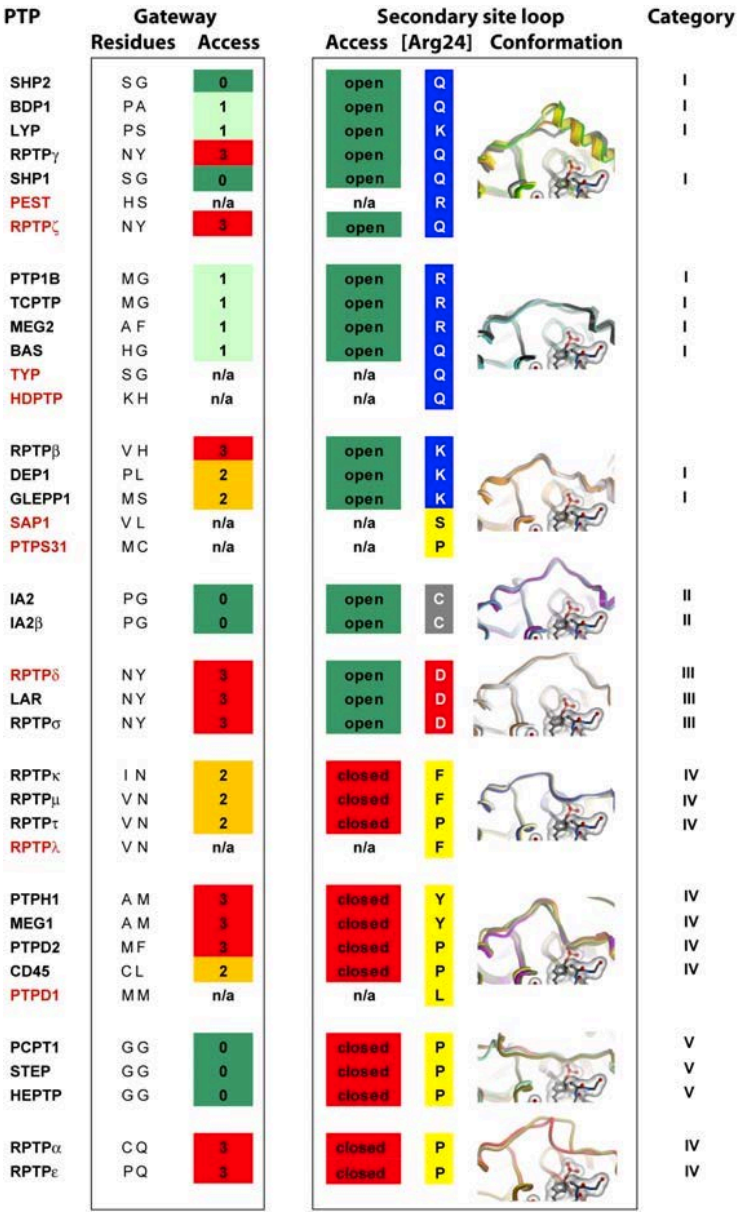

PTP domains (excluding domains D2)
α1'
α2'
α1
β1
β2
β3
Amino acid in hPTP1B
#10
#20
#30
#40
#50
#60
#70
#80
hPTPalpha
hPTPepsilon
hPTPkappa
hPTPmu
hPTPrho
hPTPlamda
hPTPdelta
hPTPsigma
hPTPgamma
hPTPzeta
hLAR
hCD45
hGLEPP1
hPTPS31
hDEP1
hPTPbeta
hSAP1
hSTEP
hPCPTP1
hHePTP
hSHP1
hSHP2
hPEST
hLyPTP
hBDP1
hPTPD1
hPTPD2
hMEG1
hPTPH1
hPTPBAS
hPTP1B
hTCPTP
hMEG2
hIA2
hIA2beta
hPTPTyp
hHDPTP
Consensus - (amino acid identity 100%, 90%, 80%):
N KNRY
D RV L
DYINA
YIATQGP
Motif 1
Motif 2
Motif 3
Motif 4
PTP domains D2
hPTPalpha
hPTPepsilon
hCD45
hPTPgamma
hPTPzeta
hPTPsigma
hPTPdelta
hLAR
hPTPrho
hPTPmu
hPTPkappa
hPTPlamda
Color code:
N 100 % amino acid identity
L 90 % amino acid identity
E 80 % amino acid identity
L 60 % amino acid identity
S 40 % amino acid identity
(19) amino acid insert - conserved among vertebrate CD45 orthologs
SKESEHDSDESSDDDSDSE


PTP domains (excluding domains D2)
α2
β4
β5
β6
β7
β8
β9
β10
β11
Amino acid
#90
#100
#110
#120
#130
#140
#150
#160
#170
#180
hPTPalpha
hPTPepsilon
hPTPkappa
hPTPmu
hPTPrho
hPTPlamda
hPTPdelta
hPTPsigma
hPTPgamma
hPTPzeta
hLAR
hCD45
hGLEPP1
hPTPS31
hDEP1
hPTPbeta
hSAP1
hSTEP
hPCPTP1
hHePTP
hSHP1
hSHP2
hPEST
hLyPTP
hBDP1
hPTPD1
hPTPD2
hMEG1
hPTPH1
hPTPBAS
hPTP1B
hTCPTP
hMEG2
hIA2
hIA2beta
hPTPTyp
hHDPTP
Consensus
Motif 5
Motif 6
Motif 7
Motif 8
PTP domains D2
hPTPalpha
hPTPepsilon
hCD45
hPTPgamma
hPTPzeta
hPTPsigma
hPTPdelta
hLAR
hPTPrho
hPTPmu
hPTPkappa
hPTPlamda
Color code:
100 % amino acid identity
90 % amino acid identity
80 % amino acid identity
60 % amino acid identity
40 % amino acid identity


PTP domains (excluding domains D2)
α3
β12
α4
α5
α6
Amino acid
#190
#200
#210
#220
#230
#240
#250
#260
#270
#280
hPTPalpha
hPTPepsilon
hPTPkappa
hPTPmu
hPTPrho
hPTPlamda
hPTPdelta
hPTPsigma
hPTPgamma
hPTPzeta
hLAR
hCD45
hGLEPP1
hPTPS31
hDEP1
hPTPbeta
hSAP1
hSTEP
hPCPTP1
hHePTP
hSHP1
hSHP2
hPEST
hLyPTP
hBDP1
hPTPD1
hPTPD2
hMEG1
hPTPH1
hPTPBAS
hPTP1B
hTCPTP
hMEG2
hIA2
hIA2beta
hPTPTyp
hHDPTP
Consensus
Motif 9
Motif 10
PTP domains D2
hPTPalpha
hPTPepsilon
hCD45
hPTPgamma
hPTPzeta
hPTPsigma
hPTPdelta
hLAR
hPTPrho
hPTPmu
hPTPkappa
hPTPlamda
Color code:
N 100 % amino acid identity
L 90 % amino acid identity
E 80 % amino acid identity
L 60 % amino acid identity
S 40 % amino acid identity

ANNEXE II - CLASSEMENT DES DEUXIEMES POCHE DE FIXATION AU PTYR DES PHOSPHATASES HUMAINES CLASSIQUES

(Barr et al., 2009) (167)



Classification de la seconde poche de fixation au pTyr des PTP.

Les PTP ont été classées en cinq catégories en fonction de l'accessibilité de leur seconde poche de fixation au pTyr par la région « passerelle », de la conformation de la boucle de la seconde poche de fixation au pTyr, et de la nature de l'acide aminé correspondant à l'arginine 24 chez PTPN1 (PTP1B). Sur la base d'un analyse structurale, l'accessibilité de la région « passerelle » a été noté de 0 à 3 (0=région accessible ; 3= région obstruée). L'analyse a été fait sur la base de structures cristallographique (nom de la phosphatase en noir) ou sur des modèles d'homologie (nom de la phosphatase en rouge).

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Nombre d'arrangements de domaines prédit par SMART au sein de quatre génomes eucaryotes. 17
Figure 02 : Domaines d'interaction impliqués dans la transduction du signal 20
Figure 03 : Les domaines PH et leurs sites de fixation canonique. 23
Figure 04 : Utilisation des domaines d'interactions pour construire une machinerie de signalisation complexe. 24
Figure 05 : Exemples de transferts de fonctionnalités entre protéines via la réutilisation de domaines en différentes combinaisons afin d'établir différentes connections entre des activités catalytiques et le ciblage de divers partenaires. 26
Figure 06 : Exemples de régulations allostériques de protéines modulaires. 32
Figure 07 : Reprogrammation de l'activation de N-WASP par combinaisons synthétiques de domaines pour contrôler l'activation de la polymérisation de l'actine. 34
Figure 08 : Classification des phosphatases 39
Figure 09 : Classification et spécificité de substrat des PTP. 40
Figure 10 : Arbre phylogénique des protéines tyrosine phosphatases classiques. 41
Figure 11 : Eléments structuraux clés des PTP 43
Figure 12 : Mécanisme catalytique des PTP. 46
Figure 13 : Conservation des résidus à la surface des phosphatases 47
Figure 14 : Diversité du potentiel électrostatique de surface de NRPTP. 48
Figure 15 : Structure de la phosphatase PTPN1 en complexe avec un peptide IRK biphosphorylé. 50
Figure 16 : Organisation modulaire de PTPN1 et ses modifications post-traductionnelles. 51
Figure 17 : Vue schématique de la composition de tous les membres de la famille PTP 52
Figure 18 : Mécanisme d'activation de la protéine PTPN11. 56
Figure 19 : Régulation allostérique de la protéine PTPN1 57
Figure 20 : Structure des domaines PDZ et leur interaction avec un PBM. 61
Figure 21 : Interaction des domaines PDZ avec un motif interne 67
Figure 22 : Dimérisation des domaines PDZ. 69
Figure 23 : Interaction des domaines PDZ avec des lipides 70
Figure 24 : Modifications post traductionnelles des PBM et des domaines PDZ qui modulent l'affinité des complexes PDZ/PBM. 73
Figure 25 : Transfert d'informations à travers la structure tridimensionnelle. 75
Figure 26 : Combinaisons en multiples copies de domaines dans les protéines humaines 78
Figure 27 : Exemples de protéines possédant un ou des domaines PDZ. 80
Figure 28 : Organisation en domaine des protéines MAGUK et structure du complexe ZO-1 PDZ3-SH3-GuK/peptide Cx4. 81
Figure 29 : Organisation en domaine de la protéine tyrosine-phosphatase PTPN4. 86
Figure 30 : Localisation des sites fonctionnels sur la séquence de PTPN4. 86
Figure 31 : Sensibilité des motifs PEST à la protéolyse. 87
Figure 32 : Phosphorylations identifiées de PTPN4 89
Figure 33 : Organisation structurale du domaine FERM. 91

Figure 34 : Localisation cellulaire de PTPN4 et PTPN3 dans des cellules Jurkat T..... 93
Figure 35 : Conservation d'un domaine FA en C-terminal de domaine FERM de différentes familles de protéines. 94
Figure 36 : Structures de PTPN4-PDZ en complexe avec Cyto13-att et GluN2A-16 96
Figure 37 : Modèle de la régulation et de l'induction de la DTL par GluD2..... 103
Figure 38 : Modèle de l'infection des cellules par les souches du virus de la Rage et leur phénotype associé. 106
Figure 39 : Modèle de l'infection des cellules par les souches du virus de la Rage et leur phénotype associé. 108
Figure 40 : Prédiction de structure secondaire du linker entre le PDZ et PTP de PTPN4. 158
Figure 41 : Analyse par protéolyse ménagée de PDZ-PTP de PTPN4 159
Figure 42 : Alignement de séquences du linker de PTPN4 de différentes espèces..... 160

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de protéines de signalisation régulées par des mécanismes d'auto-inhibition. 31
Tableau 2 : Occurrence de différents domaines dans le génome humain..... 60
Tableau 3 : Classification des domaines PDZ en fonction de leur spécificité d'interaction avec des PBM C-terminaux.. 63
Tableau 4 : Phosphorylations identifiées de PTPN4 89
Tableau 5 : Expression de PTP dans des organes lymphoïdes et cellules humaines. 98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	Angströms
Ac	Acétylation
Acyl-CoA	*Acyl-coenzyme A*
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Ank	Ankyrin repeats
AP	Activated Protein
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
Arp	Actine-related protein
ATP	Adénosine Tri-Phosphatae
AUC	Analytical UltraCentrifugation
BRO	Baculovirus BRO homology
C. *Elegans*	Caenorhabditis *elegans*
C-terminal	Carboxy terminal ou C-Ter
C1	Protein kinase C conserved region 1
C2	Protein kinase C conserved region 2
CA	Carbonic Anhydrase-like
CaMK	Calmodulin-Dependent Kinase
cAMP	cyclic Adenosine MonoPhosphate
cGMP	cyclic Guanosine MonoPhosphate
CH2	Cdc25 Homology region 2
Coil	Coiled-coil domain
CP	Corps pédonculé
CRAL/TRIO	Cellular retinaldehyde binding protein/trio homology (Sec14p homology)
CTD	Carboxy Terminal Domain
Cys	Cystéine
Da	Dalton
DD	Death Domain
DH	Dbl Homology
DHR	Disc large Homolgy Repeat
Dlg	Drosophila melanogaster Disc large protein
DLT	Depression à long terme
Dmax	Distance maximal
E. *coli*	*Escherichia coli*
ER	Endoplasmic reticulum
Eya	Eyes Absent
FA	FERM Adjacent domain
FABD	FAD Binding Domain
FERM	band Four.one/Ezrin/Radixin/Moesin homology
FHA	Forkhead-associated Domain
FN	Fibronectin-like
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster
FYVE	Fab1/Yotb/Vac1p/early endosomal antigen-1 homology
GB	Glycogen binding
GBD	GTPase binding domain
GK	Guanylate Kinase-like domain

GPC	Glycophorine C
GRIP1	Glutamate-Receptor-Interacting Protein
GST	Gluthationne S-Transferase
GTP	Guanisine Tri-Phosphate
GuK	Guanlylate Kinase
HAD	Haloacide déshalogénase
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Correlation*
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule 1
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IRK	Insulin Receptor Kinase
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITC	Isothermal titration calorimetric
JIP	JNK Interaction Proteins
JNK	Jun N-Terminal Kinase
k_{cat}	Constante catalytique
KH	hnRNP K Homology
KIM	Kinase Interaction Motif
KIND	Kinase N lobe-like domain
Km	Constante de Michaelis
L27	LIN2 & LIN7
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3
LP	Lipide Phosphatase
LSP	Lymphocytes du sang périphériques
Lys	Lysine
MAM	Meprin, A2, RPTPμ homology
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MD	Molecular Dynamics
mRC	mRNA Capping
MW	molecular Weight
N-Terminal	amine-terminus ou N-Ter
NADB	NAD-Binding domain
NBL	Novel band 4.1-like protein
NcK	Non-catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein
ND	N-terminal helicoïdal Domain
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cell
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
nNos	neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	Nitric oxide
NRPTP	Non receptore-like PTP (ou PTPN)
NUDT	NUDIX Phosphatase
PAK	p21-activated kinase
PBM	PDZ Binding Motif
PDB	Protein Data Bank
PDZ	PSD95 ; Dlg1 ; ZO1
pepN	N-terminal Peptidase- like
PEST	Proline (P), Glutamate (E) , Serine (S) , Thréonine (T)
PH	Pleckstrin Homology
PH-G	Pleckstrin Homology-“GRAM” domain

PI3P	phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate
PICK1	Protein Interacting with C-kinase 1
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLT	Potentiation à long terme
PM	Protéine phosphatase métal-dépendante
pNPP	para-nitrophénylphosphate
PPP	Phospho-protéine Phosphatase
Pro-rich	motif Riche en Prolines
Protéine G	Glycoprotéine
PSD	Post Synaptic Density
pSer	Sérine phosphorylée
PSP	Protein Serine/thréonine Phosphatase
PTB	PhosphoTyrosine-Binding domain
pThr	Thréonine phosphorylée
PTK	Protein Tyrosine Kinase
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
pTyr	Tyrosine phosphorylée
PUM	PUMilio homology domain
PX	phox Homology Domain
RA	RAS association domain
RABV	Rabies virus
RapGAP	Rap GTPase-activating protein
RDC	Residual Dipolar Coupling
Rg	Rayon de Gyration
RhoGEF	Rho- guanine exchange factor
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rmsd	root mean square deviation
ROS	Reactive Oxygen Species
RPTP	Receptor-like PTP
RRM	RNA recognition motif
S	Svedberg
SAB	Spectrin-Actin-Binding domain
SAP	Synapse-Associated Protein
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
Sec14	Sec14p homology (or CRAL/TRIO)
SH2	src Homology 2
SH3	src Homology 3
SH4	src Homology 4
Shank	SH3 and Ankyrin repeat-containing protein
SHP	SH2-containing phosphatase
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCR	T-cell receptor
TEV	*Tobacco Etch Virus*
TROSY	Transverse relaxation optimized spectroscopy
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WT	Wild Type
WW	deux tryptophanes (W) conservés

Yop	Yersinia outer protein
ZO-1	Zonula Occludens 1

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

1. Krauss G (2008) Biochemistry of signal transduction and regulation.
2. Cunningham BA, Gottlieb PD, Pflumm MN, & Edelman GM (1971) Immunoglobulin structure: divers ity, gene duplication, and domains. *Prog Immunology*:3-24.
3. Wetlaufer D (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc Nat. Acad Sci USA* 70:697-701.
4. Sadowski I, Stone J, & Pawson T (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol* 6:4396-4408.
5. Mayer BJ, Hamaguchi M, & Hanafusa H (1988) A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332:272-275.
6. Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G, & Baltimore D (1992) Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* 257:803-806.
7. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, & Baltimore D (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157-1161.
8. Bork P, Downing AK, Kieffer B, & Campbell ID (1996) Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Quart Reb Biophysics* 29:119-167.
9. Copley RR, Ponting CP, Schultz J, & Bork P (2002) Sequence analysis of multidomain proteins: past perspectives and future directions. *Adv. Protein Chem.* 61:75-98.
10. Bhattacharyya RP, Reményi A, Yeh BJ, & Lim Wa (2006) Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem* 75:655-680.
11. Venter JC*, et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
12. Lander ES*, et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
13. Hegyi H & Bork P (1997) On the classification and evolution of protein modules. *J Prot Chem* 16:545-551.
14. Pawson T (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* 373:573-580.
15. Pawson T & Scott JD (1997) Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. *Science* 278:2075-2080.
16. Sicheri F, Moarefi I, & Kuriyan J (1997) Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385:602-609.
17. Pawson T & Nash P (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Gene Development* 14:1027-1047.
18. Pawson T (2003) Organization of cell-regulatory systems through modular-protein-interaction domains. *Philos T R Soc A* 361:1251-1262.
19. Pawson T & Nash P (2003) Assembly of Cell Regulatory Systems Through protein interaction domains. *Science* 300:445-452.
20. Pawson T (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116:191-203.
21. Scott JDJD & Pawson T (2009) Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* 326:1220-1224.
22. Kuriyan J (1993) Modular protein structures. *Curr Sci* 64:85-95.
23. Kuriyan J & Eisenberg D (2007) The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature* 450:983-990.
24. Soroka J*, et al.* (2012) Conformational switching of the molecular chaperone Hsp90 via regulated phosphorylation. *Mol Cell* 45:517-528.
25. Mayer BJ (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Science* 114:1253-1263.
26. Zarrinpar a & Lim Wa (2000) Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol* 7:611-613.
27. Doyle Da*, et al.* (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85:1067-1076.

28. Yaffe MB & Elia AE (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol* 13:131-138.
29. Yaffe MB (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:177-186.
30. Jenuwein T & Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
31. Owen DJ, *et al.* (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* 19:6141-6149.
32. Bannister AJ, *et al.* (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410:120-124.
33. Min J-H, *et al.* (2002) Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296:1886-1889.
34. Strasser A, O'Connor L, & Dixit V (2000) Apoptosis Signaling. *Annu Rev Biochem* 69:217-245.
35. Chishti AH, *et al.* (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends in Biochem Sci* 23:281-282.
36. Cullen PJ, Cozier GE, Banting G, & Mellor H (2001) Modular phosphoinositide-binding domains--their role in signalling and membrane trafficking. *Curr Biol* 11:R882-893.
37. Valverde R, Edwards L, & Regan L (2008) Structure and function of KH domains. *FEBS J* 275:2712-2726.
38. Wang X, McLachlan J, Zamore PD, & Hall TMT (2002) Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* 110:501-512.
39. Wahl MC, Will CL, & Lührmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701-718.
40. Mackereth CD, *et al.* (2011) Multi-domain conformational selection underlies pre-mRNA splicing regulation by U2AF. *Nature* 475:408-411.
41. Vogel C, Bashton M, Kerrison ND, Chothia C, & Teichmann Sa (2004) Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr opin Struct Biol* 14:208-216.
42. Liu Ba, Engelmann BW, & Nash PD (2012) High-throughput analysis of peptide-binding modules. *Proteomics* 12:1527-1546.
43. Tinti M, *et al.* (2013) The SH2 domain interaction landscape. *Cell rep* 3:1293-1305.
44. Chen HI, *et al.* (1997) Characterization of the WW domain of human yes-associated protein and its polyproline-containing ligands. *J Biol Chem* 272:17070-17077.
45. Macias MJ, Wiesner S, & Sudol M (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS L* 513:30-37.
46. Otte L, *et al.* (2003) WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein science* 12:491-500.
47. Sudol M & Hunter T (2000) NeW wrinkles for an old domain. *Cell* 103:1001-1004.
48. Tonikian R, *et al.* (2009) Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS biol* 7:e1000218.
49. Uhlik MT, *et al.* (2005) Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol* 345:1-20.
50. Luck K, Charbonnier S, & Travé G (2012) The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS L* 586:2648-2661.
51. Gfeller D, *et al.* (2011) The multiple-specificity landscape of modular peptide recognition domains. *Mol Sys biol* 7:484.
52. Carducci M, *et al.* (2012) The protein interaction network mediated by human SH3 domains. *Biotechnol adv* 30:4-15.
53. Stiffler M, Chen J, Grantcharova V, & Lei Y (2007) PDZ Domain Binding Selectivity Is Optimized Across the Mouse Proteome. *Science* 364.
54. Gibson TJ (2009) Cell regulation: determined to signal discrete cooperation. *Trends in Biochem Sci* 34:471-482.
55. Macias MJ, *et al.* (1996) Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 382:646-649.

56. Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, & Lu KP (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283:1325-1328.
57. Berry DM, Nash P, Liu SK-W, Pawson T, & McGlade CJ (2002) A high-affinity Arg-X-X-Lys SH3 binding motif confers specificity for the interaction between Gads and SLP-76 in T cell signaling. *Curr Biol* 12:1336-1341.
58. Donaldson LW, Gish G, Pawson T, Kay LE, & Forman-Kay JD (2002) Structure of a regulatory complex involving the Abl SH3 domain, the Crk SH2 domain, and a Crk-derived phosphopeptide. *Proc Nat. Acad Sci USA* 99:14053-14058.
59. Li SC, *et al.* (1999) Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A. *Curr Biol* 9:1355-1362.
60. Scheffzek K & Welti S (2012) Pleckstrin homology (PH) like domains - versatile modules in protein-protein interaction platforms. *FEBS L* 586:2662-2673.
61. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, & Wrana JL (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95:779-791.
62. Davey NE, Travé G, & Gibson TJ (2011) How viruses hijack cell regulation. *Trends in Biochem Sci* 36:159-169.
63. Fuxreiter M, Tompa P, & Simon I (2007) Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics* 23:950-956.
64. Neduva V, *et al.* (2005) Systematic discovery of new recognition peptides mediating protein interaction networks. *PLoS biol* 3:e405.
65. Diella F, *et al.* (2008) Understanding eukaryotic linear motif and their role in cell signaling and regulation. *Front Biosci*:6580-6603.
66. Martinon F, Burns K, & Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10:417-426.
67. Willems AR, *et al.* (1999) SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Philos T R Soc B* 354:1533-1550.
68. Scaplehorn N, *et al.* (2002) Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol* 12:740-745.
69. Finn RD, *et al.* (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34:D247-251.
70. Letunic I, *et al.* (2006) SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* 34:D257-260.
71. Jensen LJ, Jensen TS, de Lichtenberg U, Brunak S, & Bork P (2006) Co-evolution of transcriptional and post-translational cell-cycle regulation. *Nature* 443:594-597.
72. Neduva V & Russell RB (2005) Linear motifs: evolutionary interaction switches. *FEBS L* 579:3342-3345.
73. Peisajovich SG, Garbarino JE, Wei P, & Lim Wa (2010) Rapid diversification of cell signaling phenotypes by modular domain recombination. *Science* 328:368-372.
74. Kholodenko BN (2006) Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:165-176.
75. Tzlil S & Kuruvilla R (2011) Signalling in space and time: systems dynamics of intracellular communication. *EMBO rep* 12:877-879.
76. Stradal TEB, *et al.* (2004) Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 14:303-311.
77. Lei M, *et al.* (2000) Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 102:387-397.
78. Williams JC, *et al.* (1997) The 2.35 A crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J Mol Biol* 274:757-775.
79. Xu W, Harrison SC, & Eck MJ (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385:595-602.
80. Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, & Lucas DM (2000) Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Gene Development* 14:505-520.
81. Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, & Okamura Y (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435:1239-1243.

82. Sands Z, Grottesi A, & Sansom MSP (2005) Voltage-gated ion channels. *Curr Biol* 15:R44-47.
83. Good MC, Zalatan JG, & Lim Wa (2011) Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 332:680-686.
84. Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, & Davis RJ (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281:1671-1674.
85. Hynes N, Ingham P, & Lim W (2013) Signalling change: signal transduction through the decades. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 14:393-398.
86. Bashton M & Chothia C (2007) The generation of new protein functions by the combination of domains. *Structure* 15:85-99.
87. Pawson T & Warner N (2007) Oncogenic re-wiring of cellular signaling pathways. *Oncogene* 26:1268-1275.
88. Maher Ca*, et al.* (2009) Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 458:97-101.
89. Dueber J, Yeh B, Chak K, & Lim W (2003) Reprogramming control of an allosteric signaling switch through modular recombination. *Science* 301:1904-1908.
90. Howard PL, Chia MC, Del Rizzo S, Liu F-F, & Pawson T (2003) Redirecting tyrosine kinase signaling to an apoptotic caspase pathway through chimeric adaptor proteins. *Proc Nat. Acad Sci USA* 100:11267-11272.
91. Yeh BJ, Rutigliano RJ, Deb A, Bar-Sagi D, & Lim WA (2007) Rewiring cellular morphology pathways with synthetic guanine nucleotide exchange factors. *Nature* 447:596-600.
92. Dueber JE, Yeh BJ, Bhattacharyya RP, & Lim Wa (2004) Rewiring cell signaling: the logic and plasticity of eukaryotic protein circuitry. *Curr opin Struct Biol* 14:690-699.
93. Bashor CJ, Helman NC, Yan S, & Lim WA (2008) Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics. *Science* 319:1539-1543.
94. Park S-H, Zarrinpar A, & Lim WA (2003) Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* 299:1061-1064.
95. Elde NC & Malik HS (2009) The evolutionary conundrum of pathogen mimicry. *Nat Rev Microbiol* 7:787-797.
96. Alto NM & Orth K (2012) Subversion of cell signaling by pathogens. *CSH Perspect Biol* 4:a006114.
97. Javier RT & Rice AP (2011) Emerging Theme: Cellular PDZ Proteins as Common Targets of Pathogenic Viruses. *J Virol* 85:11544-11556.
98. Préhaud C*, et al.* (2010) Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Science Sign* 3:1-10.
99. Gruenheid S*, et al.* (2001) Enteropathogenic E. coli Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* 3:856-859.
100. Selyunin AS*, et al.* (2011) The assembly of a GTPase-kinase signalling complex by a bacterial catalytic scaffold. *Nature* 469:107-111.
101. Guan KL, Haun RS, Watson SJ, Geahlen RL, & Dixon JE (1990) Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Nat. Acad Sci USA* 87:1501-1505.
102. Viboud GI & Bliska JB (2005) Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 59:69-89.
103. Lim W (2002) The modular logic of signaling proteins : building allosteric switches from simple binding domains. *Curr opin Struct Biol* 12:61-68.
104. Pufall Ma & Graves BJ (2002) Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Bi* 18:421-462.
105. Nagar B*, et al.* (2003) Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112:859-871.
106. Hantschel O*, et al.* (2003) A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* 112:845-857.
107. Burgess AW*, et al.* (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12:541-552.

108. Ferguson KM, *et al.* (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11:507-517.
109. Hof P, Pluskey S, Dhe-paganon S, Eck MJ, & Shoelson SE (1998) Crystal Structure of the Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Cell* 92:441-450.
110. Kobe B, *et al.* (1996) Giant protein kinases: domain interactions and structural basis of autoregulation. *EMBO J* 15:6810-6821.
111. Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, & Rittinger K (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113:343-355.
112. Aghazadeh B, Lowry WE, Huang XY, & Rosen MK (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* 102:625-633.
113. Rohatgi R, *et al.* (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97:221-231.
114. Prehoda KE, Scott JA, Mullins RD, & Lim WA (2000) Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 290:801-806.
115. Cory GOC, Garg R, Cramer R, & Ridley AJ (2002) Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem* 277:45115-45121.
116. Badour K, *et al.* (2004) Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation. *J experiment med* 199:99-112.
117. Torres E & Rosen MK (2003) Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell* 11:1215-1227.
118. Tartaglia M, *et al.* (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat genet* 29:465-468.
119. Tartaglia M, *et al.* (2003) Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat genet* 34:148-150.
120. Tartaglia M & Gelb BD (2005) Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Geno Gene* 6:45-68.
121. Devriendt K, *et al.* (2001) Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat genet* 27:313-317.
122. Roskoski R (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biop Res Co* 324:1155-1164.
123. Hunter T (1980) Protein phosphorylated by the RSV transforming function. *Cell* 22:647-648.
124. Levene PA & Alsberg CL (1906) THE CLEAVAGE PRODUCTS OF VITELLIN. *J Biol Chem* 2:127-133.
125. Lipmann FA & Levene PA (1932) SERINEPHOSPHORIC ACID OBTAINED ON HYDROLYSIS OF VITELLINIC ACID. *J Biol Chem* 98:109-114.
126. Burnett G & Kennedy EP (1954) THE ENZYMATIC PHOSPHORYLATION OF PROTEINS. *J Biol Chem* 211:969-980.
127. Fischer EH & Krebs EG (1955) CONVERSION OF PHOSPHORYLASE b TO PHOSPHORYLASE a IN MUSCLE EXTRACTS. *Journal of biochemistry* 216:121-132.
128. Krebs EG (1992) Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Nobel, Lect*:72-89.
129. Fischer EH (1992) Protein phosphorylation and cellular regulation II. *Nobel, Lect*:95-113.
130. Cohen P (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4:E127-130.
131. Olsen JV, *et al.* (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127:635-648.
132. Hunter T (2009) Tyrosine phosphorylation : thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* 21:140-146.
133. Pincus D, Letunic I, Bork P, & Lim Wa (2008) Evolution of the phospho-tyrosine signaling machinery in premetazoan lineages. *Proc Nat. Acad Sci USA* 105:9680-9684.

134. Tan CSH, *et al.* (2009) Positive selection of tyrosine loss in metazoan evolution. *Science* 325:1686-1688.
135. King N, Hittinger CT, & Carroll SB (2003) Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301:361-363.
136. Manning G, Young SL, Miller WT, & Zhai Y (2008) The protist, Monosiga brevicollis, has a tyrosine kinase signaling network more elaborate and diverse than found in any known metazoan. *Proc Nat. Acad Sci USA* 105:9674-9679.
137. Grangeasse C, *et al.* (1997) Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene* 204:259-265.
138. Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, & Mijakovic I (2007) Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends in Biochem Sci* 32:86-94.
139. Grangeasse C, Nessler S, & Mijakovic I (2012) Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philos T R Soc B* 367:2640-2655.
140. Errede B, Gartner A, Zhou Z, Nasmyth K, & Ammerer G (1993) MAP kinase-related FUS3 from S. cerevisiae is activated by STE7 in vitro. *Nature* 362:261-264.
141. Schieven G, Thorner J, & Martin GS (1986) Protein-tyrosine kinase activity in Saccharomyces cerevisiae. *Science* 231:390-393.
142. Zhan XL, Deschenes RJ, & Guan KL (1997) Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in Saccharomyces cerevisiae. *Gene Development* 11:1690-1702.
143. Liu Ba, *et al.* (2011) The SH2 domain-containing proteins in 21 species establish the provenance and scope of phosphotyrosine signaling in eukaryotes. *Science Sign* 4:ra83.
144. King N, *et al.* (2008) The genome of the choanoflagellate Monosiga brevicollis and the origin of metazoans. *Nature* 451:783-788.
145. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, & Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
146. Sacco F, Perfetto L, Castagnoli L, & Cesareni G (2012) The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS L* 586:2732-2739.
147. Tonks NK (2013) Protein tyrosine phosphatases-from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J* 280:346-378.
148. Shi Y (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139:468-484.
149. Alonso A, *et al.* (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117:699-711.
150. Seifried A, Schultz J, & Gohla A (2013) Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS J* 280:549-571.
151. Wishart MJ & Dixon JE (2002) The archetype STYX/dead-phosphatase complexes with a spermatid mRNA-binding protein and is essential for normal sperm production. *Proc Nat. Acad Sci USA* 99:2112-2117.
152. Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P, Biochimiche S, & Morgagni V (2002) Cellular and Molecular Life Sciences Low molecular weight protein tyrosine phosphatases : small , but smart. *Cell Mol Sci* 59:941-949.
153. Bennett MS, Guan Z, Laurberg M, & Su XD (2001) Bacillus subtilis arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Proc Nat. Acad Sci USA* 98:13577-13582.
154. Alho I, Costa L, Bicho M, & Coelho C (2013) The role of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP ACP1) in oncogenesis. *Tumour biology* 34:1979-1989.
155. Bordo D & Bork P (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. *EMBO rep* 3:741-746.
156. Fauman EB, *et al.* (1998) Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* 93:617-625.
157. Strausfeld U, *et al.* (1991) Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 351:242-245.

158. Honda R, Ohba Y, Nagata A, Okayama H, & Yasuda H (1993) Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase. *FEBS L* 318:331-334.
159. Shen T & Huang S (2012) The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anti-Cancer Agent Me* 12:631-639.
160. Burroughs aM, Allen KN, Dunaway-Mariano D, & Aravind L (2006) Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *J Mol Biol* 361:1003-1034.
161. Tootle TL, *et al.* (2003) The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 426:299-302.
162. Rayapureddi JP, *et al.* (2003) Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* 426:295-298.
163. Xu PX, *et al.* (1999) Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat genet* 23:113-117.
164. Xu P-X, *et al.* (2003) Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney. *Development (Cambridge, England)* 130:3085-3094.
165. Barford D, Flint A, & Tonks N (1994) Crystal Structure of Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Science* 263:1397-1404.
166. Jia Z, Barford D, Flint aJ, & Tonks NK (1995) Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* 268:1754-1758.
167. Barr AJ, *et al.* (2009) Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. *Cell* 136:352-363.
168. Andersen JN, *et al.* (2001) Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains. *Mol Cell Biol* 21:7117-7136.
169. Charbonneau H, *et al.* (1989) Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc Nat. Acad Sci USA* 86:5252-5256.
170. Stuckey JA, *et al.* (1994) Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 A and the complex with tungstate. *Nature* 370:571-575.
171. Denu JM & Dixon JE (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr opin Chem Biol* 2:633-641.
172. Zhang ZY, Wang Y, & Dixon JE (1994) Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc Nat. Acad Sci USA* 91:1624-1627.
173. Guan KL & Dixon JE (1991) Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J Biol Chem* 266:17026-17030.
174. Pannifer aDB (1998) Visualization of the Cysteinyl-phosphate Intermediate of a Protein-tyrosine Phosphatase by X-ray Crystallography. *J Biol Chem* 273:10454-10462.
175. Whittier SK, Hengge AC, & Loria JP (2013) Conformational motions regulate phosphoryl transfer in related protein tyrosine phosphatases. *Science* 341:899-903.
176. Zhang ZY, Maclean D, McNamara DJ, Sawyer TK, & Dixon JE (1994) Protein tyrosine phosphatase substrate specificity: size and phosphotyrosine positioning requirements in peptide substrates. *Biochemistry* 33:2285-2290.
177. Puius Ya, *et al.* (1997) Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: a paradigm for inhibitor design. *Proc Nat. Acad Sci USA* 94:13420-13425.
178. Salmeen a, Andersen JN, Myers MP, Tonks NK, & Barford D (2000) Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell* 6:1401-1412.
179. Peters GH, *et al.* (2000) Residue 259 is a key determinant of substrate specificity of protein-tyrosine phosphatases 1B and alpha. *J Biol Chem* 275:18201-18209.
180. Yu X, *et al.* (2007) Structure, inhibitor, and regulatory mechanism of Lyp, a lymphoid-specific tyrosine phosphatase implicated in autoimmune diseases. *Proc Nat. Acad Sci USA* 104:19767-19772.

181. Dadke S*, et al.* (2007) Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat Cell Biol* 9:80-85.
182. Flint aJ, Gebbink MF, Franza BR, Hill DE, & Tonks NK (1993) Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *EMBO J* 12:1937-1946.
183. Frangioni JV, Oda a, Smith M, Salzman EW, & Neel BG (1993) Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J* 12:4843-4856.
184. Yip S-C, Saha S, & Chernoff J (2010) PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends in Biochem Sci* 35:442-449.
185. Cool DE*, et al.* (1989) cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proc Nat. Acad Sci USA* 86:5257-5261.
186. Chernoff J, Schievella AR, Jost CA, Erikson RL, & Neel BG (1990) Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Nat. Acad Sci USA* 87:2735-2739.
187. Brown-Shimer S*, et al.* (1990) Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. *Proc Nat. Acad Sci USA* 87:5148-5152.
188. Tiganis T (2013) PTP1B and TCPTP--nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis. *FEBS J* 280:445-458.
189. Frangioni J, Beahm P, Shifrin V, Jost C, & Neel B (1992) The Nontransmembrane Tyrosine Phosphatase PTP-1B Localizes to the Endoplasmic Reticulum via Its 35 Amino Acid C-Terminal Sequence PTP-1 B. *Cell* 68:545-560.
190. Boute N, Boubekeur S, Lacasa D, & Issad T (2003) Dynamics of the interaction between the insulin receptor and protein tyrosine-phosphatase 1B in living cells. *EMBO rep* 4:313-319.
191. Anderie I, Schulz I, & Schmid A (2007) Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets. *Cell signal* 19:582-592.
192. Stuible M & Tremblay ML (2010) In control at the ER: PTP1B and the down-regulation of RTKs by dephosphorylation and endocytosis. *Trends iCell Biol* 20:672-679.
193. Gjörloff-Wingren A*, et al.* (2000) Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells. *Eur J Immunol* 30:2412-2421.
194. Saito K, Williams S, Bulankina A, Höning S, & Mustelin T (2007) Association of protein-tyrosine phosphatase MEG2 via its Sec14p homology domain with vesicle-trafficking proteins. *J Biol Chem* 282:15170-15178.
195. Saito K, Tautz L, & Mustelin T (2007) The lipid-binding SEC14 domain. *Biochem biophys acta* 1771:719-726.
196. Kim J*, et al.* (2005) Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev cell* 8:937-947.
197. Doyotte A, Mironov A, McKenzie E, & Woodman P (2008) The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc Nat. Acad Sci USA* 105:6308-6313.
198. Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, & Lim WA (2003) The structure and function of proline recognition domains. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 179.
199. Garton A, Burnham M, Bouton A, & Tonks N (1997) Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130CAS; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition. *Oncogene* 15:877-885.
200. Zanke B*, et al.* (1992) Cloning and expression of an inducible lymphoid-specific, protein tyrosine phosphatase (HePTPase). *Eur J Immunol* 22:235-239.
201. Lombroso PJ, Murdoch G, & Lerner M (1991) Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum. *Proc Nat. Acad Sci USA* 88:7242-7246.
202. Francis DM*, et al.* (2011) Resting and active states of the ERK2:HePTP complex. *J Am Chem Soc* 133:17138-17141.
203. Kazlauskas A, Feng GS, Pawson T, & Valius M (1993) The 64-kDa protein that associates with the platelet-derived growth factor receptor beta subunit via Tyr-1009 is the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *Proc Nat. Acad Sci USA* 90:6939-6943.

204. Tonks NK & Neel BG (2001) Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*:182-195.
205. S. Erdmann K (2003) The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/Basophil-like Interacting proteins and molecular functions. *Eur J Biochem* 270:4789-4798.
206. Zheng Y, Schlondorff J, & Blobel CP (2002) Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J Biol Chem* 277:42463-42470.
207. Hironaka K, Umemori H, Tezuka T, Mishina M, & Yamamoto T (2000) The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor delta 2 and epsilon subunits. *J Biol Chem* 275:16167-16173.
208. Pluskey S, Wandless T, Walsh CT, & Shoelson SE (1995) Potent stimulation of SH-PTP2 Phosphatase Activity by Simultaneous Occupancy of Both SH2 Domains. *J Biol Chem* 270:2897-2900.
209. Lechleider RJ, *et al.* (1993) Activation of the SH2-containing Phosphotyrosine Phosphatase SH-PTP2 by Its Binding Site, Phosphotyrosine 1009, on the Human Platelet-derived Growth Factor Receptor b. *J Biol Chem* 268:21478-21481.
210. Sugimoto S, Wandless TJ, Shoelson SE, Neel BG, & Walsh CT (1994) Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 269:13614-13622.
211. Wang W, *et al.* (2011) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation. *J Cell Biochem* 112:2062-2071.
212. Kosaki K, *et al.* (2002) PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *J Clinic Endo Metabo* 87:3529-3533.
213. O'Reilly AM, Pluskey S, Shoelson SE, & Neel BG (2000) Activated mutants of SHP-2 preferentially induce elongation of Xenopus animal caps. *Mol Cell Biol* 20:299-311.
214. Ogata T & Yoshida R (2005) PTPN11 mutations and genotype-phenotype correlations in Noonan and LEOPARD syndromes. *Pedia endocrinol rev* 2:669-674.
215. Neel BG, Gu H, & Pao L (2003) The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends in Biochem Sci* 28:284-293.
216. Keilhack H, David FS, McGregor M, Cantley LC, & Neel BG (2005) Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J Biol Chem* 280:30984-30993.
217. Yu Z-H, *et al.* (2013) Structural and mechanistic insights into LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutations. *J Biol Chem* 288:10472-10482.
218. Wiesmann C, *et al.* (2004) Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat Struct Mol Biol* 11:730-737.
219. Olmez EO & Alakent B (2011) Alpha7 helix plays an important role in the conformational stability of PTP1B. *J Biomol struct dynam* 28:675-693.
220. Villa F, Deak M, Bloomberg GB, Alessi DR, & van Aalten DMF (2005) Crystal structure of the PTPL1/FAP-1 human tyrosine phosphatase mutated in colorectal cancer: evidence for a second phosphotyrosine substrate recognition pocket. *J Biol Chem* 280:8180-8187.
221. Tabernero L, Aricescu aR, Jones EY, & Szedlacsek SE (2008) Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *FEBS J* 275:867-882.
222. Blaskovich MAT (2009) Drug discovery and protein tyrosine phosphatases. *Curr med chem* 16:2095-2176.
223. Tonks NK (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:833-846.
224. Wang Z, *et al.* (2004) Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* 304:1164-1166.
225. Bottini N, *et al.* (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat genet* 36:337-338.

226. Smyth D*, et al.* (2004) Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 53:3020-3023.
227. Begovich AB*, et al.* (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Gent* 75:330-337.
228. Carlton VEH*, et al.* (2005) PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Gent* 77:567-581.
229. Cho KO, Hunt Ca, & Kennedy MB (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9:929-942.
230. Bryant PJ, Watson KL, Justice RW, & Woods DF (1993) Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interactions and signal transduction in Drosophila. *Development*:239-249.
231. Kennedy M (1995) Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends in Biochem Sci*:91125.
232. Woods DF & Bryant PJ (1993) ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mech develop* 44:85-89.
233. Willott E*, et al.* (1993) The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Nat. Acad Sci USA* 90:7834-7838.
234. Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, & Bork P (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic acids research* 28:231-234.
235. Schultz J*, et al.* (1998) Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol* 5:19-24.
236. Pallen M & Ponting C (1997) PDZ domains in bacterial proteins. *Mol microbiol* 26:411-415.
237. Ponting CP (1997) Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein science* 6:464-468.
238. Harris BZ & Lim Wa (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci.* 114:3219-3231.
239. te Velthuis AJW, Sakalis Pa, Fowler Da, & Bagowski CP (2011) Genome-wide analysis of PDZ domain binding reveals inherent functional overlap within the PDZ interaction network. *Plos One* 6:e16047.
240. Wang CK, Pan L, Chen J, & Zhang M (2010) Extensions of PDZ domains as important structural and functional elements. *Protein & cell* 1:737-751.
241. Bilder D (2001) PDZ proteins and polarity: functions from the fly. *Trends Genet* 17:511-519.
242. Baumgartner M, Radziwill G, Lorger M, Weiss A, & Moelling K (2008) c-Src-mediated epithelial cell migration and invasion regulated by PDZ binding site. *Mol Cell Biol* 28:642-655.
243. Roh MH & Margolis B (2003) Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *AM J PHYSIOL-RENAL* 285:F377-387.
244. Feng W & Zhang M (2009) Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* 10:87-99.
245. Reiners J, Nagel-Wolfrum K, Jürgens K, Märker T, & Wolfrum U (2006) Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Exp Eye Res* 83:97-119.
246. Shi M*, et al.* (2013) β2-AR-induced Her2 transactivation mediated by Erbin confers protection from apoptosis in cardiomyocytes. *Int J Cardiol* 167:1570-1577.
247. Sanchez R & Zhou M (2009) The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr opin drug discov Dev* 12:659-665.
248. Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, & Eck MJ (2010) The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:802-814.
249. Liu Ba*, et al.* (2006) The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Mol Cell* 22:851-868.

250. Kärkkäinen S, *et al.* (2006) Identification of preferred protein interactions by phage-display of the human Src homology-3 proteome. *EMBO rep* 7:186-191.
251. Hu H, *et al.* (2004) A map of WW domain family interactions. *Proteomics* 4:643-655.
252. Lee H-J & Zheng JJ (2010) PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun. Signa.* 8.
253. Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, & Sheng M (1995) Clustering of Shaker-type K+ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378:85-88.
254. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, & Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
255. Harrison SC (1996) Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell* 86:341-343.
256. Karthikeyan S, Leung T, Birrane G, Webster G, & Ladias JA (2001) Crystal structure of the PDZ1 domain of human Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor provides insights into the mechanism of carboxyl-terminal leucine recognition by class I PDZ domains. *J Mol Biol* 308:963-973.
257. Amacher JF, Cushing PR, Brooks L, Boisguerin P, & Madden DR (2013) Stereochemical Preferences Modulate Affinity and Selectivity among Five PDZ Domains that Bind CFTR: Comparative Structural and Sequence Analyses. *Structure* 21:1-12.
258. Karthikeyan S, Leung T, & Ladias JA (2001) Structural basis of the Na+/H+ exchanger regulatory factor PDZ1 interaction with the carboxyl-terminal region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 276:19683-19686.
259. Babault N, *et al.* (2011) Peptides targeting the PDZ domain of PTPN4 are efficient inducers of glioblastoma cell death. *Structure* 19:1518-1524.
260. Terrien E, *et al.* (2012) Interference with the PTEN-MAST2 Interaction by a Viral Protein Leads to Cellular Relocalization of PTEN. *Science Sign* 5:ra58-ra58.
261. Nourry C, Grant SGN, & Borg J-P (2003) PDZ domain proteins: plug and play! *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2003:RE7.
262. Songyang Z (1997) Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains. *Science* 275:73-77.
263. Jaulin-Bastard F, *et al.* (2002) Interaction between Erbin and a Catenin-related protein in epithelial cells. *J Biol Chem* 277:2869-2875.
264. Laura RP, *et al.* (2002) The Erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl termini of delta-catenin and ARVCF. *J Biol Chem* 277:12906-12914.
265. Hall RA, *et al.* (1998) The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na+/H+-exchanger regulatory factor to control Na+/H+ exchange. *Nature* 392:626-630.
266. Naisbitt S, *et al.* (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23:569-582.
267. Hata Y, Butz S, & Südhof TC (1996) CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *J Neurosci* 16:2488-2494.
268. Grootjans JJ, *et al.* (1997) Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Nat. Acad Sci USA* 94:13683-13688.
269. Hsueh YP & Sheng M (1999) Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *J Neurosci* 19:7415-7425.
270. Torres R, *et al.* (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* 21:1453-1463.
271. Borg JP, *et al.* (2000) ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nature cell biology* 2:407-414.
272. Huang YZ, Wang Q, Xiong WC, & Mei L (2001) Erbin is a protein concentrated at postsynaptic membranes that interacts with PSD-95. *J Biol Chem* 276:19318-19326.

273. Stricker N, *et al.* (1997) PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nature* 15:336-342.
274. Setou M, Nakagawa T, Seog DH, & Hirokawa N (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288:1796-1802.
275. Tyler RC, Peterson FC, & Volkman BF (2010) Distal interactions within the par3-VE-cadherin complex. *Biochemistry* 49:951-957.
276. Appleton Ba, *et al.* (2006) Comparative structural analysis of the Erbin PDZ domain and the first PDZ domain of ZO-1. Insights into determinants of PDZ domain specificity. *J Biol Chem* 281:22312-22320.
277. Kang BS, Cooper DR, Devedjiev Y, Derewenda U, & Derewenda ZS (2003) Molecular Roots of Degenerate Specificity in Syntenin's PDZ2 Domain. *Structure* 11:845-853.
278. Skelton NJ, *et al.* (2003) Origins of PDZ domain ligand specificity. Structure determination and mutagenesis of the Erbin PDZ domain. *J Biol Chem* 278:7645-7654.
279. Tonikian R, Zhang Y, Sazinsky S, & Currell B (2008) A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS biol* 6:2043-2059.
280. Zhang J, *et al.* (2008) Structural basis of beta-catenin recognition by Tax-interacting protein-1. *J Mol Biol* 384:255-263.
281. Zhang Y, *et al.* (2006) Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families. *J Biol Chem* 281:22299-22311.
282. Birrane G, Chung J, & Ladias Jaa (2003) Novel mode of ligand recognition by the Erbin PDZ domain. *J Biol Chem* 278:1399-1402.
283. Bezprozvanny I & Maximov A (2001) Classification of PDZ domains. *FEBS L* 509:457-462.
284. Tochio H, Zhang Q, Mandal P, Li M, & Zhang M (1999) Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nat Struct Biol* 6:417-421.
285. Madsen KL, *et al.* (2005) Molecular determinants for the complex binding specificity of the PDZ domain in PICK1. *J Biol Chem* 280:20539-20548.
286. Wiedemann U, *et al.* (2004) Quantification of PDZ domain specificity, prediction of ligand affinity and rational design of super-binding peptides. *Journal of molecular biology* 343:703-718.
287. Shao X, *et al.* (2011) A regression framework incorporating quantitative and negative interaction data improves quantitative prediction of PDZ domain-peptide interaction from primary sequence. *Bioinformatics* 27:383-390.
288. Nakariyakul S, Liu Z-P, & Chen L (2013) A sequence-based computational approach to predicting PDZ domain-peptide interactions. *Biochem biophys acta*:6-11.
289. Chen J, Pan L, Wei Z, Zhao Y, & Zhang M (2008) Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J* 27:2113-2123.
290. Hui S, Xing X, & Bader GD (2013) Predicting PDZ domain mediated protein interactions from structure. *BMC bioinformatics* 14:27.
291. Smith CA & Kortemme T (2010) Structure-based prediction of the peptide sequence space recognized by natural and synthetic PDZ domains. *J Mol Biol* 402:460-474.
292. Kaneko T, Sidhu SS, & Li SSC (2011) Evolving specificity from variability for protein interaction domains. *Trends in Biochem Sci* 36:183-190.
293. Kim J, *et al.* (2012) Rewiring of PDZ Domain-Ligand Interaction Network Contributed to Eukaryotic Evolution. *PLoS Genet* 8:e1002510.
294. Hillier BJ (1999) Unexpected Modes of PDZ Domain Scaffolding Revealed by Structure of nNOS-Syntrophin Complex. *Science* 284:812-815.
295. Tochio H, *et al.* (2000) Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed beta-finger structure from the nNOS PDZ domain. *J Mol Biol* 303:359-370.
296. Brenman JE, *et al.* (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.

297. Brenman JE, Christopherson KS, Craven SE, McGee aW, & Bredt DS (1996) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci* 16:7407-7415.
298. Penkert RR, DiVittorio HM, & Prehoda KE (2004) Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex. *Nat Struct Mol Biol* 11:1122-1127.
299. Ivarsson Y (2012) Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS L*.
300. Mu Y, Cai P, Hu S, Ma S, & Gao Y (2014) Characterization of diverse internal binding specificities of PDZ domains by yeast two-hybrid screening of a special Peptide library. *PloS one* 9:e88286.
301. Lenfant N, *et al.* (2010) A genome-wide study of PDZ-domain interactions in C. elegans reveals a high frequency of non-canonical binding. *BMC genomics* 11:671.
302. Utepbergenov DI, Fanning AS, & Anderson JM (2006) Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem* 281:24671-24677.
303. Wu J, *et al.* (2007) Domain-swapped dimerization of the second PDZ domain of ZO2 may provide a structural basis for the polymerization of claudins. *J Biol Chem* 282:35988-35999.
304. Fanning AS, Lye MF, Anderson JM, & Lavie A (2007) Domain swapping within PDZ2 is responsible for dimerization of ZO proteins. *J Biol Chem* 282:37710-37716.
305. Im YJ, *et al.* (2003) Crystal structure of GRIP1 PDZ6-peptide complex reveals the structural basis for class II PDZ target recognition and PDZ domain-mediated multimerization. *J Biol Chem* 278:8501-8507.
306. Im YJ, *et al.* (2003) Crystal structure of the Shank PDZ-ligand complex reveals a class I PDZ interaction and a novel PDZ-PDZ dimerization. *J Biol Chem* 278:48099-48104.
307. Elkins JM, *et al.* (2007) Structure of PICK1 and other PDZ domains obtained with the help of self-binding C-terminal extensions. *Protein science* 16:683-694.
308. Sugi T, *et al.* (2007) Crystal structures of autoinhibitory PDZ domain of Tamalin: implications for metabotropic glutamate receptor trafficking regulation. *EMBO J* 26:2192-2205.
309. Maudsley S & Zamah A (2000) Platelet-Derived Growth Factor Receptor Association with Na +/ H+ Exchanger Regulatory Factor Potentiates Receptor Activity. *Mol Cell Biol* 20:8352-8363.
310. Chang BH, *et al.* (2011) A systematic family-wide investigation reveals that ~30% of mammalian PDZ domains engage in PDZ-PDZ interactions. *Chem Biol* 18:1143-1152.
311. Fouassier L, Yun C, Fitz J, & Doctor R (2000) Evidence for Ezrin-Radixin-Moesin-binding Phosphoprotein 50 (EBP50) Self-association through PDZ-PDZ Interactions *. *J Biol Chem* 275:25039-25045.
312. Zimmermann P, *et al.* (2002) PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell* 9:1215-1225.
313. Meerschaert K, *et al.* (2009) The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. *Cell mol life Sci* 66:3951-3966.
314. Wu H, *et al.* (2007) PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol Cell* 28:886-898.
315. Ivarsson Y, *et al.* (2013) Prevalence, specificity and determinants of lipid-interacting PDZ domains from an in-cell screen and in vitro binding experiments. *Plos One* 8:e54581.
316. Chen Y, *et al.* (2012) Genome-wide functional annotation of dual-specificity protein- and lipid-binding modules that regulate protein interactions. *Mol Cell* 46:226-237.
317. Cho W & Stahelin RV (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Bioph Biom* 34:119-151.
318. Gallardo R, Ivarsson Y, Schymkowitz J, Rousseau F, & Zimmermann P (2010) Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem* 11:456-467.
319. Zimmermann P (2006) The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions. *Biochem biophys acta* 1761:947-956.

320. Lambaerts K*, et al.* (2012) Syntenin, a syndecan adaptor and an Arf6 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate effector, is essential for epiboly and gastrulation cell movements in zebrafish. *J. Cell Sci* 125:1129-1140.
321. Zimmermann P*, et al.* (2005) Syndecan recycling [corrected] is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Dev cell* 9:377-388.
322. Craven SE & Bredt DS (1998) PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* 93:495-498.
323. Fanning AS & Anderson JM (1999) Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol* 11:432-439.
324. Fuentes EJ, Gilmore Sa, Mauldin RV, & Lee AL (2006) Evaluation of energetic and dynamic coupling networks in a PDZ domain protein. *J Mol Biol* 364:337-351.
325. Jones RB, Gordus A, Krall Ja, & MacBeath G (2006) A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature* 439:168-174.
326. Pisabarro MT, Serrano L, & Wilmanns M (1998) Crystal structure of the abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions. *J Mol Biol* 281:513-521.
327. Nguyen JT, Turck CW, Cohen FE, Zuckermann RN, & Lim Wa (1998) Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors. *Science* 282:2088-2092.
328. Harris BZ, Lau FW, Fujii N, Guy RK, & Lim Wa (2003) Role of electrostatic interactions in PDZ domain ligand recognition. *Biochemistry* 42:2797-2805.
329. Novak KAP, Fujii N, & Guy RK (2002) Investigation of the PDZ domain ligand binding site using chemically modified peptides. *Bio Med Chem Lett* 12:2471-2474.
330. Tian Q-B*, et al.* (2006) Interaction of LDL receptor-related protein 4 (LRP4) with postsynaptic scaffold proteins via its C-terminal PDZ domain-binding motif, and its regulation by Ca/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur. J. Neurosci.* 23:2864-2876.
331. Chung HJ, Huang YH, Lau L-F, & Huganir RL (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24:10248-10259.
332. Dillon C, Creer A, Kerr K, Kümin A, & Dickson C (2002) Basolateral targeting of ERBB2 is dependent on a novel bipartite juxtamembrane sorting signal but independent of the C-terminal ERBIN-binding domain. *Mol Cell Biol* 22:6553-6563.
333. Hegedüs T*, et al.* (2003) C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biop Res Co* 302:454-461.
334. Ikenoue T, Inoki K, Zhao B, & Guan K-L (2008) PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer res* 68:6908-6912.
335. Gardoni F*, et al.* (2003) CaMKII-dependent phosphorylation regulates SAP97/NR2A interaction. *J Biol Chem* 278:44745-44752.
336. Raghuram V, Hormuth H, & Foskett JK (2003) A kinase-regulated mechanism controls CFTR channel gating by disrupting bivalent PDZ domain interactions. *Proc Nat. Acad Sci USA* 100:9620-9625.
337. Gianni S*, et al.* (2005) The kinetics of PDZ domain-ligand interactions and implications for the binding mechanism. *J Biol Chem* 280:34805-34812.
338. Chi CN, Engström A, Gianni S, Larsson M, & Jemth P (2006) Two conserved residues govern the salt and pH dependencies of the binding reaction of a PDZ domain. *J Biol Chem* 281:36811-36818.
339. Billups D & Attwell D (2002) Control of intracellular chloride concentration and GABA response polarity in rat retinal ON bipolar cells. *J Physiol* 545:183-198.
340. Xiong Z-G, Chu X-P, & Simon RP (2006) Ca2+ -permeable acid-sensing ion channels and ischemic brain injury. *J Membr Biol* 209:59-68.
341. Mishra P*, et al.* (2007) Dynamic scaffolding in a G protein-coupled signaling system. *Cell* 131:80-92.
342. Fuentes EJ, Der CJ, & Lee AL (2004) Ligand-dependent Dynamics and Intramolecular Signaling in a PDZ Domain. *J Mol Biol* 335:1105-1115.

343. Lockless SW (1999) Evolutionarily Conserved Pathways of Energetic Connectivity in Protein Families. *Science* 286:295-299.
344. Dima R & Thirumalai D (2006) Determination of network of residues that regulate allostery in protein families using sequence analysis. *Protein Science*:258-268.
345. Reynolds KaK, McLaughlin RRN, & Ranganathan R (2011) Hot spots for allosteric regulation on protein surfaces. *Cell* 147:1564-1575.
346. Lee J, Natarajan M, Nashine V, & Socolich M (2008) Surface Sites for Engineering Allosteric Control in Proteins. *Science* 322:438-442.
347. Dhulesia A, Gsponer J, & Vendruscolo M (2008) Mapping of two networks of residues that exhibit structural and dynamical changes upon binding in a PDZ domain protein. *J Am Chem Soc* 130:8931-8939.
348. Petit CM, Zhang J, Sapienza PJ, Fuentes EJ, & Lee AL (2009) Hidden dynamic allostery in a PDZ domain. *Proc Nat. Acad Sci USA* 106:18249-18254.
349. Peterson FFC, Penkert RRR, Volkman BFB, & Prehoda KE (2004) Cdc42 regulates the Par-6 PDZ domain through an allosteric CRIB-PDZ transition. *Mol Cell* 13:665-676.
350. Bhattacharya S*, et al.* (2010) A conformational switch in the scaffolding protein NHERF1 controls autoinhibition and complex formation. *J Biol Chem* 285:9981-9994.
351. Whitney DS, Peterson FC, Kovrigin EL, & Volkman BF (2013) Allosteric activation of the Par-6 PDZ via a partial unfolding transition. *J Am Chem Soc*.
352. Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, & Margolis B (2003) Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5:137-142.
353. Zhang Q, Fan JS, & Zhang M (2001) Interdomain chaperoning between PSD-95, Dlg, and Zo-1 (PDZ) domains of glutamate receptor-interacting proteins. *J Biol Chem* 276:43216-43220.
354. Yan J, Pan L, Chen X, Wu L, & Zhang M (2010) The structure of the harmonin/sans complex reveals an unexpected interaction mode of the two Usher syndrome proteins. *Proc Nat. Acad Sci USA* 107:4040-4045.
355. Nomme J*, et al.* (2011) The Src homology 3 domain is required for junctional adhesion molecule binding to the third PDZ domain of the scaffolding protein ZO-1. *J Biol Chem* 286:43352-43360.
356. Pan L, Chen J, Yu J, Yu H, & Zhang M (2011) The structure of the PDZ3-SH3-GuK tandem of ZO-1 protein suggests a supramodular organization of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family scaffold protein core. *J Biol Chem* 286:40069-40074.
357. Long J-F*, et al.* (2005) Autoinhibition of X11/Mint scaffold proteins revealed by the closed conformation of the PDZ tandem. *Nat Struct Mol Biol* 12:722-728.
358. Long J-F*, et al.* (2003) Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. *J Mol Biol* 327:203-214.
359. Feng W, Wu H, Chan L-N, & Zhang M (2008) Par-3-mediated junctional localization of the lipid phosphatase PTEN is required for cell polarity establishment. *J Biol Chem* 283:23440-23449.
360. Mortier E*, et al.* (2005) Nuclear speckles and nucleoli targeting by PIP2-PDZ domain interactions. *EMBO J* 24:2556-2565.
361. Kim E & Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771-781.
362. Yan J, *et al.* (2005) Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *EMBO J* 24:3985-3995.
363. Qian Y & Prehoda KE (2006) Interdomain interactions in the tumor suppressor discs large regulate binding to the synaptic protein GukHolder. *J Biol Chem* 281:35757-35763.
364. Newman Ra & Prehoda KE (2009) Intramolecular interactions between the SRC homology 3 and guanylate kinase domains of discs large regulate its function in asymmetric cell division. *J Biol Chem* 284:12924-12932.
365. Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross Ca, & Sauer RT (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113:61-71.

366. Hadfield KD, *et al.* (2008) HtrA1 inhibits mineral deposition by osteoblasts: requirement for the protease and PDZ domains. *J Biol Chem* 283:5928-5938.
367. Martins LM, *et al.* (2003) Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem* 278:49417-49427.
368. Meltzer M, *et al.* (2008) Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control. *Angewandte Chem Int Edit* 47:1332-1334.
369. Murwantoko, *et al.* (2004) Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem J* 381:895-904.
370. Hansen G & Hilgenfeld R (2013) Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cell mol life Sci* 70:761-775.
371. Zhang M & Wang W (2003) Organization of Signaling Complexes by PDZ-Domain Scaffold Proteins. *Accounts Chem. Res.* 36:530-538.
372. Gu MX, York JD, Warshawsky I, & Majerus PW (1991) Identification, cloning, and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to cytoskeletal protein 4.1. *Proc Nat. Acad Sci USA* 88:5867-5871.
373. Andersen JN, *et al.* (2004) A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J* 18:8-30.
374. Yang Q & Tonks NK (1991) Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4.1, ezrin, and talin. *Proc Nat. Acad Sci USA* 88:5949-5953.
375. Krieg J & Hunter T (1992) Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *J Biol Chem* 267:19258-19265.
376. Møller NP, *et al.* (1994) Src kinase associates with a member of a distinct subfamily of protein-tyrosine phosphatases containing an ezrin-like domain. *Proc Nat. Acad Sci USA* 91:7477-7481.
377. Rechsteiner M & Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS* 0004:267-271.
378. Rogers S, Wells R, & Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234:364-368.
379. Belizario J, Alves J, Garay-Malpartida M, & Occhiucci JM (2008) Coupling caspase cleavage and proteasomal degradation of proteins carrying PEST motif. *Curr Prot Pep Sci* 9:210-220.
380. Shumway SD, Maki M, & Miyamoto S (1999) The PEST Domain of Ikappa Balpha Is Necessary and Sufficient for in Vitro Degradation by micro -Calpain. *J Biol Chem* 274:30874-30881.
381. Gu M & Majerus PW (1996) The properties of the protein tyrosine phosphatase PTPMEG. *J Biol Chem* 271:27751-27759.
382. Zhang S, Eckberg W, Yang Q, Samatar A, & Tonks NK (1995) Biochemical characterization of a human band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase, PTPH1. *J Biol Chem*:20067-20072.
383. Rikova K, *et al.* (2007) Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131:1190-1203.
384. Hornbeck PV, *et al.* (2012) PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic acids research* 40:D261-270.
385. Wisniewski J, Nagaraj N, Zougman A, Gnad F, & Mann M (2010) Brain Phosphoproteome Obtained by a FASP-Based Method Reveals Plasma Membrane Protein Topology research articles. 9:3280-3289.
386. Trinidad JC, *et al.* (2012) Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11:215-229.
387. Huttlin EL, *et al.* (2010) A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 143:1174-1189.

388. Rozakis-Adcock M, van der Geer P, Mbamalu G, & Pawson T (1995) MAP kinase phosphorylation of mSos1 promotes dissociation of mSos1-Shc and mSos1-EGF receptor complexes. *Oncogene* 11:1417-1426.
389. Zhao Z-s, Manser E, & Lim L (2000) Interaction between PAK and Nck : a Template for Nck Targets and Role of PAK Autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 20:3906-3917.
390. Wu C*, et al.* (2007) Systematic identification of SH3 domain-mediated human protein-protein interactions by peptide array target screening. *Proteomics* 7:1775-1785.
391. Zhou J*, et al.* (2013) PTPN4 negatively regulates CrkI in human cell lines. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 18:297-314.
392. Zhang S-h, Kobayashi R, Graves PR, Piwnica-worms H, & Tonks NK (1997) Serine Phosphorylation-dependent Association of the Band 4 . 1- related Protein-tyrosine Phosphatase PTPH1 with 14-3-3 ζ Protein *. *J Biol Chem* 272:27281-27287.
393. Han S, Williams S, & Mustelin T (2000) Cytoskeletal protein tyrosine phosphatase PTPH1 reduces T cell antigen receptor signaling. *Eur J Immunol* 30:1318-1325.
394. Edwards SD & Keep NH (2001) The 2.7 A crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry* 40:7061-7068.
395. Sun C-X, Robb VA, & Gutmann DH (2002) Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J. Cell Sci* 115:3991-4000.
396. Baines AJ, Lu H-C, & Bennett PM (2014) The Protein 4.1 family: Hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochem biophys acta* 1838:605-619.
397. Han BG, Nunomura W, Takakuwa Y, Mohandas N, & Jap BK (2000) Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nat Struct Biol* 7:871-875.
398. Seo P, Jeong J, & Zeng L (2009) Alternatively spliced exon 5 of the FERM domain of Protein 4.1R encodes a novel binding site for erythrocyte p55 and is critical for membrane targeting in epithelial cells. *Biochem biophys acta* 1793:281-289.
399. An XL*, et al.* (2001) Structural and functional characterization of protein 4.1R-phosphatidylserine interaction: potential role in 4.1R sorting within cells. *J Biol Chem* 276:35778-35785.
400. Nunomura W, Takakuwa Y, Parra M, Conboy JG, & Mohandas N (2000) Ca2+-dependent and Ca2+-independent Calmodulin Binding Sites in Erythrocyte Protein 4.1. IMPLICATIONS FOR REGULATION OF PROTEIN 4.1 INTERACTIONS WITH TRANSMEMBRANE PROTEINS. *J Biol Chem* 275:6360-6367.
401. Nunomura W & Takakuwa Y (2006) Regulation of Protein 4.1R Interactions with Membrane Proteins by Ca2+ and Calmodulin. *Front Biosci* 11:1522-1539.
402. Nunomura W*, et al.* (2009) Marked difference in membrane-protein-binding properties of the two isoforms of protein 4.1R expressed at early and late stages of erythroid differentiation. *Biochem J* 417:141-148.
403. Hirao M*, et al.* (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 135:37-51.
404. 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* 101:259-270.
405. Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, & Hakoshima T (2000) Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J* 19:4449-4462.
406. 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* 22:502-514.
407. Bretscher A, Edwards K, & Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:586-599.

408. Diakowski WG, M; Silkorski, A.F. (2006) Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochem Cyto* 44:231-248.
409. Takeuchi K, Kawashima A, Nagafuchi A, & Tsukita S (1994) Structural diversity of band 4.1 superfamily members. *J. Cell Sci* 107 (Pt 7:1921-1928.
410. Smith A*, et al.* (1995) PEZ: A novel human cDNA encoding protein tyrosine phosphatase and ezrin-like domains. *Biochem Biop Res Co* 3:959-965.
411. Uchida Y*, et al.* (2002) Localization of PTP-FERM in Nerve Processes through Its FERM Domain. *Biochem Biop Res Co* 292:13-19.
412. Leto TL & Marchesi VT (1984) A structural model of human erythrocyte protein 4.1. *J Biol Chem* 259:4603-4608.
413. Baines AJ (2006) A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function. *BMC genomics* 7:85.
414. Horne WC, Prinz WC, & Tang EK (1990) Identification of two cAMP-dependent phosphorylation sites on erythrocyte protein 4.1. *Biochem biophys acta* 1055:87-92.
415. Chao TS & Tao M (1991) Modulation of protein 4.1 binding to inside-out membrane vesicles by phosphorylation. *Biochemistry* 30:10529-10535.
416. Gauthier E, Guo X, Mohandas N, & An X (2011) Phosphorylation-dependent perturbations of the 4.1R-associated multiprotein complex of the erythrocyte membrane. *Biochemistry* 50:4561-4567.
417. Xiao-ping Z*, et al.* (2010) Purification and Characterization of Protein Tyrosine Phosphatase MEG1 and Preparation of Anti-PTPMEG1 Antibody. *Technology* 26:591-595.
418. Opas E, Rutledge S, & Golub E (1997) Alendronate Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase Meg1. *Biochem Pharmacol* 54:721-727.
419. Karisch R*, et al.* (2011) Global proteomic assessment of the classical protein-tyrosine phosphatome and "Redoxome". *Cell* 146:826-840.
420. Liou G-Y & Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Res* 44:479-496.
421. Ostman A, Frijhoff J, Sandin A, & Böhmer F-D (2011) Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *J biochem* 150:345-356.
422. Park KW*, et al.* (2000) Molecular cloning and characterization of a protein tyrosine phosphatase enriched in testis, a putative murine homologue of human PTPMEG. *Gene* 257:45-55.
423. Gu M, Meng K, & Majerus PW (1996) The effect of overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTPMEG on cell growth and on colony formation in soft agar in COS-7 cells. *Proc Nat. Acad Sci USA* 93:12980-12985.
424. Matsumoto C*, et al.* (2013) Genes that characterize T3-predominant Graves' thyroid tissues. *Eur J Endocrinol* 168:137-144.
425. Sozio MS*, et al.* (2004) PTPH1 is a predominant protein-tyrosine phosphatase capable of interacting with and dephosphorylating the T cell receptor zeta subunit. *J Biol Chem* 279:7760-7769.
426. Young JA*, et al.* (2008) The protein tyrosine phosphatase PTPN4/PTP-MEG1, an enzyme capable of dephosphorylating the TCR ITAMs and regulating NF-kappaB, is dispensable for T cell development and/or T cell effector functions. *Mol Immunol* 45:3756-3766.
427. Pitcher La & van Oers NSC (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends in Immunology* 24:554-560.
428. Bauler TJ*, et al.* (2007) Normal TCR signal transduction in mice that lack catalytically active PTPN3 protein tyrosine phosphatase. *J Immunolog* 178:3680-3687.
429. Bauler TJ, Hendriks WJAJ, & King PD (2008) The FERM and PDZ Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatases, PTPN4 and PTPN3, Are Both Dispensable for T Cell Receptor Signal Transduction. *Plos One* 3:11.
430. Whited JL, Robichaux MB, Yang JC, & Garrity Pa (2007) Ptpmeg is required for the proper establishment and maintenance of axon projections in the central brain of Drosophila. *Development* 134:43-53.

431. Banks PJ, Warburton EC, Brown MW, & Bashir ZI (2014) Mechanisms of synaptic plasticity and recognition memory in the perirhinal cortex. *Prog Mol Biol Trans Sci* 122:193-209.
432. Hirano T (2012) Glutamate-receptor-like molecule GluRδ2 involved in synapse formation at parallel fiber-Purkinje neuron synapses. *Cerebellum* 11:71-77.
433. Mandolesi G, Cesa R, Autuori E, & Strata P (2009) An orphan ionotropic glutamate receptor: the delta2 subunit. *Neuroscience* 158:67-77.
434. Yuzaki M (2009) New (but old) molecules regulating synapse integrity and plasticity: Cbln1 and the delta2 glutamate receptor. *Neuroscience* 162:633-643.
435. Kishimoto Y*, et al.* (1997) Conditioned eyeblink response is impaired in mutant mice lacking NMDA receptor subunit NR2A. *Neuroreport* 8:3717-3721.
436. Kishimoto Y, Kawahara S, Mori H, Mishina M, & Kirino Y (2001) Long-trace interval eyeblink conditioning is impaired in mutant mice lacking the NMDA receptor subunit epsilon 1. *Eur. J. Neurosci.* 13:1221-1227.
437. Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, & Spedding M (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56:2-5.
438. Salter MW & Kalia LV (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5:317-328.
439. Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, Mishina M, & Inoue Y (1996) Developmental changes in expression and distribution of the glutamate receptor channel delta 2 subunit according to the Purkinje cell maturation. *Dev Brain Res* 92:147-155.
440. Yuzaki M (2004) The delta2 glutamate receptor: a key molecule controlling synaptic plasticity and structure in Purkinje cells. *Cerebellum* 3:89-93.
441. Kina S-i*, et al.* (2007) Involvement of protein-tyrosine phosphatase PTPMEG in motor learning and cerebellar long-term depression. *Eur. J. Neurosci.* 26:2269-2278.
442. Kohda K*, et al.* (2007) The extreme C-terminus of GluRdelta2 is essential for induction of long-term depression in cerebellar slices. *Eur. J. Neurosci.* 25:1357-1362.
443. Uemura T*, et al.* (2007) Regulation of long-term depression and climbing fiber territory by glutamate receptor delta2 at parallel fiber synapses through its C-terminal domain in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 27:12096-12108.
444. Kakegawa W*, et al.* (2008) Differential regulation of synaptic plasticity and cerebellar motor learning by the C-terminal PDZ-binding motif of GluRdelta2. *J Neurosci* 28:1460-1468.
445. Kohda K*, et al.* (2013) The δ2 glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc Nat. Acad Sci USA* 110:946-957.
446. Seidenman KJ, Steinberg JP, Huganir R, & Malinow R (2003) Glutamate receptor subunit 2 Serine 880 phosphorylation modulates synaptic transmission and mediates plasticity in CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 23:9220-9228.
447. Sakurai M (1990) Calcium is an intracellular mediator of the climbing fiber in induction of cerebellar long-term depression. *Proc Nat. Acad Sci USA* 87:3383-3385.
448. Konnerth a, Dreessen J, & Augustine GJ (1992) Brief dendritic calcium signals initiate long-lasting synaptic depression in cerebellar Purkinje cells. *Proc Nat. Acad Sci USA* 89:7051-7055.
449. Hirai H (2001) Ca2+-dependent regulation of synaptic delta2 glutamate receptor density in cultured rat Purkinje neurons. *Euro J Neurosci* 14:73-82.
450. Hendriks WJ*, et al.* (2013) Protein tyrosine phosphatases in health and disease. *FEBS J* 280:708-730.
451. Gao Q*, et al.* (2014) Activating Mutations in PTPN3 Promote Cholangiocarcinoma Cell Proliferation and Migration and are Associated with Tumor Recurrence in Patients. *Gastroenterol*.
452. Salmeen A*, et al.* (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 423:769-773.
453. Salmeen A & Barford D (2005) Functions and Mechanisms of Redox Regulation of Cysteine-Based Phosphatases. *Antioxid Redox Sign* 7:560-577.

454. Frigola J, *et al.* (2006) Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat genet* 38:540-549.
455. Mayor R, *et al.* (2009) Long-range epigenetic silencing at 2q14.2 affects most human colorectal cancers and may have application as a non-invasive biomarker of disease. *Brit J Cancer* 100:1534-1539.
456. Cerutti JM, *et al.* (2007) Molecular profiling of matched samples identifies biomarkers of papillary thyroid carcinoma lymph node metastasis. *Cancer res* 67:7885-7892.
457. Abba MC, *et al.* (2004) Transcriptomic changes in human breast cancer progression as determined by serial analysis of gene expression. *Breast cancer res* 6:R499-513.
458. Kabir NN, Rönnstrand L, & Kazi JU (2013) Deregulation of protein phosphatase expression in acute myeloid leukemia. *Medical Oncology* 30:517.
459. Wu C-W, *et al.* (2006) PTPN3 and PTPN4 tyrosine phosphatase expression in human gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res* 26:1643-1649.
460. Wu C-W, Kao H-L, Li AF-Y, Chi C-W, & Lin W-C (2006) Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues. *Cancer lett* 242:95-103.
461. Thoulouze MI, *et al.* (1997) Rabies virus infects mouse and human lymphocytes and induces apoptosis . Rabies Virus Infects Mouse and Human Lymphocytes and Induces Apoptosis. *J Virol* 71.
462. Préhaud C, Lay S, Dietzschold B, Lafon M, & Pre C (2003) Glycoprotein of Nonpathogenic Rabies Viruses Is a Key Determinant of Human Cell Apoptosis Glycoprotein of Nonpathogenic Rabies Viruses Is a Key Determinant of Human Cell Apoptosis. *J Virol* 77.
463. Ungefroren H, *et al.* (2001) FAP-1 in pancreatic cancer cells: functional and mechanistic studies on its inhibitory role in CD95-mediated apoptosis. *J Cell Science* 114:2735-2746.
464. Yanagisawa J, *et al.* (1997) The Molecular Interaction of Fas and FAP-1: a tripeptide bloker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272:8539-8545.
465. Sato T, Irie S, Kitada S, & Reed JC (1995) FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268:411-415.
466. Ivanov VN, *et al.* (2003) FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol* 23:3623-3635.
467. Foehr ED, Lorente G, Vincent V, Nikolich K, & Urfer R (2005) FAS associated phosphatase (FAP-1) blocks apoptosis of astrocytomas through dephosphorylation of FAS. *J Neuro-onco* 74:241-248.
468. Eberle A, Reinehr R, Becker S, Keitel V, & Häussinger D (2007) CD95 tyrosine phosphorylation is required for CD95 oligomerization. *Apoptosis* 12:719-729.
469. Gloire G, Charlier E, & Piette J (2008) Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases. *Biochem Pharmacol* 76:1451-1458.
470. Hou S-W, *et al.* (2010) PTPH1 dephosphorylates and cooperates with p38gamma MAPK to increase ras oncogenesis through PDZ-mediated interaction. *Cancer Res* 70:2901-2910.
471. Tang J, Qi X, Mercola D, Han J, & Chen G (2005) Essential role of p38gamma in K-Ras transformation independent of phosphorylation. *J Biol Chem* 280:23910-23917.
472. Qi X, *et al.* (2007) p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *J Biol Chem* 282:31398-31408.
473. Akimoto M, *et al.* (2013) Signaling through dynamic linkers as revealed by PKA. *Proc Nat. Acad Sci USA* 110:14231-14236.
474. Tompa P (2013) Multisteric Regulation by Structural Disorder in Modular Signaling Proteins: An Extension of the Concept of Allostery. *Chem rev*.
475. Wang X, *et al.* (2014) The Linker between the Dimerization and Catalytic Domains of the CheA Histidine Kinase Propagates Changes in Structure and Dynamics That Are Important for Enzymatic Activity. *Biochemistry* 53:855-861.
476. King RD & Sternberg MJ (1996) Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein science* 5:2298-2310.

477. Guermeur Y, Geourjon C, Gallinari P, & Deléage G (1999) Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. *Bioinformatics* 15:413-421.
478. Rost B & Sander C (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* 19:55-72.
479. Frishman D & Argos P (1996) Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein engineering* 9:133-142.
480. Ma B, Tsai C-J, Haliloğlu T, & Nussinov R (2011) Dynamic allostery: linkers are not merely flexible. *Structure* 19:907-917.
481. Clore GM & Iwahara J (2009) Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes. *Chem rev* 109:4108-4139.
482. Volkov AN, Ubbink M, & van Nuland NaJ (2010) Mapping the encounter state of a transient protein complex by PRE NMR spectroscopy. *J Biomol NMR* 48:225-236.
483. Tang C, Schwieters CD, & Clore GM (2007) Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. *Nature* 449:1078-1082.
484. Henzler-Wildman Ka*, et al.* (2007) Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature* 450:838-844.
485. Mori T, Vale RD, & Tomishige M (2007) How kinesin waits between steps. *Nature* 450:750-754.

Etude structurale et fonctionnelle de la phosphatase humaine PTPN4

Résumé

La fonction des protéines de signalisation est déterminée par la nature des domaines qui les composent. Une meilleure compréhension des voies de signalisation passe par l'étude de ces domaines et de leur régulation.

PTPN4 est une tyrosine phosphatase qui joue un rôle anti-apoptotique. Lors de l'infection par une souche atténuée du virus de la rage, sa fonction est perturbée, conduisant à la mort des cellules. Cette perturbation est due à l'interaction du motif de reconnaissance au domaine PDZ (PBM) de la glycoprotéine virale avec le domaine PDZ de PTPN4.

Nous avons montré que ce domaine PDZ a un rôle d'inhibiteur allostérique de l'activité catalytique de la phosphatase de PTPN4. Ceci représente la première description de la régulation d'une phosphatase par un domaine PDZ. Cette inhibition est levée lors de la fixation d'un ligand au domaine PDZ, tel que le PBM de la glycoprotéine virale. Notre étude structurale révèle que la fixation d'un PBM perturbe les interactions transitoires entre les deux domaines et rétablit ainsi les propriétés catalytiques de la phosphatase.

Nous avons par ailleurs identifié un ligand endogène de PTPN4, la MAP Kinase p38γ qui, à travers son interaction avec PTPN4, participerait à la régulation de l'homéostasie cellulaire. La formation du complexe implique le recrutement du PBM de p38γ par le domaine PDZ de PTPN4. Ainsi, en plus d'avoir une fonction de régulation du domaine phosphatase, le domaine PDZ permet également le recrutement de partenaires et la présentation de substrats au site actif de la phosphatase de PTPN4. Cette étude contribue ainsi à améliorer notre connaissance du rôle des domaines PDZ dans les voies de signalisation cellulaires.

Mots clés : mort cellulaire, PTPN4, domaine PDZ, phosphatase, régulation allostérique, MAP Kinase

Adresse du laboratoire : Unité de RMN des Biomolécules
Institut Pasteur
25-28 Rue du Dr. Roux
75724 Paris Cedex 15