



HAL
open science

Implication de la kinase MAST2 et de la phosphatase PTEN dans la survie neuronale induite par la glycoprotéine du virus de la rage

Elouan Terrien

► To cite this version:

Elouan Terrien. Implication de la kinase MAST2 et de la phosphatase PTEN dans la survie neuronale induite par la glycoprotéine du virus de la rage. Biophysique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66292 . tel-00839505

HAL Id: tel-00839505

<https://theses.hal.science/tel-00839505>

Submitted on 28 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Biophysique moléculaire
Ecole doctorale ED387 de l'Interdisciplinarité pour le Vivant (iViV)

Présentée par

M. Elouan TERRIEN

Pour obtenir le grade de

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

Sujet de la thèse :

Implication de la kinase MAST2 et de la phosphatase PTEN dans la survie neuronale induite par la glycoprotéine du virus de la rage

soutenue le 21 Juin 2012

devant le jury composé de :

Dr. Nicolas WOLFF, Directeur de thèse

Dr. Catherine ROYER Rapporteur

Dr. Gilles TRAVÉ Rapporteur

Dr. Germain TRUGNAN Examineur

Dr. Sophie ZINN-JUSTIN Examineur

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2^{ème} étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54
Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 42 34 68 51
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs Catherine Royer et Gilles Travé, ainsi que les examinateurs Sophie Zinn-Justin et Germain Trugnan, d'avoir accepté de juger le travail réalisé pendant cette thèse.

Je remercie chaleureusement Muriel Delepierre pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour ces trois ans de thèse et même un peu plus. Tu auras toujours su te rendre disponible, à l'écoute et d'excellents conseils.

Un grand merci à Nicolas Wolff qui, en temps qu'encadrant, s'est investi à 200% dans son rôle. Cette motivation et cet enthousiaste auront été des éléments essentiels pour la réalisation de ce projet. Contraint de supporter, dans le même bureau, mon caractère que nous pourrions qualifier de « breton » (chacun pourra y faire sa propre interprétation), tu auras su y mettre une ambiance agréable avec l'aide d'un premier co-bureau, François, qui à sa manière aura su m'insuffler curiosité et réflexion sur tous les sujets et, dans un tout autre style, merci à mon deuxième co-bureau, Pierre, qui aura su apporter sa (très) bonne humeur pour cette dernière année de thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire qui sans exception auront été d'une grande disponibilité pour répondre à mes nombreuses interrogations. Chacun, par ses compétences, aura contribué à étendre, autant que je le pouvais, mes propres compétences. Floc, Catherine, Alain, Inaki, Nadia, Ada, Flog, Idir, Gisèle, Nicobab, Cécile, Laurence, Anne, Arianne. Je ne suis pas près de vous oublier, un grand merci. Je remercie également Kevin et Florent qui sont devenus, bien malgré eux, des objets expérimentaux sur mon aptitude à encadrer.

Le sujet ne serait pas celui qu'il est sans nos collaborateurs, Monique Lafon, Henri Buc, Christophe Préhaud, Mireille Lafage, Damien Chopy, Pauline Ménager et Zakir Kahn, à qui je dois aussi énormément, d'un point de vue des connaissances mais aussi des techniques. Je ne peux être qu'admiratif devant l'investissement et l'énergie que vous mettez dans le projet.

Si autant de résultats ont pu être réalisés et m'ont fait gagner un temps précieux, c'est aussi grâce aux nombreuses plateformes de l'Institut Pasteur qui nous sont facilement accessibles. Patrick England, Bertrand Raynal, Sylviane Hoos, Isabelle Miras, Jacques D'Alayer, Pascal Lenormand, Vincent Bondet, Pierre Béguin, Christine Girard-Blanc et Stéphane Petres : je vous suis très reconnaissant. Un grand merci à Jojo et Geneviève qui font un travail précieux en cuisine pour le bon déroulement de la vie au laboratoire.

Je remercie l'école doctorale pour m'avoir fait confiance en m'octroyant cette bourse de thèse de trois ans, ainsi que la Fondation Médicale pour la Recherche qui en prolongeant cette thèse de six mois m'a permis de terminer sereinement tous les travaux encore en chantier.

Mon équilibre psychique ne serait certainement pas celui qu'il est sans mes parents, ma famille et mes amis. Il y a trop de personnes à remercier d'un coup pour pouvoir tous les nommer ici. C'est vrai que je n'ai pas souvent eu l'occasion de vous le dire, alors un très grand merci à tous, à qui j'offre toute mon affection. Les mots paraissent cependant bien faibles en comparaison de ce que vous m'apportez. Comptez sur moi pour ne pas vous lâcher en retour.

Pleins de gros bisous à Clémence qui me supporte et partage mon quotidien depuis maintenant dix ans (et ce n'est pas rien).

Mes dernières pensées iront à Daniel qui aurait certainement été présent à cette soutenance.

Résumé

Le détournement de la machinerie cellulaire par un pathogène est souvent essentiel à sa propagation dans l'organisme de l'hôte. Les voies de signalisation qui contrôlent l'homéostasie cellulaire constituent une cible stratégique de nombreux virus lors d'une infection. Le virus de la rage possède la particularité d'induire la survie des neurones qu'il infecte. Le site de fixation à des domaines PDZ (PDZ-BS) de la glycoprotéine du virus de la rage a été identifié comme étant un élément clef dans le contrôle des voies de survie et d'apoptose. Ce PDZ-BS reconnaît uniquement deux isoformes de la famille des « *Microtubule Associated Serine/Threonine kinase* » (MAST1 et MAST2). La kinase MAST2 possède une fonction inhibitrice de survie en contrôlant l'élongation des neurites et interagit, par ailleurs, avec le PDZ-BS de la phosphatase PTEN, autre inhibiteur essentiel de la survie neuronale. Nous avons montré *in vitro* que les domaines C-terminaux de PTEN (PTEN13-Cter) et de la glycoprotéine (Cyto13-vir) entrent en compétition pour la fixation domaine PDZ de MAST2. La résolution de la structure du domaine PDZ de MAST2 et PTEN13-Cter, son ligand endogène, révèle un mode d'interaction original avec une large surface d'interaction. Ce réseau d'interaction est conservé dans la structure du domaine PDZ de MAST2 complexé au ligand viral Cyto13-vir. En parallèle, nous avons démontré que le PDZ-BS de la glycoprotéine est nécessaire pour induire la survie des cellules infectées et qu'il module la distribution spatiale de PTEN *in cellulo*. Cette localisation est dépendante de la phosphorylation de PTEN-Cter. Nous avons alors étudié, par RMN, la cinétique des résidus phosphorylés de PTEN-Cter par les deux kinases majoritaires CK2 et GSK3- β . Les profils de phosphorylation obtenus *in vitro* sont très semblables lorsque PTEN-Cter est incubé dans des extraits de neurones mais au moins une kinase supplémentaire, autre que CK2 et GSK3- β , intervient. L'étude de la phosphorylation de PTEN par MAST2 est en cours afin d'identifier le(s) résidu(s) phosphorylé(s) par cette kinase et déterminer le rôle fonctionnel de la kinase dans l'homéostasie cellulaire.

Mots-clefs: Survie neuronale, MAST2, PTEN, domaine PDZ, virus de la rage.

Abstract

The hijacking of cellular machinery by pathogens, is essential to spread through the body of the host. Perturbation of signaling pathways that control cell homeostasis is a strategy developed by many other viruses upon infection. One originality of rabies virus is that it induces survival of infected neurons to ensure its propagation. The PDZ binding site (PDZ-BS) of the glycoprotein of rabies virus was identified as a key element to control survival and apoptosis pathways. The PDZ-BS of the glycoprotein from the virulent strain recognizes only two isoforms of the Microtubule Associated Serine/Threonine kinase family (MAST1 and MAST2). MAST2 acts as a survival inhibitor that stimulates neurite retraction and inhibits their elongation. In addition MAST2 interacts with the PDZ-BS of the phosphatase PTEN that is another inhibitor of neuronal survival. We propose that the glycoprotein disrupts the PTEN/MAST2 complex by competition with the PDZ-BS of PTEN and disturbs cellular homeostasis. The structure of the PDZ domain of MAST2 complexed with its endogenous ligand (PTEN13-Cter) reveals an original interaction with a large surface of interaction. This interaction network is preserved in MAST2 PDZ domain complexed with the viral ligand (Cyto13-vir). We demonstrated that the PDZ-BS of the glycoprotein is essential to trigger neuronal survival and that it induces a partial exclusion of PTEN from the nucleus. It is well established that the phosphorylation of PTEN is controlled by its phosphorylation state. So, we have deciphered, using NMR, the multi-site phosphorylation pattern of PTEN C-terminal domain by CK2 and GSK3- β . In cellular extract, we observed the same ordered and distributive process but an alternative pathway, controlled by another kinase, has been highlighted. The contribution of the MAST2 kinase in the phosphorylation of PTEN is under investigation.

Key words : neuronal survival, MAST2, PTEN, PDZ domain, Rabies virus.

Title : MAST2 involvement in the mechanism of neuronal survival pathways induced by the rabies glycoprotein.

Avant-propos : émergence de la lutte pour l'existence

Les premières traces du monde vivant, tel que nous le définissons actuellement, datent de 3,6 à 4,1 milliards d'années. Au fil du temps et des modifications de l'environnement terrestre, ces organismes n'ont cessé d'évoluer en intégrant ou délaissant de nouvelles informations génétiques. Trois grands groupes phylogéniques sont aujourd'hui identifiés: les eucaryotes, les procaryotes et les archées. Ces cellules ont acquis la capacité de se réguler par l'intermédiaire de nombreuses voies de signalisation. Ces voies de signalisation fonctionnent sous la pression de nombreux facteurs (internes et externes). Une condition essentielle pour qu'un organisme puisse prospérer et transmettre son patrimoine génétique aux générations suivantes réside dans sa capacité à absorber les variations de son environnement en maintenant ses voies de signalisation à l'équilibre, ce que nous définissons par le terme d'homéostasie cellulaire. Toutes ces voies de signalisation passent, au minimum, par une cascade de réactions qui implique des molécules pouvant être de nature chimique différente (ADN, ARN, protéines, ions, molécules organiques...). À chaque étape du processus de régulation, des phénomènes naturels aléatoires (mutations génétiques) ou induits (infections par un pathogène) peuvent perturber l'homéostasie cellulaire et avoir des conséquences irréversibles pour la vie de la cellule ou de l'organisme. Ces phénomènes, qui ne sont *a priori* pas du ressort de l'homme et qui ont toujours fait partie du processus de l'évolution du monde vivant, font l'objet, dans notre société, d'une attention toute particulière. En effet, ces deux phénomènes, où il subsiste de nombreuses inconnues en recherche fondamentale, restent une cause importante de mortalité chez l'Homme.

Ainsi dans ce contexte, nous nous sommes servi du virus de la rage comme d'un outil « évolué » pour caractériser une des voies de signalisation qui conduisent la cellule vers la survie. Cette approche possède deux avantages. (1) Elle participe, d'un point de vue fondamental, à la compréhension du mécanisme de réplication du virus de la rage. (2) L'identification des partenaires cellulaires qui interagissent avec les protéines virales complète nos connaissances sur le mécanisme des voies de la survie cellulaire.

Nos travaux ont donc eu pour objet l'étude du rôle de la kinase MAST2 et la « Phosphatase and TENsin homolog » (PTEN), deux protéines humaines

essentiels dans la régulation de la survie des cellules. Un dérèglement de cette machinerie peut conduire à la survie et à la prolifération des cellules. PTEN représente une cible très étudiée pour le traitement de cellules cancéreuses. L'idée d'utiliser des peptides « pro-survie » pour contrôler l'activité de PTEN a émergé suite à nos études sur le virus de la rage qui, pour se disséminer du lieu de morsure au système nerveux central de l'hôte, induit la survie des neurones qu'il infecte en interagissant avec un partenaire cellulaire de PTEN : la kinase MAST2 (Microtubule Associated Serine Threonine protéine 2). Peu d'études ont été menées sur cette kinase pour comprendre son implication dans la régulation des voies de survie des neurones. À partir de nos données, et notamment avec l'étude des voies de survie déclenchées par le virus de la rage, nous avons tenté de compléter ce vide en proposant un mécanisme de régulation de MAST2 et PTEN.

Cette étude vise donc à décrire de manière détaillée l'interaction de la partie C-terminal de PTEN et de la glycoprotéine du virus de la Rage avec le domaine PDZ d'interaction de MAST2 (MAST2-PDZ), afin de proposer une étape initiale de la survie des neurones infectés par la rage. Nous avons également, sur la base de la structure de MAST2-PDZ, développé des peptides à forte affinité pour MAST2-PDZ ayant la capacité de déclencher la survie cellulaire après leur expression dans des neurones ou en dehors de tout contexte d'infection rabique.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
RÉSUMÉ.....	7
ABSTRACT.....	8
AVANT-PROPOS : ÉMERGENCE DE LA LUTTE POUR L'EXISTENCE	9
TABLE DES MATIÈRES	11
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1	17
LE VIRUS DE LA RAGE.....	17
1.1. <i>Classification</i>	18
1.2. <i>Propriétés du virus de la rage</i>	19
1.2.1. Organisation du virus de la rage.....	19
1.2.2. Le cycle de réplication du virus de la rage.....	22
1.3. <i>Pathogénicité du virus</i>	25
1.3.1. Le virus de la rage échappe aux systèmes de défense de l'hôte.....	25
1.3.2. Contrôle de survie et de la mort de cellules neuronales infectées par le virus de la rage.....	26
1.3.3. La glycoprotéine G facteur de virulence.....	30
1.3.4. Identification des partenaires cellulaires de la glycoprotéine G.....	33
CHAPITRE 2.....	35
<u>MICROTUBULE ASSOCIATED SERINE/THREONINE KINASE 2 (MAST2)</u>	35
2.1. <i>Organisation structurale de MAST2</i>	36
2.2. <i>Le domaine de fonction inconnue (DUF1908)</i>	37
2.3. <i>Le domaine kinase</i>	38
2.3.1. Le domaine catalytique des kinases AGC.....	41
2.4. <i>Les domaines PDZ</i>	48
2.4.1. Structure.....	48
2.4.2. Mode d'interaction des domaines PDZ.....	49
2.4.3. Régulation de l'interaction des domaines PDZ.....	54
2.4.4. Les partenaires cellulaires de MAST2-PDZ.....	59
2.5. <i>La fonction cellulaire de MAST2</i>	66
2.6 <i>Prémisse d'une histoire d'un ménage à trois</i>	66
CHAPITRE 3.....	69
<u>PHOSPHATASE AND TENSIN HOMOLOG DELETING ON CHROMOSOME TEN (PTEN)</u>	69
3.1. <i>Délimitation des domaines de PTEN</i>	70
3.1.1. Le domaine Phosphatase.....	71
3.1.2. Le domaine C2.....	80
3.1.3 La partie N-terminal : effecteur allostérique?.....	83

3.1.4. La partie C-terminale : une combinaison d'acides aminés riche en informations	84
3.2. La régulation de PTEN.....	86
3.2.1. Le contrôle de la transcription du gène	87
3.2.2. Les partenaires cellulaires	89
3.2.3. Les modifications Post-traductionnelles.....	91
3.3. Fonctions cellulaires de PTEN.....	100
3.3.1. Fonctions cellulaires « catalytique-dépendantes »	100
3.3.2. Fonctions cellulaires « catalytique-indépendantes »	101
3.4. Pathogénie neurologique associée à PTEN	102
3.4.1. Aspects cliniques	103
3.4.2. Enjeux thérapeutiques liés à PTEN	106
PROBLÉMATIQUES	109
RÉSULTATS	111
RÉSULTATS 1	113
« L'INTERACTION DE MAST2 AVEC LA GLYCOPROTÉINE G DÉCLENCHE LA SURVIE DE NEUROBLASTOMES INFECTÉS PAR LE VIRUS DE LA RAGE ET S'ACCOMPAGNE D'UNE RELOCALISATION CELLULAIRE DE PTEN »	113
Résumé.....	113
1.1. Article : Terrien et al.....	115
1.2. Commentaires.....	155
1.3. Résultats complémentaires/Perspectives : Mécanisme moléculaire de MAST2-PDZ	157
1.3.1. Déduction des constantes « vraies » de dissociation des complexes MAST2-PDZ/peptides	157
1.3.2. Discussion sur le mécanisme moléculaire qui induit la dissociation du dimère de MAST2-PDZ.....	166
1.3.3. Comportement thermodynamique des complexes	168
1.3.4. Protocoles Expérimentaux	171
RÉSULTATS 2	175
« LES ÉTUDES CINÉTIQUES SUR LA PHOSPHORYLATION DE LA QUEUE C-TERMINALE DE PTEN RÉVÈLENT DEUX CASCADES INDÉPENDANTES QUI SUIVENT UN ORDRE SÉQUENTIEL SELON UN MÉCANISME DISTRIBUTIF. »	175
Résumé.....	175
2.1. Article Cordier et al	177
2.2. Perspectives	203
2.2.1. Cinétique de phosphorylation de PTEN-Cter <i>in vitro</i> (suite)	203
2.2.2. Cinétique de phosphorylation de PTEN-Cter dans les extraits de neurones (suite).....	204
2.2.3. Étude de la phosphorylation de PTEN-Cter <i>in cellulo</i>	204
2.2.4. Production et tests d'activités <i>in vitro</i> de la kinase MAST2.....	206
2.2.5. Étude par RMN de la conformation ouverte/fermée de PTEN en fonction de la phosphorylation de PTEN-Cter.....	208
RÉSULTATS 3 : APPLICATIONS.....	211

« DÉVELOPPEMENT DE PEPTIDES PRO-SURVIE »	211
Résumé	211
3.1. Résultats	213
3.1.1. Stratégie d'optimisation des séquences à partir de la structure des complexes de MAST2-PDZ	214
3.1.2. Mesure des constantes d'affinité	219
3.1.3. Preuve de concept	223
3.2. Discussion & perspectives	225
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES	229
ANNEXE 1	235
ANNEXE 2	241
RÉFÉRENCES	262

Introduction

Chapitre 1

Le virus de la rage

La rage est une encéphalomyélite mortelle affectant l'homme et la quasi-totalité des mammifères. Les principaux vecteurs connus sont les chiens, chats, renards, mangoustes, loups, chacals, mouffettes, rats laveurs et plusieurs variétés de chauves-souris insectivores, frugivores, piscivores ou encore les chauves-souris vampires qui se nourrissent du sang des animaux qu'elles mordent. La trace des premiers témoignages de rage canine remonte à l'époque Sumérienne, 2000 av. J.-C. À l'Antiquité, de nombreux écrivains (Juvenal, Virgile, Ovide...) décrivent dans leurs textes cette maladie contre laquelle la médecine est impuissante. Démocrite (IV-V^e siècles av. J.-C.) nomme la rage, « *incendie des nerfs* ». Cette phrase prend tout son sens avec nos connaissances actuelles que nous détaillerons plus bas et illustre les qualités d'observation des Anciens puisqu'il faudra attendre le XIX^e siècle, avec Louis Pasteur pour mettre en évidence la présence du virus dans le cerveau des mammifères infectés. C'est bien plus tard, avec le développement des techniques de cultures cellulaires *in vitro* que sera mis en avant le neurotropisme du virus.

L'ignorance sur l'origine de cette maladie, le comportement anormal et impressionnant de l'hôte infecté (spasme, paralysie partielle, vomissement, salivement excessif, hydrophobie, agressivité, anxiété, etc.) et son issue toujours fatale ouvrirent la voie à de nombreuses croyances et au recours à de remèdes étranges. Par exemple, au XVIII^e à Pluvigner (Morbihan), une fontaine aurait eu le pouvoir de protéger les animaux de la rage venant s'y abreuver (5). Il faudra attendre le XIX^e siècle pour comprendre le caractère infectieux de la maladie et mettre en place un traitement prophylactique de la rage. En 1802, George Zinke montre que le virus de la rage se transmet par la salive. C'est ensuite, grâce aux travaux précurseurs du vétérinaire Pierre Victor Galtier en 1879, et à ses propres travaux, que Louis Pasteur développe et teste pour la première fois en 1885 un vaccin efficace sur l'homme. Une large campagne de vaccination des chiens domestiques en 1918, qui représentent alors à cette époque le principal vecteur,

sera engagée en France. Pendant cinquante ans, aucun cas de rage ne sera enregistré en France jusqu'en mars 1968 qui verra le début d'une nouvelle vague de contamination dans l'Est et le Nord de la France. Le vecteur n'est plus domestique (chien) mais sauvage (renard). La France met alors en place une large campagne pour éradiquer la rage. Le premier réflexe, pour contenir le front de migration de la rage est de diminuer la population des renards en les tuant. En dix-sept ans, presque 1 million de renards seront tués, pour 30 510 cas de rage diagnostiqués. Devant l'inefficacité de cette mesure, l'État français rend la vaccination antirabique des animaux domestiques obligatoire et mène une large campagne de vaccination orale des principaux réservoirs. Grâce à ces efforts conjugués, la France est déclarée libre de rage en 2005. De nos jours, la rage ne représente plus aucune menace en Europe de l'Ouest mais reste un large problème de santé publique à l'ouest de l'Oural, ainsi qu'en Asie et Afrique qui représentent 95% des cas de rage dans le monde (Fig.1). On estime encore de 55 000 à 70 000 le nombre de morts par an et à 7 million le nombre de personnes qui sont vaccinées après une exposition présumée au virus de la rage (6).

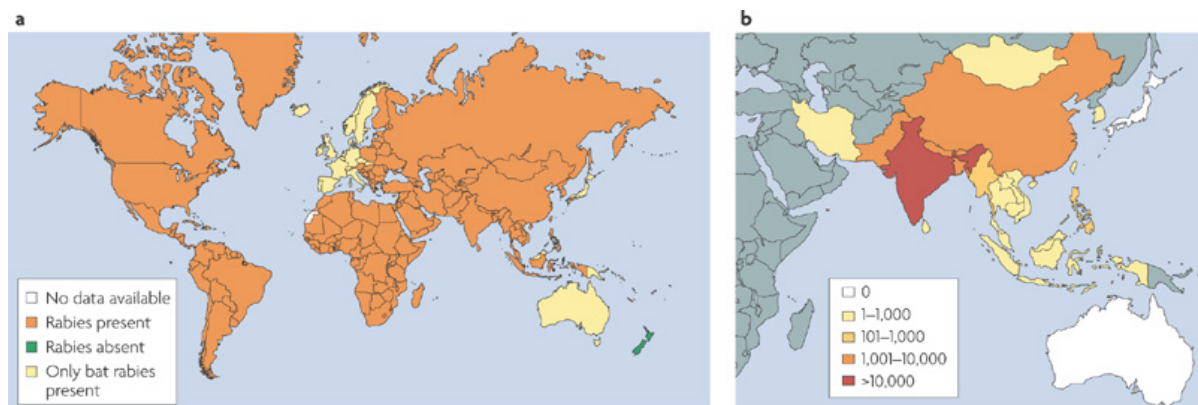


Figure 1 : Répartition mondiale du virus de la rage. (a) La distribution du virus de la rage en 2007 est indiquée en orange. La distribution du virus de la rage et les autres membres du genre *Lyssavirus* est représentée en jaune. Le seul pays connu sans lyssavirus est la Nouvelle-Zélande (en vert). (b) Nombre de décès humains dus à la rage en 2004 dans le Sud-Est asiatique.

1.1. Classification

Le virus de la rage (RABV) est typiquement une espèce prototype du genre des *lyssavirus* (dont le nom vient du mot grec « *lyssa* » signifiant rage, folie) classée dans la famille des *Rhabdoviridae* (dont le nom dérive aussi du mot grec *Rhabdos* qui signifie bâtonnet). La famille des *Rhabdoviridae* forme avec les *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* et *Rhabdoviridae* l'ordre des *Mononegavirales* (Fig.2)

qui se caractérise par un simple brin d'ARN non-segmenté de 12 kilobases, de polarité négative, complémentaire de l'ARN messager (7), une enveloppe lipidique, une nucléocapside de structure hélicoïdale, une ARN polymérase-ARN dépendante, un ordre identique des gènes, un promoteur en position 3' de l'ARN génomique. Cette morphologie est retrouvée chez le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) qui est le prototype du genre *Vesiculovirus* (6) et qui a servi de modèle pour la famille des *Rhabdoviridae* avec de nombreuses études structurales sur le virion et de ses constituants.

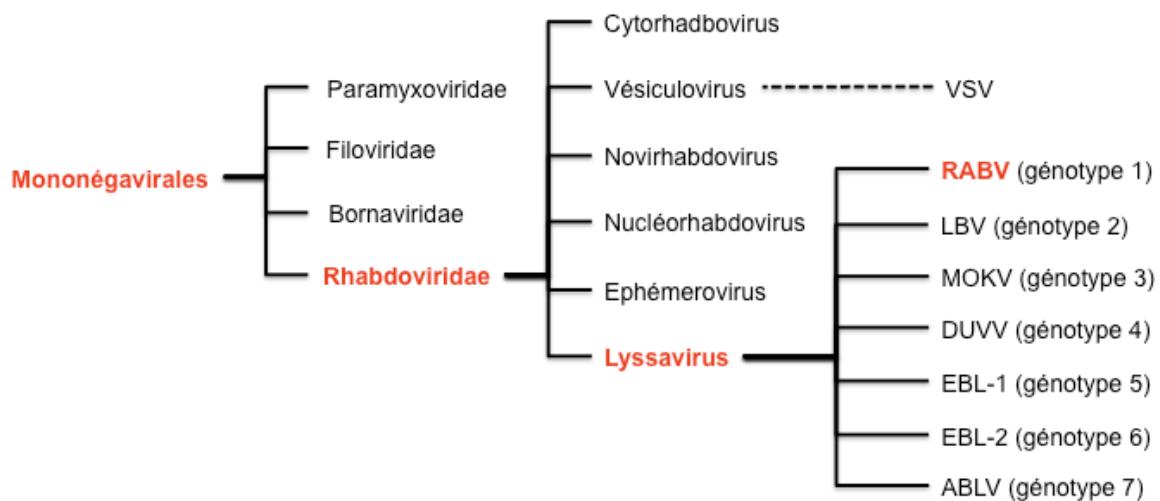


Figure 2 : Arbre phylogénétique du virus de la rage

Les lyssavirus se décomposent en 7 génotypes. RABV appartient au génotype 1, alors que le virus « Lagos Bat » (LBV) appartient au génotype 2, le virus Mokola (MOKV) au génotype 3, le virus Duvenhage (DUVV) au génotype 4, le virus « European bat lyssavirus type 1 » (EBL-1) au génotype 5, le virus « European bat lyssavirus type 2 » (EBL-2) au génotype 6 et le virus « Australian bat lyssavirus » (ABLV) au génotype 7 (Fig.2).

1.2. Propriétés du virus de la rage

1.2.1. Organisation du virus de la rage

Le virus de la rage est un virus enveloppé qui a une apparence caractéristique en bâtonnet ou en balle de fusil avec une forme conique à une extrémité et une forme plan de l'autre (Fig.3 A). La particule mesure entre 130 et 300nm de long avec un diamètre de 60 à 80nm. Son génome code pour cinq

protéines (N, L, P, M et G) (Fig.3). La glycoprotéine G est composée d'un large ectodomaine, d'un segment transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique.

L'ARN viral, associé à la nucléoprotéine N (1300 N/virion), à la polymérase L (70 L/virion), ainsi qu'à la phosphoprotéine P (700 P/virion), forme le complexe ribonucléoprotéique (RNP) structuré suivant une symétrie hélicoïdale (Fig.3 D et E). Le complexe RNP est compacté par la protéine matrice M (1200 M/virion) qui s'associe avec la protéine N et la partie cytoplasmique de la glycoprotéine virale membranaire G (Fig.3 C). L'ectodomaine de la glycoprotéine G s'associe en trimère pour former des spicules (Fig.3 B) à la surface de l'enveloppe virale lipidique (450 spicules/virion). Les caractéristiques structurales du virus de la rage sont schématisées dans la figure.3 E.

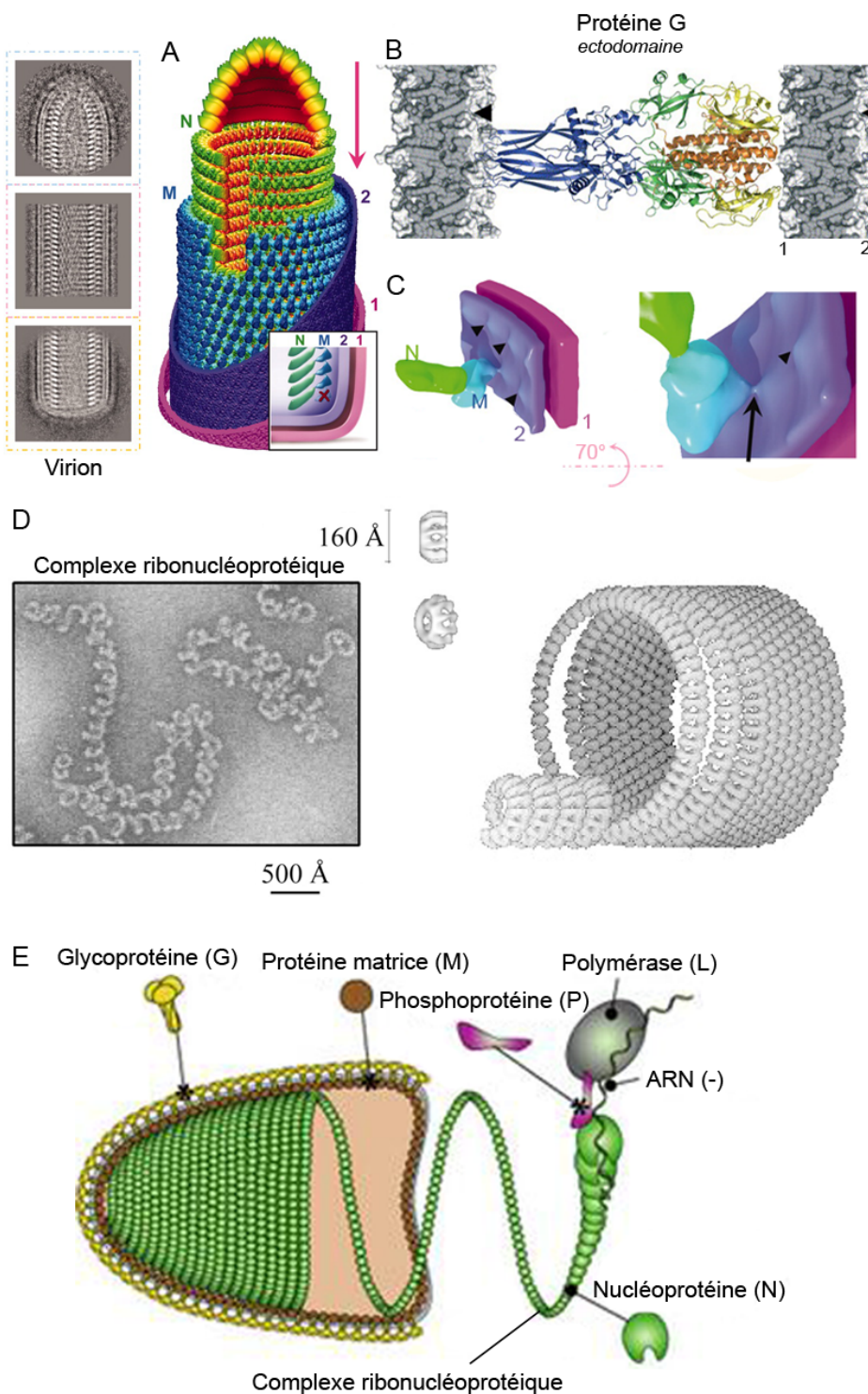


Figure 3: Structure du virion (A) Plan 2D de la pointe conique, du tronc et de la base du virion VSV et modèle créé à partir des clichés de cryomicroscopie électronique (cryo-EM). N est en vert, M en bleu, (1) représente le feuillet de la membrane interne (en violet) et (2) externe (en rose). (B) Représentation de la structure de l'ectodomaine de la glycoprotéine G de VSV dans une conformation post-fusion et positionnée par rapport à la bicouche lipidique. La position des points ancrages membranaires à la pointe de la structure allongée est indiquée par une flèche noire (peptide fusion). (C) Représentation de la structure obtenue par cryo-EM qui montre la fixation de la queue cytoplasmique de la glycoprotéine G avec la protéine M (bleu clair) indiquée par une flèche. (D, panneau gauche) image EM du complexe RP. (D, panneau droit) vue de côté de la nucléoprotéine polymérisée en forme de rosette (à gauche) et du complexe RNP issue de la production de virus rabique (à droite). (E) Schéma récapitulatif de la structure du virus de la rage : la glycoprotéine est représentée en jaune, la protéine matrice en marron, la phosphoprotéine en violet, la polymérase en gris, la nucléoprotéine en vert. Adapté à partir de Ge *et al* (2010) (8), Weissenhorn *et al* (2007) (9), Schoehn *et al* (2001) (10).

téine en violet, la polymérase en gris, la nucléoprotéine en vert. Adapté à partir de Ge *et al* (2010) (8), Weissenhorn *et al* (2007) (9), Schoehn *et al* (2001) (10).

1.2.2. Le cycle de réplication du virus de la rage

Le virus de la rage a une affinité particulière (mais non exclusive) pour les cellules du système nerveux de l'hôte. En 1881, Louis Pasteur fut le premier à démontrer le rôle important du système nerveux central (SNC) dans l'infection rabique. Dans la majorité des cas, l'infection est transmise *via* la salive après une morsure d'un animal infecté (Fig.4). Les virions se retrouvent alors directement en contact avec les terminaisons nerveuses. Le virus de la rage se dissémine ensuite de neurone en neurone dans la moelle épinière pour rejoindre le tronc cérébral, puis les glandes salivaires de l'hôte à partir desquelles le virus sera excrété dans la salive.

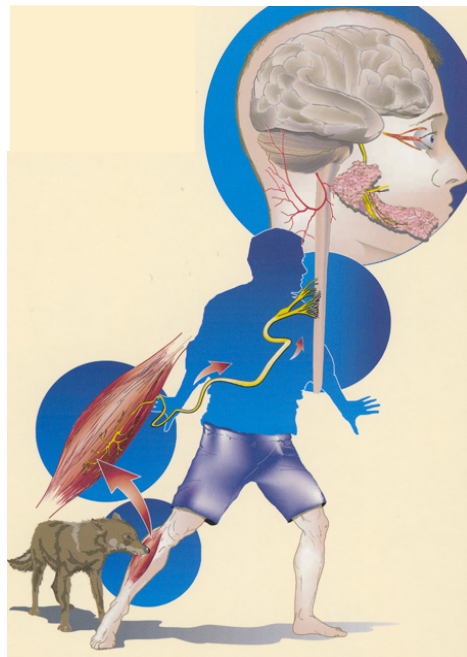


Figure 4: Propagation du virus de la rage. Après une morsure par un animal infecté, le virus de la rage emprunte le système nerveux de l'hôte pour rejoindre le cerveau et les glandes salivaires. D'après Rabies Eds A.C. Jackson and W.H. Wunner (2002).

Le cycle viral de RABV :

(i) Le cycle débute par l'adhésion du virus aux récepteurs cellulaires par l'intermédiaire d'une reconnaissance spécifique de la glycoprotéine virale. Les récepteurs du virus de la rage sont les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine- α 1 (nAchR) (11), les récepteurs pour les molécules d'adhésion des cellules neuronales (NCAM) (12) et les récepteurs de faible affinité des facteurs de croissance nerveuse (p75NTR) (13). (ii) Le virus est ensuite internalisé par endocytose. (iii) Les vésicules

contenant les particules sont entraînées par transport rétrogrades¹ de l'axone jusqu'au corps cellulaire du neurone (Fig.5 A et B). La diminution du pH dans le compartiment endosomal provoque un important changement de conformation de l'ectodomaine de la glycoprotéine qui provoque la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome et libère de ce fait la RNP dans le cytoplasme. (iv) La polymérase virale (L) en complexe avec la phosphoprotéine virale (P), sous-unité non catalytique, amorce la synthèse d'un ARN « leader » de 55-58bp à partir de l'ARN(-) en 3', suivie de la synthèse en 5' de l'ARNm coiffé et polyadénylé qui code pour les 5 protéines virales (N, P, M, G et L) et qui seront traduites par la machinerie du neurone. Par un mécanisme qui n'est pas complètement décrypté (probablement dû à la concentration intracellulaire de protéine N et M qui participent à la régulation de la transcription et de la réplication), le complexe L et P interrompt la transcription et initie la réplication de l'ARN(-) à partir de l'ARNm (14-16). L'ARN(-) nouvellement synthétisé s'associe alors aux protéines N, P et L pour former un nouveau complexe RNP (v) Le complexe RNP migre, par un mécanisme inconnu, vers la membrane plasmique, est compacté par la protéine matrice M (indispensable pour le bourgeonnement) et interagissent avec la partie cytoplasmique de glycoprotéine G qui augmente l'efficacité de bourgeonnement (17). Les nouvelles particules virales créées peuvent alors infecter la cellule voisine et amorcer un nouveau cycle (Fig.5 C).

¹ Les cellules neuronales possèdent des prolongements du corps cellulaire appelés neurites (dendrites, axones) (Fig.5 A). Il est suggéré que nAChR concentre le virus de la rage à la jonction neuromusculaire ou au bouton synaptique, permettant une infection plus efficace des neurones. D'autres recherches suggèrent que la réplication du virus de la rage commence dans les cellules musculaires, ce qui indique que nAChR pourrait être utilisé pour infecter les cellules musculaires. Deux mécanismes différents ont été proposés pour le transport du virus de la rage de l'axone au corps cellulaire: soit le transport de la capsid du virus (2), soit le virion entier avec la vésicule (1). Les évidences expérimentales seraient plutôt en faveur du modèle 1 (Klungen *et al*).

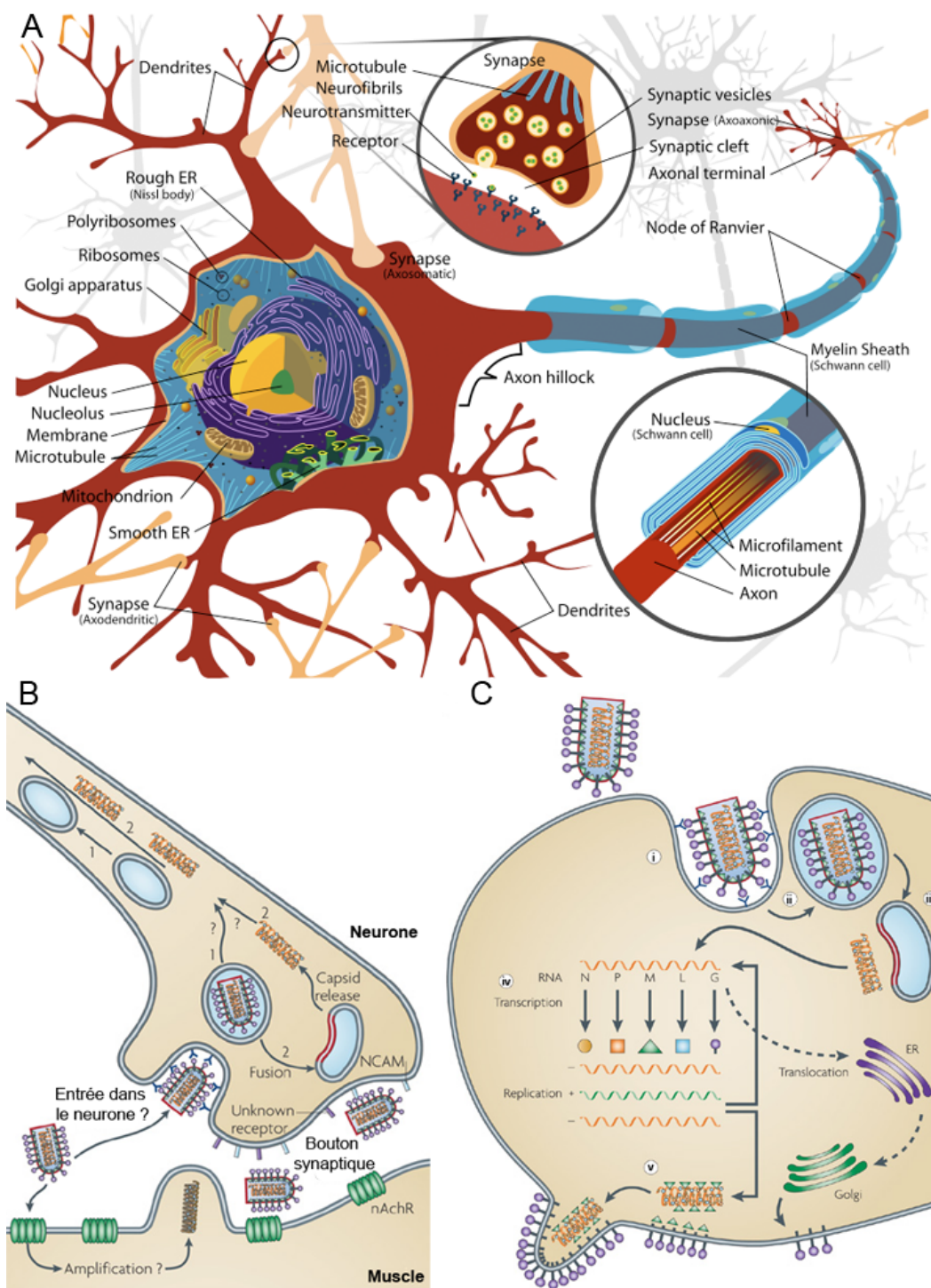


Figure 5: Architecture du neurone (A) Schéma d'un motoneurone dont l'axone est myélinisé. (B) Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) est situé à la membrane musculaire postsynaptique. Dans les deux cas, le virus pénètre dans la cellule en utilisant des molécules d'adhésion cellulaire neurale (NCAM) ou un autre récepteur putatif (p75^{NTR}). (C) Représentation simplifiée d'un cycle de réplication du virus de la rage dans une cellule infectée. ER, réticulum endoplasmique. D'après Schnell *et al* (2010) (6).

1.3. Pathogénicité du virus

« *Un être de raison* ». Cette expression anthropomorphique, empruntée à Emile Roux (1881) pour décrire la rage, est particulièrement adaptée pour introduire et illustrer comment le virus assure sa multiplication en déjouant les mécanismes de l'hôte qu'il infecte. En effet, le virus ne détruit pas le système nerveux (SN) dans lequel il évolue. Une fois le virus entré dans le SN, sa progression n'est interrompue ni par la destruction du neurone infecté, ni par la réponse immunitaire de l'hôte, qui constituent les deux principaux remparts de la cellule face à une infection virale. Ainsi, nous développerons dans ce paragraphe les deux stratégies qu'adopte le virus pour échapper au mécanisme de défense de l'hôte : (i) Le virus de la rage détourne la réponse immunitaire de l'hôte (18) et (ii) le virus de la rage préserve l'intégrité des cellules qu'il infecte.

1.3.1. Le virus de la rage échappe aux systèmes de défense de l'hôte

Lors d'une infection par le virus de la rage, les lymphocytes T activés, exprimés en périphérie du SN, passent la barrière hémato-encéphalique (19). Cependant, les analyses *in vivo* n'indiquent aucune activité protectrice des lymphocytes T dans le SN infecté par le virus de la rage suggérant un environnement défavorable pour la survie des lymphocytes T. En effet, la fixation de l'ARN double brin virale de la rage sur RIG-1 induit, dans les temps précoces de l'infection de la cellule, la production d'interférons (IFNs) de type 1 ($-\alpha$ et $-\beta$) et de cytokines inflammatoires (20-22) qui conduit à l'expression de molécules dites « immuno-subversives » (B7-H1, HLA-G) à la surface des cellules infectées. La reconnaissance de ces molécules par les récepteurs des lymphocytes T cytotoxiques venus envahir le SN provoque alors leur entrée en apoptose (23-25) et empêche, de ce fait, d'éliminer les cellules infectées par le virus de la rage. Ainsi, l'induction de l'expression des IFNs constitue un net avantage pour la pathogénicité du virus de la rage mais, paradoxalement, les IFNs possèdent aussi une activité antivirale qui inhibe la réplication du virus. Par l'intermédiaire de la phosphoprotéine P, le virus inhibe, dans des temps plus tardifs, l'expression d'IFNs de type 1 et 2.

Ainsi, dans un premier temps, l'induction de la production d'IFNs empêche les lymphocytes T cytotoxiques d'éliminer les cellules infectées par le virus de la rage et

dans un deuxième temps, l'inhibition de la production d'IFNs 1 et 2 par les différentes isoformes de la phosphoprotéine P favorise la réplication du virus.

1.3.2. Contrôle de survie et de la mort de cellules neuronales infectées par le virus de la rage

Maintien de l'intégrité neuronale

La rétractation des neurites est un moyen de défense pour ralentir la progression de l'infection et diminuer la pathogénicité du virus. Il a en effet été démontré que la pathogénicité du virus de la rage est positivement corrélée avec la capacité des neurones à se régénérer (26). Ainsi, le maintien de l'intégrité du réseau neuronal est un facteur essentiel pour la prolifération du virus jusqu'au SNC. De plus, il a été mis en évidence que la partie cytoplasmique du virus de la rage induit la survie des neuroblastomes humains² infectés en observant différents marqueurs des voies de survie (phosphorylation de la kinase AKT, croissance des neurites et une résistance au stress oxydatif) (27) à partir d'une souche virulente CVS (Challenge Virus Standard)-NIV³ du virus de la rage qui est fortement neurotrophe et provoque des encéphalomyélites fatales chez la souris.

Échappement au mécanisme apoptotique

L'induction de l'apoptose est délétère pour la propagation du virus dans le système nerveux rompant la chaîne cellulaire de propagation (2, 28). Les protéines N et P du virus de la rage séquestrent le récepteur Toll-like 3 (TLR3) (29). Cet amas de protéines dans le cytoplasme des neurones constitue les corps de négri (3-5µm) qui sont caractéristiques d'une infection par le virus de la rage. Il est proposé que la séquestration de TLR3 inhibe ses fonctions pro-apoptotiques (30) et activatrices de la rétractation des neurites (31).

L'induction de l'apoptose dans les neurones infectés *in vivo* par des souches virulentes du virus de la rage est un événement rare (32). Cependant, la souche atténuée ERA (Evelyn Rotkitniki Abelseth)-NIV qui a été utilisée comme vaccin dans les années 80 provoque la mort des cellules infectées. En effet, cette souche, qui a perdu son neurotropisme, induit *in vitro* l'apoptose des cellules infectées

² Tumeur solide extra crânienne la plus fréquente chez les jeunes enfants

³ Souche provenant du laboratoire de Neuro-Immunologie Virale (NIV).

(lymphocytes et neuroblastomes) (2, 28). La substitution d'un Gln en Glu sur le site de fixation au domaine PDZ est suffisante pour interagir avec le domaine PDZ de PTPN4 et induire l'apoptose de la cellule infectée. Ainsi, l'efficacité du vaccin issu de la souche ERA est probablement liée à la forte propension du virus à induire rapidement l'apoptose des cellules infectées.

La voie de survie de la protéine AKT

La survie neuronale est contrôlée par différentes cascades de signalisation dont l'une d'entre elles est la voie AKT. L'activité d'AKT est contrôlée en amont par la voie de la kinase PI3K (Fig.6). Dans une cellule saine, la phosphorylation d'AKT est finement régulée par des protéines agonistes et antagonistes de la voie de survie telle que la phosphatase PTEN (33). Sous une forme activée (phosphorylée), AKT induit l'activation de nombreuses voies pro-survie telles que la prolifération cellulaire, la survie, le métabolisme, la synthèse de protéine... (Fig.6). La quantification de la protéine AKT phosphorylée dans les cellules est un marqueur couramment utilisé pour mettre en avant la survie cellulaire.

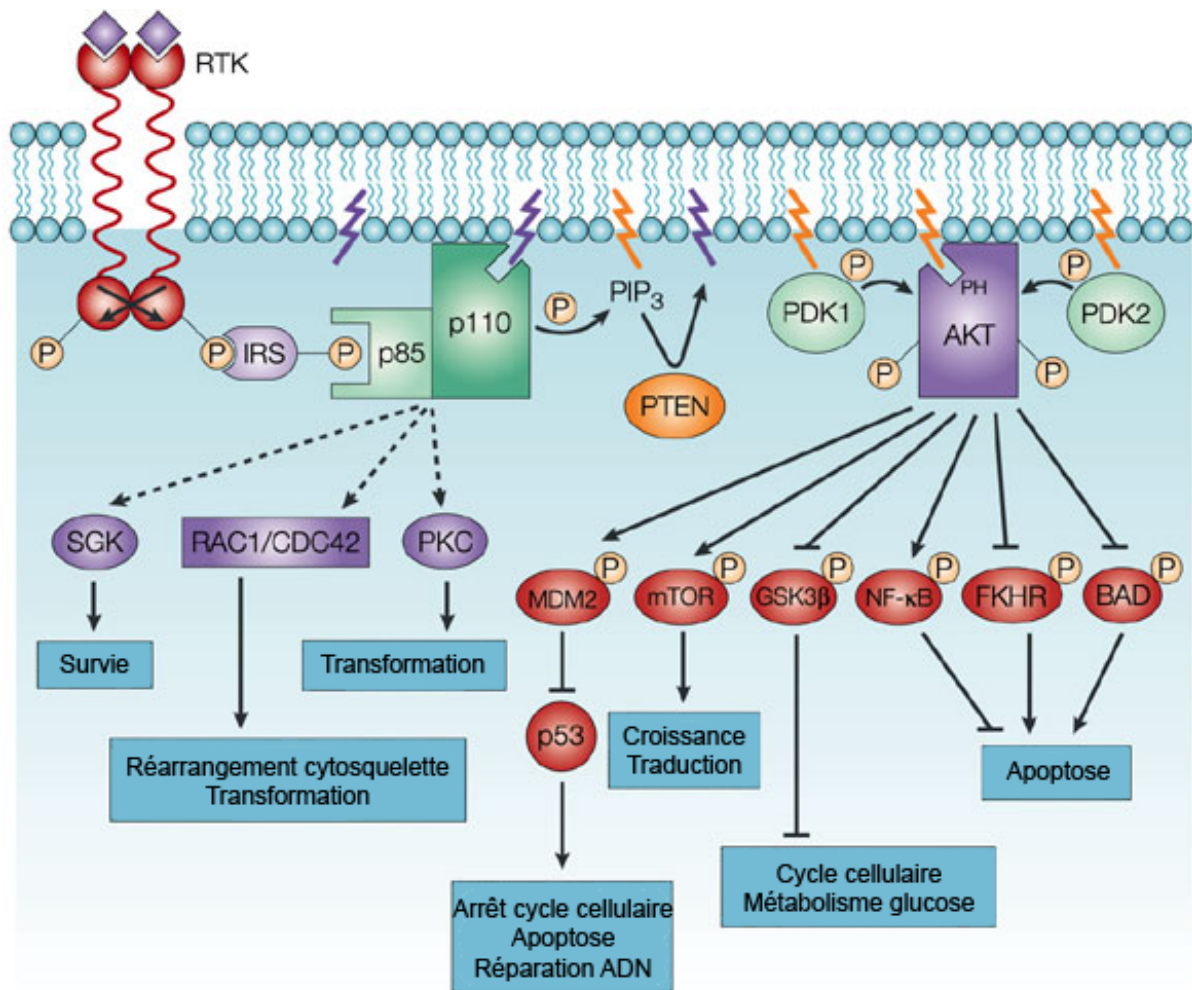


Figure 6 : Voies de régulation contrôlées par PTEN. L'activation de la classe IA phosphatidylinositol 3-kinase (PI3Ks) survient grâce à la stimulation des récepteurs tyrosine kinases (RTK) et à l'assemblage du complexe avec les récepteurs et PI3K. Ces complexes sont localisés à la membrane où la sous-unité p110 de PI3K catalyse la conversion de PtdIns (4,5)P₂ (PIP₂) en PtdIns (3,4,5)P₃ (PIP₃). PIP₃ sert de second messenger pour l'activation d'AKT. La phosphorylation d'AKT induit l'activation et l'inhibition de plusieurs cibles, conduisant à la croissance, à la survie et à la prolifération cellulaires à travers divers mécanismes. GSK3- β , glycogène synthase kinase-3-beta; NF- κ B, Nuclear Factor kappa B; PDK1/2, Protéine kinase 3-phosphoinositide-dépendante 1/2. D'après Vivanco (2002) (34).

La croissance des neurites

La forme caractéristique des neurones et plus particulièrement la formation des neurites sont conditionnées par le cytosquelette qui est constitué par les microtubules, les microfilaments et les neurofilaments. La formation du cytosquelette est un mécanisme dynamique. En fonction de l'environnement cellulaire, de nombreux éléments participent continuellement à la rétractation et à l'élongation des neurites par l'intermédiaire du cytosquelette. Ces prolongements cellulaires constituent des éléments importants pour la transmission d'informations aux autres cellules *via* les synapses (Fig.5 A). De nombreuses maladies neurodégénératives

sont liées à l'incapacité de la cellule à induire l'élongation ou à régénérer les neurites (35). Récemment, une importante étude sur l'implication du kinome neuronale a permis d'identifier les kinases impliquées dans le contrôle de la longueur des neurites. Les gènes de 750 kinases ont été éteints individuellement dans des neuroblastomes. La contribution de chaque kinase pour la formation de neurites a ensuite été analysée en mesurant la longueur des neurites avant et après différenciation (Fig.7 A et B). Deux groupes de kinases qui participent significativement à la rétractation et à l'élongation des neurites ont été identifiés.

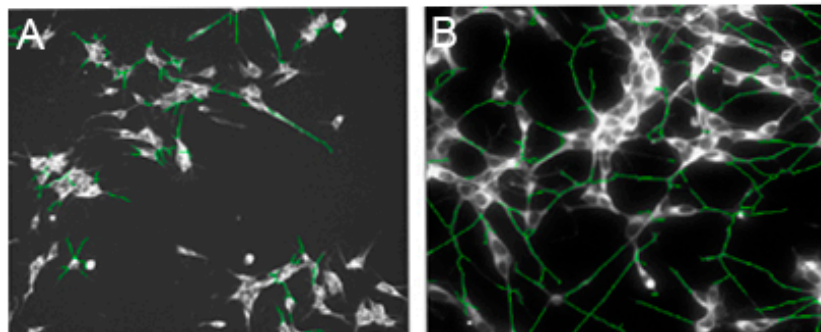


Figure 7 : Clichés de cellules neuronales par microscopie. (A) Cellules SH SY-5Y dont le gène est éteint non-différenciées (B) ou différenciées fixées après 48h et marquées avec un anticorps spécifique de la β tubuline (présent uniquement dans les neurones matures). D'après Loh *et al* (2008) (36).

La résistance au stress oxydatif

Dans certaines conditions physiologiques, des réactions produisent des radicaux libres (O_2^-) hautement réactifs. Ces radicaux libres produisent à leur tour des espèces réactives à l'oxygène (ROS) à partir d'une réaction en chaîne dont l'intermédiaire principal est l'eau oxygénée (H_2O_2). Ces molécules sont nocives pour les organismes vivants, détériorent une partie des constituants cellulaires majeurs et induisent au moins deux voies pro-apoptotiques clairement identifiées : NF- κ B et ERK1/2 (Fig.8). L'ajout de H_2O_2 sur les cellules permet de tester leur sensibilité au stress oxydatif.

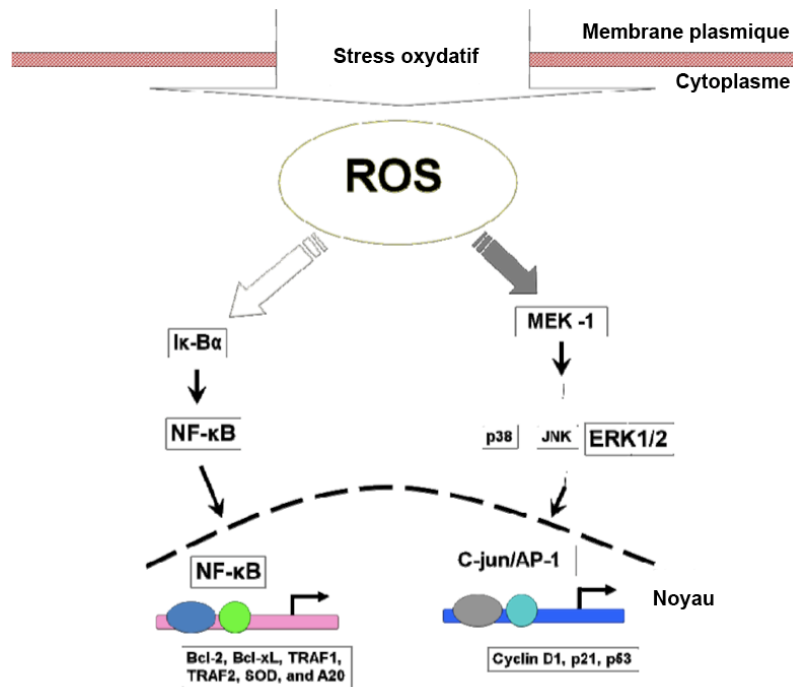


Figure 8: Activation des voies de signalisation (NF-κB et ERK1/2) par l'intermédiaire d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). D'après Dayem *et al* (2010).

1.3.3. La glycoprotéine G facteur de virulence

La pathogénicité du virus de la rage est multigénique mais la glycoprotéine G y contribue majoritairement (37). La glycoprotéine est composée de 524 acides aminés et forme un trimère à la surface de l'enveloppe virale. Son large ectodomaine assure de nombreuses fonctions dans le cycle viral. Il permet, en autres, la reconnaissance des récepteurs cellulaires et catalyse la fusion membranaire. Son unique segment transmembranaire, maintient sa localisation cellulaire. Le court domaine cytoplasmique de 44 acides aminés participe à l'assemblage et au bourgeonnement du virion. Cette séquence possède aussi en C-terminal un site de fixation au domaine PDZ (cet acronyme provient de la découverte des trois premières protéines contenant ce domaine d'interaction : **P**ostsynaptic density-95 (38) / **D**isc large (39) / **Z**onula occludens-1 (40). Les domaines PDZ, que nous développerons dans le second chapitre, sont impliqués principalement dans les voies de signalisation (41) et l'architecture de la cellule (42).

La séquence codant la glycoprotéine G de la souche vaccinale SADB19 a été remplacée, avec une technique de génétique reverse, par le gène qui code la glycoprotéine G issue d'autres souches rabiques (pathogène et vaccinale). Cette

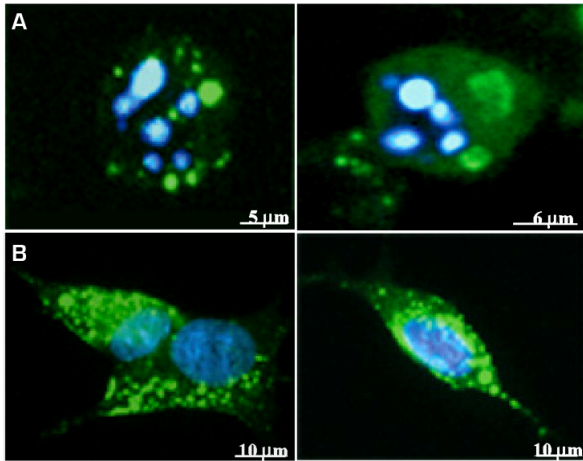


Figure 10: Neuroblastomes infectés par les souches RABV-CVS-NIV et RABV-ERA-NIV. Clichés de microscopie UV. Le colorant Hoescht permet de visualiser les noyaux des cellules SK-NS-H (bleu). La nucléocapside est révélée par des anticorps spécifiques (vert). La fragmentation du noyau est caractéristique de l'apoptose observée dans les cellules infectées par rRABV-ATT (A) mais est absente lors de l'infection par rRABV-VIR (B). D'après Préhaud *et al* (2003) (2).

La souche rRABV-VIR n'induit pas l'apoptose des cellules infectées, mais au contraire stimule l'expression des marqueurs de survie que nous avons énumérés plus haut (Fig.6). Afin de préciser la ou les mutations de la glycoprotéine G responsables de ces phénotypes, des protéines G chimériques ont été produites avec les séquences issues des souches virulente et atténuée (Fig.11 A). Ces études indiquent que la partie cytoplasmique est responsable des phénotypes de mort ou de survie de la cellule infectée (Fig.11 B). Plus particulièrement, (i) le site de fixation au domaine PDZ est nécessaire pour induire le phénotype de mort ou de survie (Fig.11 C). En effet, lorsque celui-ci est supprimé, il n'y a plus ni apoptose ni survie cellulaire induite par la souche recombinante. (ii) La mutation d'un glutamate (Glu) *versus* une glutamine (Gln) est suffisante pour faire basculer le phénotype de mort vers la survie (Fig.11 D).



Figure 11 : Déterminants responsables de l'induction de l'apoptose lors de l'infection de neuroblastomes par des virus recombinants de la rage. (A) La glycoprotéine de la souche CVS (rouge) induit la survie des cellules infectées. (B) L'échange des domaines cytoplasmiques des glycoprotéines provoque une inversion des phénotypes. (C) La suppression des quatre acides aminés qui forment un site de fixation au domaine PDZ conduit à l'absence d'apoptose ou de survie des cellules infectées. D'après Préhaud *et al* (2010) (27).

Ainsi pour la première fois, le laboratoire de Monique Lafon a non seulement démontré que cette courte séquence est essentielle à l'induction de la survie ou de l'apoptose des neuroblastomes infectés mais a surtout mis en évidence la présence d'un motif de fixation au domaine PDZ en C-terminal de la partie cytoplasmique de la glycoprotéine G rabique.

1.3.4. Identification des partenaires cellulaires de la glycoprotéine G

Après avoir montré le rôle essentiel de la partie cytoplasmique et notamment le site de fixation au domaine PDZ dans le déclenchement des phénotypes de mort et de survie, il était alors fondamental d'identifier les partenaires cellulaires de la glycoprotéine G pour avancer dans la compréhension des mécanismes de survie et de mort. Les domaines cytoplasmiques des souches virulente (CytoG-VIR) et atténuée (CytoG-ATT) ont alors été utilisés comme appâts dans des expériences de double hybride chez la levure (*Hybrigenics*). Le criblage à haut débit s'est fait sur une banque d'ADN complémentaires de cerveau adulte humain (Fig.12).




		Partenaires				
Appâts		PTPN4	hDLG2	MUPP1	MAST1	MAST2
	CytoG-VIR	-	-	-	+	++
	CytoG-ATT	++	+	+	+	+
	CytoG-Δ	-	-	-	-	-

Figure 12 : Recherche des partenaires de la glycoprotéine par double hybride. Le criblage a été effectué sur une banque d'ADN complémentaires de cerveau humain avec les domaines cytoplasmiques (44 acides aminés) des glycoprotéines virales ERA et CVS comme appât. Seules des séquences correspondantes aux domaines PDZ de kinases de la famille MAST (Microtubule Associated Serine Threonine Kinase) ont été pêchées par le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine de la souche CVS. Le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine de mort de la souche ERA interagit en plus avec d'autres partenaires : le domaine PDZ-7 de MUPP1, le domaine PDZ-1 de hDLG2 et l'unique domaine PDZ de la phosphatase PTPN4. Aucun partenaire neuronal n'a été identifié lorsque le domaine cytoplasmique tronqué de son site de fixation aux domaines PDZ est utilisé comme appât. D'après Préhaud *et al* (2010) (27).

D'après ces expériences, nous observons que : (i) toutes les séquences identifiées dans ces cribles contiennent un domaine PDZ. (ii) aucune protéine neuronale n'est identifiée en absence du site de liaison au domaine PDZ de la partie cytoplasmique. (iii) CytoG-VIR interagit uniquement avec des protéines de la famille des Microtubule Associated Serine/Threonine kinases (MAST1 et MAST2) alors que

CytoG-ATT possède un spectre d'interaction plus large en interagissant en plus avec PTPN4, hDLG2 et MUPP1⁴. Cette relaxation de spécificité est le facteur déterminant responsable de l'induction de l'apoptose *via* la phosphatase PTPN4, protéine qui possède une activité anti-apoptotique (27). En interagissant avec la glycoprotéine G, l'activité anti-apoptotique de PTPN4 est inhibée conduisant la cellule vers la mort (43). Ce mécanisme moléculaire a été le sujet principal de la thèse de Nicolas Babault (43). Ce sujet est aujourd'hui entre les mains de Pierre Maisonneuve.

Pour cette thèse je me suis focalisé sur les bases moléculaires du mécanisme de survie induit par la glycoprotéine de la souche virulente CVS-NIV qui interagit avec la famille des MAST kinases en m'attachant plus particulièrement à MAST2.

⁴ Putative uncharacterized protein PTPN4; human Disks large homolog 2 hDGL2; Multiple PDZ domain protein 1 MUPP1

Chapitre 2

Microtubule Associated Serine/Threonine kinase 2 (MAST2)

MAST2 est codée par le gène *mast2* situé en position 1p34.1 du chromosome 1 humain. La kinase MAST2 a initialement été associée au microtubule des cellules des testicules et impliquée plus particulièrement dans la formation des manchettes des spermatozoïdes, base essentielle pour la formation du flagelle (44, 45). La zone d'interaction directe avec les microtubules n'a pas été identifiée suggérant une interaction indirecte avec les microtubules par l'intermédiaire d'autres protéines (44). MAST2 compose, avec quatre autres isoformes (MAST1, MAST3, MAST4 et MAST-Like), la famille des kinases MAST (Fig.13). MAST2 est aussi exprimée dans d'autres tissus (46) tels que le cœur, le cerveau, la rate, les poumons, le foie ou encore les muscles squelettique. MAST1 et 2 s'expriment dans l'ensemble des tissus testés par Garland et ses collaborateurs contrairement à MAST3 et 4. MAST-Like (MAST-L) est exprimée majoritairement dans le cœur, les testicules et très faiblement dans les muscles squelettiques.

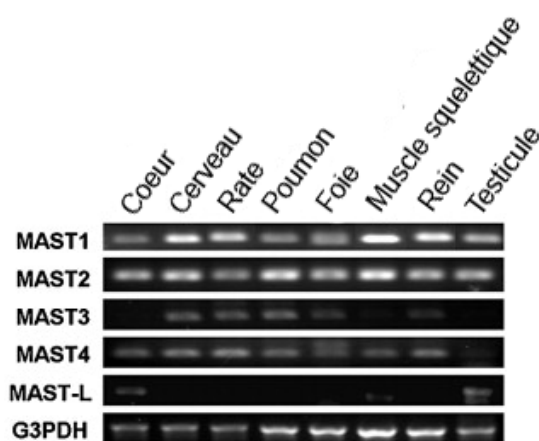


Figure 13 : Expression tissulaire de la famille des kinases MAST. (A) Analyse par RT-PCR de l'expression de la famille MAST dans des tissus de rat. La quantité d'ADNc a été estimée à partir de la Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH), utilisée comme témoin. D'après Garland *et al*, (2008) (46).

Dans le cerveau, l'expression des isoformes MAST1-4 varie selon les zones cérébrales (46). MAST2 est préférentiellement exprimée dans le cerebellum, l'hippocampe et le 3^e ventricule (Fig.14).

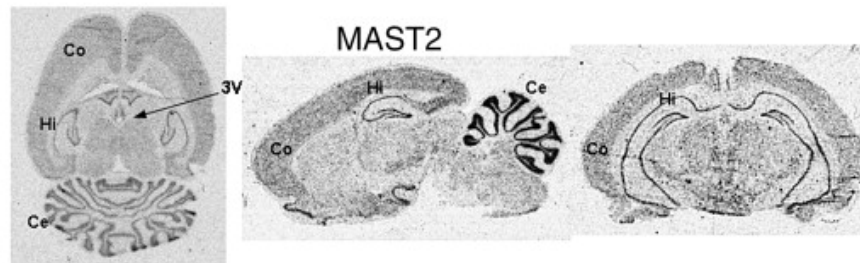


Figure 14 : Expression tissulaire de MAST2 dans un cerveau de rat. Les panneaux montrent des coupes de cerveau de rat coupé en trois orientations – horizontale (à gauche), sagittale (au milieu) et coronale (à droite) – MAST2 a été détectée avec des oligonucléotides spécifiques marqués radioactivement, CO, cortex cérébral; Hi, hippocampe; 3V, 3e ventricule; Ce, cervelet. D'après Garland *et al.*, (2008) (46).

2.1. Organisation structurale de MAST2

La séquence des kinases MAST (1-4) est composée de 3 domaines répertoriés (d'après SMART et Pfam). Un domaine de fonction inconnue en N-terminal, un domaine kinase central et un domaine PDZ situé en C-terminal (Fig.15). L'organisation de MAST-L est différente avec deux domaines kinases aux extrémités N- et C-terminales (Fig.15).

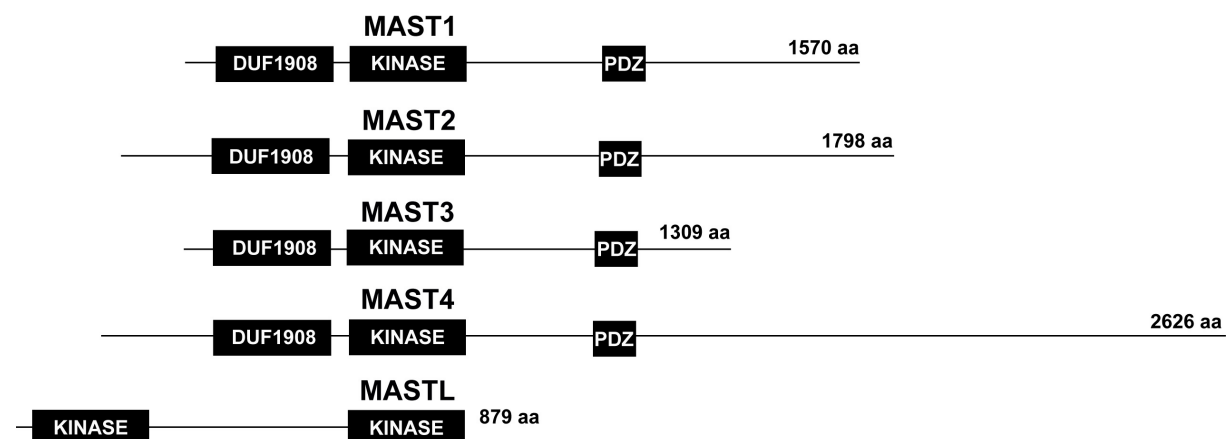


Figure 15 : Famille des kinases MAST. Représentation des 3 domaines identifiés chez MAST1-4 avec le domaine de fonction inconnue (DUF1908), le domaine kinase et le domaine PDZ en aval.

Cette organisation en domaines est strictement conservée pour MAST1-4. En revanche, la taille de la séquence en aval du domaine PDZ et en amont du

DUF1908 est variable selon les isoformes. Aucun autre domaine connu n'a été identifié sur la base des alignements de séquences.

2.2. Le domaine de fonction inconnue (DUF1908)

Le domaine DUF1908 n'est associé à aucune fonction connue (Fig.16). La structure de ce domaine de MAST3 a été résolue par RMN dans le cadre du programme de génomique structurale de Riken au Japon. Aucune information n'est disponible sur la façon dont ce domaine a été délimité et ni dans quelle but la structure de ce domaine a été résolue. Le domaine DUF1908 est composé de quatre hélices compactées (Fig.16 B et C) avec une topologie « up and down » que l'on retrouve dans la superfamille des bromodomains. La structure des bromodomains est associée à diverses fonctions dont la fixation à la chromatine pour les facteurs de transcriptions ou encore la fixation aux histones acétylés (47).

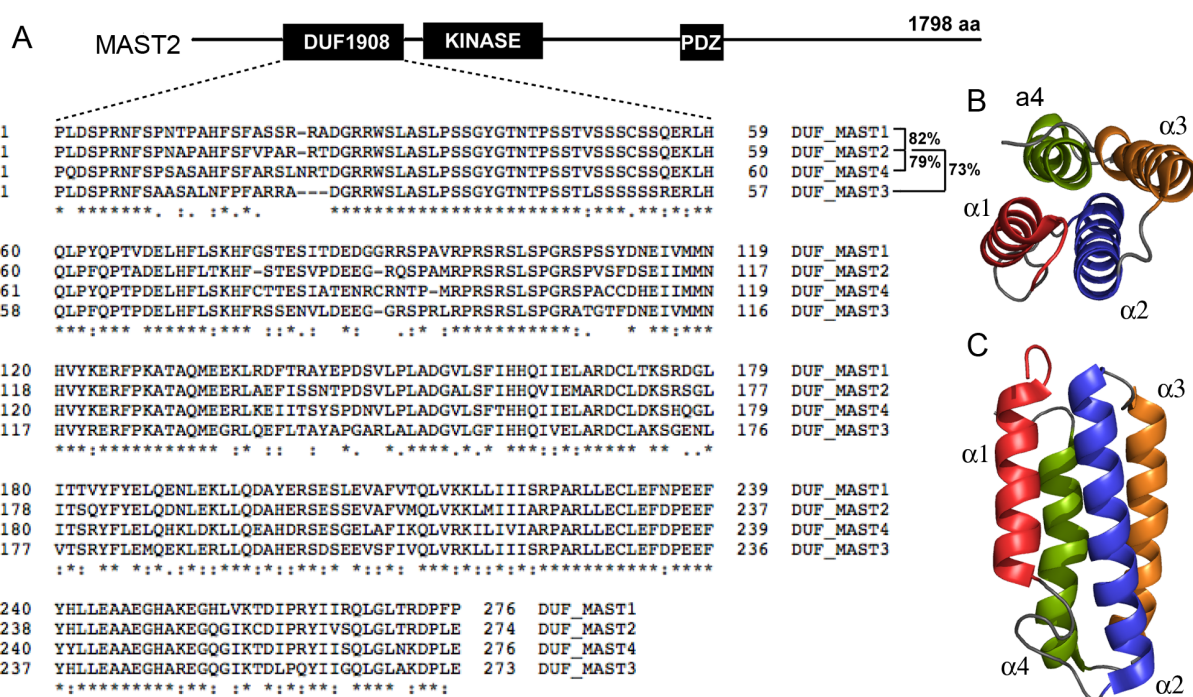


Figure 16 : Domaine DUF1908 de la famille des MAST kinases. (A) Alignement de séquences de MAST1-4 du domaine DUF1908. Délimitation du domaine de MAST1 (61-338), MAST2 (201-476), MAST3 (58-332) et MAST4 (258-535). (B) Structure RMN de plus basse énergie du domaine DUF1908 de MAST3 (Code PDB : 1V9V). (C) Rotation de 90° de DUF1908. L'hélice 1 est représentée en rouge, 2 en bleu, 3 en orange et 4 en vert.

Dans le futur, il pourrait être intéressant de réaliser un double hybride sur une banque d'ADNc de cellules humaines pour identifier les potentiels partenaires du

domaine DUF1908 afin de proposer une fonction supplémentaire pour la famille des kinases MAST.

2.3. Le domaine kinase

La suppression et l'addition d'un groupement phosphate sur des biomolécules endogènes font partie des mécanismes fondamentaux qui régulent les voies de signalisation d'une cellule ou d'un ensemble de cellules et ce, de manière réversible grâce à la synthèse de catalyseurs. Deux grandes familles d'enzymes fonctionnent ainsi en étroite association: les protéines responsables de l'ajout de groupement phosphate sur un substrat donné appelées kinases ou phosphorylases et les enzymes qui hydrolysent un groupement phosphate appelées phosphatase ou phosphohydrolase.

La superfamille des kinases représente 2% des protéines codées par le génome humain (48). Elles possèdent une topologie similaire avec deux sous-domaines N- et C-terminaux : un petit sous-domaine N-terminal (Fig.17 A panneau droit en haut) composé essentiellement de brins β et un grand sous-domaine C-terminal (Fig.17 A panneau droit en bas) composé majoritairement d'hélices. L'alignement de séquences des 518 kinases du génome humain a permis d'identifier 12 régions très conservées dans ces deux domaines (Fig.17 B).

La fixation de l'ATP et du Magnésium est principalement dépendante du sous-domaine N-terminal alors que la fixation du substrat dépend du sous-domaine C-terminal. Plusieurs résidus clefs qui participent à l'activité catalytique de la kinase sont strictement conservés. La lysine de la région II et l'aspartate de la région VII permettent l'ancrage et l'orientation de l'ATP (Fig.17 B), alors que l'aspartate de la région VIB est indispensable pour le transfert du groupement phosphate sur le substrat (Fig.17 B et C).

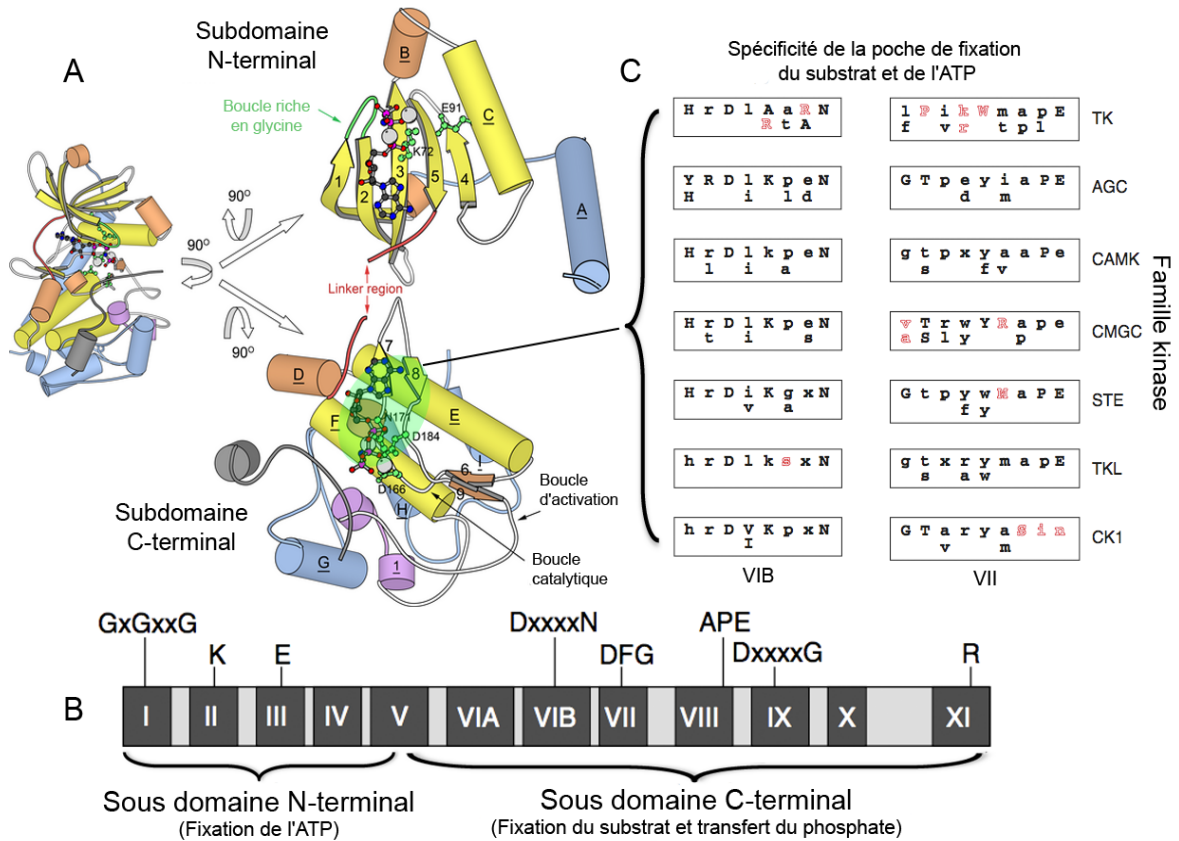


Figure 17 : Le domaine catalytique des kinases eucaryotes. (A) Structure de la kinase PKA qui se compose de deux sous-domaines (panneau de gauche): un sous-domaine N-terminal (panneau droit en haut) et un sous-domaine C-terminal (panneau droit en bas). L'ATP et des ions métalliques se fixent dans la poche entre les deux sous-domaines (représentés deux fois en N- et C-terminal). La molécule d'ATP liée est représentée en « ball and stick », les ions Mg sont représentés par des sphères grises. Les éléments de structure secondaire sont colorés en fonction de la conservation de la séquence en acides aminés au sein de la superfamille des protéines eucaryotes: les motifs conservés communs à la superfamille sont indiqués en jaune ; les motifs conservés dans au moins deux familles de kinases en orange ; les motifs conservés dans la famille AGC sont en bleu et violet. Les résidus critiques et hautement conservés dans la famille AGC sont représentés en « ball and stick » vert. La boucle riche en glycine est colorée en vert. La boucle qui forme la région de liaison entre les sous-domaines est représentée en rouge. (B) Les 12 régions conservées de la superfamille des kinases sont indiquées par un chiffre romain (I-XI). Les motifs ou acides aminés très conservés dans la superfamille des kinases sont indiqués le long de la séquence avec x pour n'importe quel acide aminé. (C) Motifs consensus des différentes familles de sérines/thréonines kinases dans la boucle catalytique de la région VIB et dans la boucle d'activation de la région VIII. Les résidus strictement conservés sont une seule lettre majuscule. Deux lettres majuscules indiquent que l'un des deux résidus est strictement conservé avec le plus fréquent indiqué en haut. Les positions, où il y a plus de deux acides aminés différents, sont en lettre minuscule. « x » signifie que le résidu est peu conservé. Les résidus surlignés participent à la reconnaissance spécifique des substrats. Adapté d'après Sheeff *et al*, (2005) (49) et Hanks, (2003) (48).

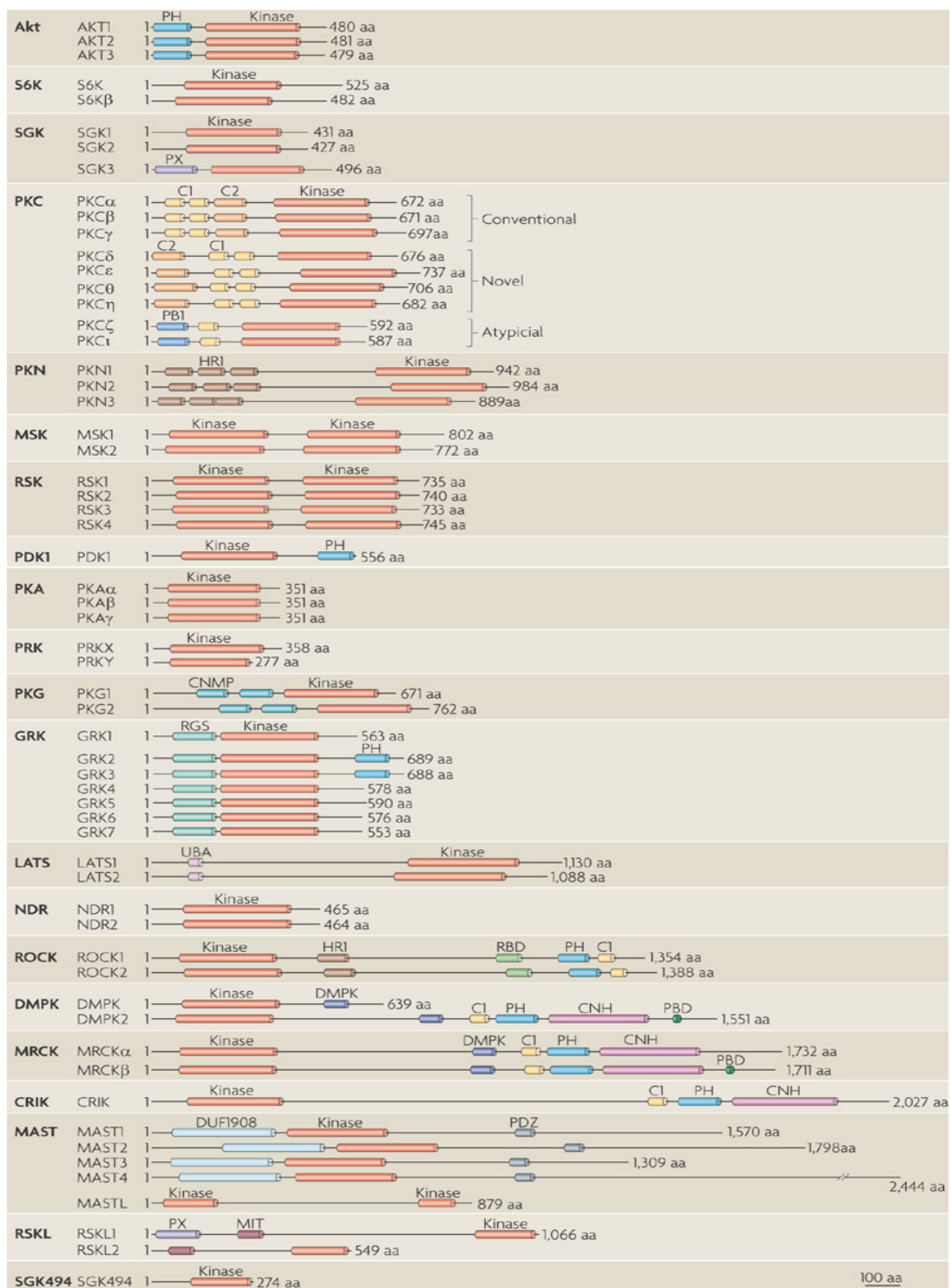


Figure 18 : Représentation des domaines fonctionnels des protéines de la famille des AGC kinases. Les kinases ont été regroupées en 21 sous-familles en fonction de l'homologie de leur domaine catalytique. La délimitation des domaines est basée sur l'analyse de la séquence primaire à partir des bases de données d'Uniprot, PFAM et SMART. Abréviations : aa, acide aminé; C, conserved region; CNH, citron homology; CNMP, cyclic nucleotide monophosphate-binding; CRIK, citron Rho-interacting kinase; DMPK, myotonin protein kinase; DUF1908, domain of unknown function 1908; GRK, G protein-coupled receptor kinase; HRI, heptapeptide repeat 1; LATS, large tumour suppressor; MAST, microtubule-associated Ser/Thr kinase; MIT, microtubule-interacting and trafficking; MRCK, myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase; MSK, mitogen- and stress-activated protein kinase; NDR, nuclear DBF2-related kinase; PBD, p21 Rho-binding domain; PDK1, 3-phosphoinositide dependent kinase; PH, pleckstrin homology; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PKC, protein kinase C; PKG, cGMP-dependent protein kinase; PKN, PKC-related protein kinase; PRK, protein kinase; PX, phox homology; RBD, Rho-binding domain; RGS, regulator of G protein signalling; ROCK, Rho-activated protein kinase; RSK, ribosomal S6 kinase; RSKL, RSK-like; S6K, p70 ribosomal S6 kinase; SGK, serum- and glucocorticoid-induced protein kinase; SGK494, Sugen kinase 494; UBA, ubiquitin-associated. D'après Pearce *et al* (2010) (50).

Sur la base des alignements de séquence, la superfamille des kinases eucaryotes a été divisée en neuf familles avec : les AGC (cAMP-dependent protein kinase/protein kinase G/protein kinase C extended) à laquelle MAST2 appartient, les CAMK (Calcium/Calmodulin regulated kinases), les CK1 (Cell Kinase I), les CMGC (Cyclin-dependent Kinases et autres kinases proches), les RGC (Receptor Guanylate Cyclases), les STE (MAP Kinase cascade kinases), les TK (Protein Tyrosine Kinase) et les TKL (Tyrosine Kinase Like). Il existe un 9^e groupe (autres kinases) composé des kinases qui ne rentrent dans aucune des familles précédentes (50). Chaque famille de kinases possède, au niveau de la poche de fixation du substrat, des résidus strictement conservés qui confèrent une spécificité du domaine catalytique dans la reconnaissance du substrat. (Fig.17 C).

2.3.1. Le domaine catalytique des kinases AGC

Parmi les 518 kinases eucaryotes identifiées, 60 kinases appartiennent à la famille des kinases AGC (Fig.18) (48). La résolution de 14 structures du domaine catalytique de la famille AGC a fortement contribué à la connaissance des mécanismes moléculaires. Certaines structures oscillent entre une conformation active ou inactive. Ainsi, la régulation de l'activité catalytique est contrôlée, pour certaines de ces kinases, par un mécanisme allostérique avec le repositionnement de résidus clefs qui permettent le transfert du groupement phosphate de l'ATP au substrat. Nous ne connaissons pas le mécanisme catalytique de MAST2, ni la spécificité pour ses substrats. MAST2 est capable de phosphoryler la protéine NHE3 (51) et PTEN (52). À partir des alignements de séquence et des structures des domaines catalytiques, nous essayerons donc de décrypter ce mécanisme et d'identifier les régions importantes pour la régulation de l'activité catalytique. MAST2 est originale à plusieurs égards au niveau de sa boucle d'activation et de son extension C-terminale.

Régulation intra-domaine de l'activité catalytique du domaine kinase:

La régulation de l'activité catalytique des kinases AGC est contrôlée par le repositionnement d'un glutamate essentiel pour la catalyse sur l'hélice α C du sous domaine N-terminal (Fig.19) qui permet le transfert du groupement phosphate de l'ATP au substrat. Le résidu hydrophobe (Phe) conservé dans la boucle de fixation

du magnésium (motif Asp-Phe-Gly) du segment d'activation sert d'intermédiaire en formant des contacts hydrophobes avec les résidus de l'hélice α C (Leu et Ile) à l'interface des deux sous-domaines.

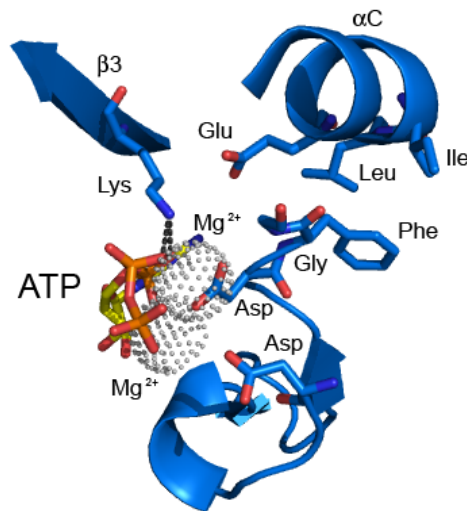


Figure 19 : Poche de fixation de l'ATP. Les principaux résidus qui participent au positionnement de l'ATP sont représentés en « stick » bleu. L'ATP est en « stick » jaune. La figure a été réalisée à partir de PKAC- α (code PDB : 1ATP). Tous les résidus qui apparaissent sont strictement conservés dans le domaine kinase de MAST2.

Les domaines catalytiques des kinases AGC sont majoritairement activés par la phosphorylation d'une Ser/Thr sur boucle d'activation et d'une Ser/thr sur la queue C-terminale qui interagit avec l'hélice α C. Ces mécanismes ont notamment été décrits pour les sous-familles AKT, S6K, SGK, PKC, MSK, RSK et LAST1 (50). Il a été proposé que MAST2 soit capable de s'autophosphoryler en *trans* ou en *cis* (52) mais le mécanisme d'activation de son domaine catalytique reste inconnu.

La boucle d'activation :

Deux motifs sont conservés dans la séquence de la boucle d'activation des kinases AGC, composée de 25-30 acides aminés avec: (i) un motif Asp-Phe-Gly qui fixe l'ion Mg (Fig.19) et (ii) un motif Ala-Pro-Glu. La boucle d'activation des domaines kinases inactifs est majoritairement non structurée. Un changement de conformation au sein de la boucle d'activation est nécessaire pour favoriser la catalyse. Ce changement conformationnel est très souvent induit par la phosphorylation d'un des résidus de la boucle d'activation (53). L'alignement de séquence du domaine kinase de MAST2 avec les domaines kinases de la famille AGC révèle cependant une boucle bien plus longue que les autres membres de la famille AGC (Fig.20 A)

suggérant un mécanisme d'activation différent. D'autres kinases n'appartenant pas à la famille AGC possèdent cette même caractéristique de longue boucle telle la kinase STK16 dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X. Contrairement à la majorité des domaines kinase dont les boucles d'activations « classiques » sont très mal définies (peu de densité électronique et/ou facteurs B élevés) (Fig.20 B), la boucle de STK16 est stabilisée⁵ par la formation d'un brin β et d'une hélice α (Fig.20 C). La prédiction de structure secondaire sur les 518 kinases du génome humain, indique que seulement 7 autres kinases possèdent une hélice putative dans la région de la boucle d'activation semblable à STK16 : les 4 kinases de la famille MAST (1-4) et trois kinases de la famille NAK⁶ (BIKE, AAK1 et GAK) à laquelle STK16 appartient (Fig.20 A). Le domaine catalytique de STK16 est actif sans que la boucle d'activation n'ait besoin d'être phosphorylée (54). Cependant, contrairement à la famille MAST, la famille NAK ne possède pas d'extension C-terminale qui joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité catalytique (55). La résolution de la structure du domaine catalytique des MAST kinase paraît donc indispensable pour mettre en lumière ce mécanisme moléculaire qui semble particulièrement original.

⁵ La densité électronique est très bien définie et les facteurs B sont très bas indiquant que l'amplitude de mouvement de la boucle est très faible.

⁶ La famille NAK n'est classée dans aucune des 8 grandes familles de kinases (TK, TKL, STE, CK1, AGC, CAMK, CMGC ou encore APK). Elle appartient à la famille de kinases dite « autres ».

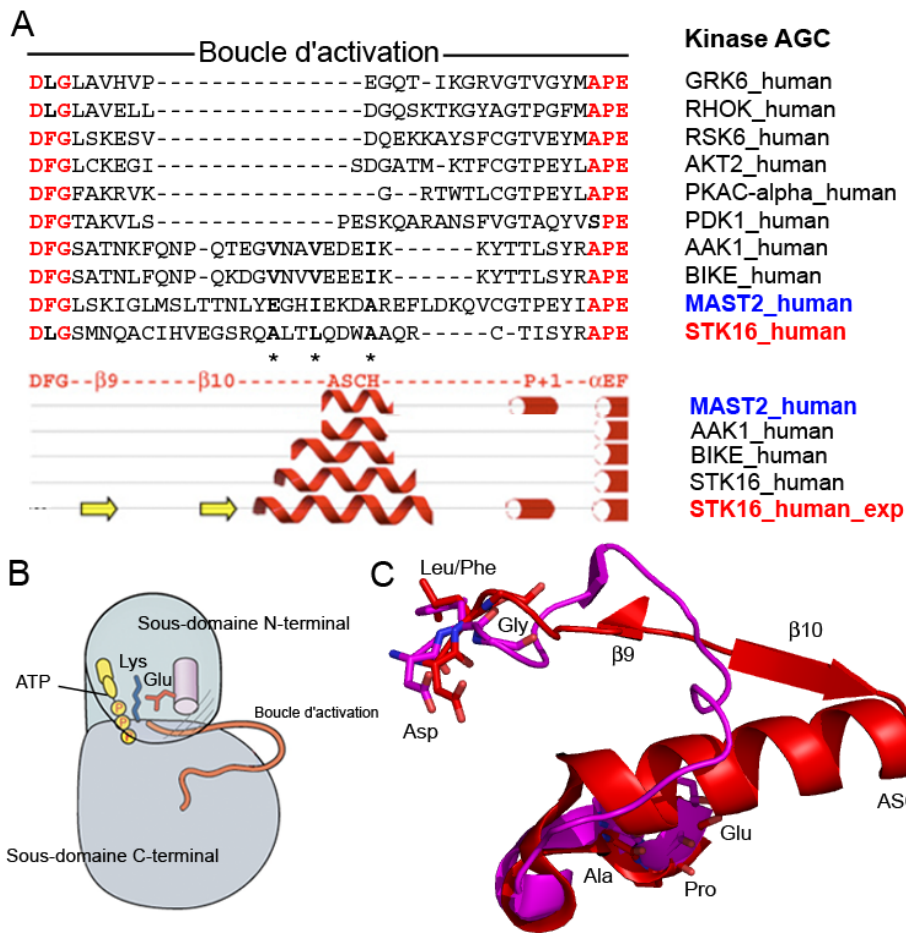


Figure 20 : Originalité de la boucle d'activation de MAST2. (A) Alignement des séquences de la boucle d'activation de différentes kinases AGC. Dans le panneau du bas, prédiction des structures secondaires de la boucle de MAST2 (en rouge), de AAK1, de BIKE et de STK16. STK16_human_exp correspond aux structures secondaires extraites de la structure de STK16 (code PDB : 2BUJ). (*) Correspond aux résidus qui interagissent avec le sous-domaine C-terminal. (B) Schéma d'un domaine kinase. Le site de fixation de l'ATP est dessiné ainsi que deux résidus clés qui permettent la correcte orientation de l'ATP. La boucle d'activation est coloriée en orange. (C) Superposition de la boucle d'activation de Aurora (sous une forme active) (code PDB : 2OL7) en violet avec la boucle d'activation de STK16 (code PDB : 2BUJ) en rouge. Les deux motifs conservés DL/FG et APE sont représentés en « stick ». Abréviation : ASCH : *activation segment C-terminal helix*.

L'extension C-terminale des kinases AGC:

La majorité des kinases AGC possède une queue C-terminale qui joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité catalytique. Cette queue C-terminale, principalement désordonnée, est composée d'une cinquantaine d'acides aminés et possède trois séquences d'interactions conservés (Fig.21 A):

- Un point d'ancrage avec le sous domaine C-terminal (CLA/CLT) avec une séquence consensus WxxV/LxxxxΦ (Φ pour n'importe quel aa hydrophobe, x pour n'importe quel aa).
- Un point d'ancrage proche du site actif (ALT) avec une séquence consensus

DxxxF.

- Un point d'ancrage avec le sous domaine N-terminal (NLT) qui possède une séquence consensus I/FxxFpS.

Cette séquence C-terminale possède de plus un site putatif de fixation au domaine SH3 avec une séquence consensus PxxP mais qui n'est pas conservée dans la famille MAST (55). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour identifier le rôle de cette séquence.

La fixation du motif hydrophobe de la queue C-terminale (HF) dans la poche entre l'hélice α C et le brin β 3 (Fig.21 B) est un événement critique pour la catalyse. Par exemple, sans la fixation du motif HF, l'activité du domaine catalytique de la kinase AKT diminue significativement (56, 57). Certains acides aminés des hélices α c et α b et des brins β 1, 4 et 5 essentiels pour l'activité catalytique, et qui forment un réseau d'interaction avec le motif HF, sont strictement conservés dans les kinases de la famille AGC (Fig.22). Dans la structure d'AKT de la famille AGC, à l'état inactif, l'hélice α C est désordonnée lorsque le motif HF est absent de la poche hydrophobe du sous domaine N-terminal (58). La fixation du motif HF d'AKT permet de stabiliser l'hélice α C positionnant correctement le glutamate indispensable pour la catalyse (58, 59). De plus, la phosphorylation de la sérine conservée en aval du motif HF (I/FxxFpS) permet de former une interaction spécifique avec l'arginine de l'hélice α C conservée dans la famille des kinases AGC (60). Dans sa forme inactive, le motif HF de certaines kinases AGC peut aussi se fixer par contact inter-moléculaire dans la poche de la kinase PDK1 de la famille AGC. Ne possédant elle-même pas de queue C-terminale, l'activité de PDK1 est induite par la reconnaissance de la queue C-terminale d'autres kinases AGC dont la séquence consensus du motif HF est FxxFS^PY/F. La phosphorylation de la sérine en aval du motif HF augmente l'affinité avec PDK1 (60, 61) et de fait, son efficacité de phosphorylation. L'interaction du motif HF avec PDK1 permet ainsi de phosphoryler la boucle d'activation des partenaires de PDK1 tel que AKT (62), PRK2 et PKC ζ (63), RSK2 (60), S6K1 et SGK1 (64) et de les activer à leur tour.

La conservation de certains résidus indispensables pour l'activité catalytique montre que ces kinases de la famille AGC partagent un mécanisme commun.

Cependant, d'autres niveaux de régulation sont spécifiques à chaque sous-famille de kinase. La régulation inter-domaine est un mécanisme très répandu. Parmi les 60 kinases de la famille AGC, 40 possèdent des domaines adjacents qui peuvent réguler l'activité catalytique du domaine kinase (50).

L'efficacité de phosphorylation de MAST2 est, par exemple, dépendante de la présence du domaine PDZ qui est séparé du domaine kinase par 200 acides aminés.

A Queue C-terminale (Kinase AGC)

MAST1_human	RDLDTGLLRQKAE--FIPHLESED----DTSYFDT-RSD--RYHHVNSYDEDDTTEEE-PVE-TRQFSSCSPRFSKVY
MAST2_human	TGLDWTGLLRQKAE--FIPQLESED----DTSYFDT-RSE--RYHHMSEDEEEVSEDEG-CLE-TRQFSSCSPRFNKVY
MAST3_human	LALDWAQLLRHKAE--FVPQLEAED----DTSYFDT-RSE--RYRHLGSEDDDETNDDEES-STE-TRQFSSCSHRFSKVY
MAST4_human	RSLDWNQLLRQKAE--FIPQLESED----DTSYFDT-RSE--KYHHMETEEDDTNDEDFNVE-TRQFSSCSHRFSKVF
GRK6_human	KKLNFRKLGAGMLEPFPKDPQAIYCKDVLIDIEQFSTVKGVELEPTD-----QDYQKPFATGSVPIPWQN
RHOK_human	KDLNWRQLEAGMLPFPFIPDSKTVYAKDIQDVGFSTVKGVAFDKTD-----TEFFQEPATGNCPWPQE
AKT2_human	LSINWQDVVQKLLPFPKQVTSEV----DTRYFDDEFTAQSITITPPDRYDSLGLLELDQRTHFPPQFSYSAS-IRE--
RSK6_human	ANIDWDKLYKREVQFPFKPASGKPD----DTPCFDPEFTAKTPKDSPLPA-SANAHQL-----FKGFSEVATSIABEY
PKC- α _human	RRIDWEKLENREIQFPFKKVCVGK-----AENFDKFFTRGQPVLTTPDQLVIAN----IDQSDFEQFSYVNPQFVHPI

B Motif I/FxxF

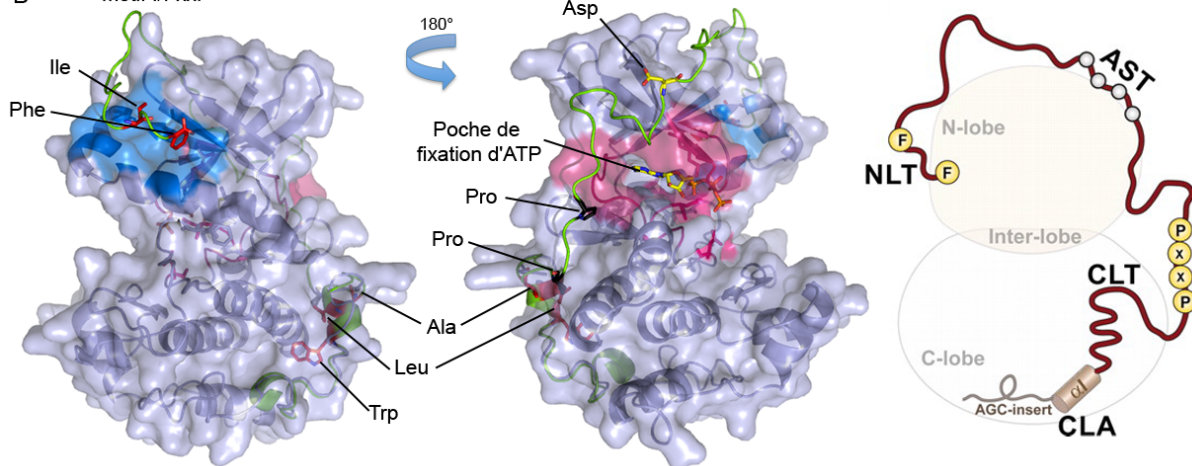


Figure 21 : Queue C-terminale du domaine kinase de MAST2. (A) Alignement de séquence de la partie C-terminale des kinases appartenant à la famille AGC. Les résidus hydrophobes conservés sont en rouge. Le motif PxxP est en noir. Le résidu Asp conservé qui interagit avec le domaine N-terminal est en jaune. (B, panneau gauche et milieu). Structure du domaine kinase modélisé à partir du serveur PHYRE par alignement avec la structure du domaine kinase de PKC- α (code PDB : 1CMK). Seule la queue C-terminale de PKC- α est représentée en vert. Les résidus conservés sont représentés en « stick ». La poche de fixation de l'ATP est colorée en rose. Le site de fixation du motif I/FxxF est coloré en bleu. (B, panneau droit) Représentation schématique du mode de fixation de la queue C-terminale. Abréviations : CLA, C-lobe Anchor ; CLT, C-lobe tether ; AST, active-site tether ; NLT, N-lobe tether. D'après Kannan *et al* (2007) (55).

Sous domaine N-terminal

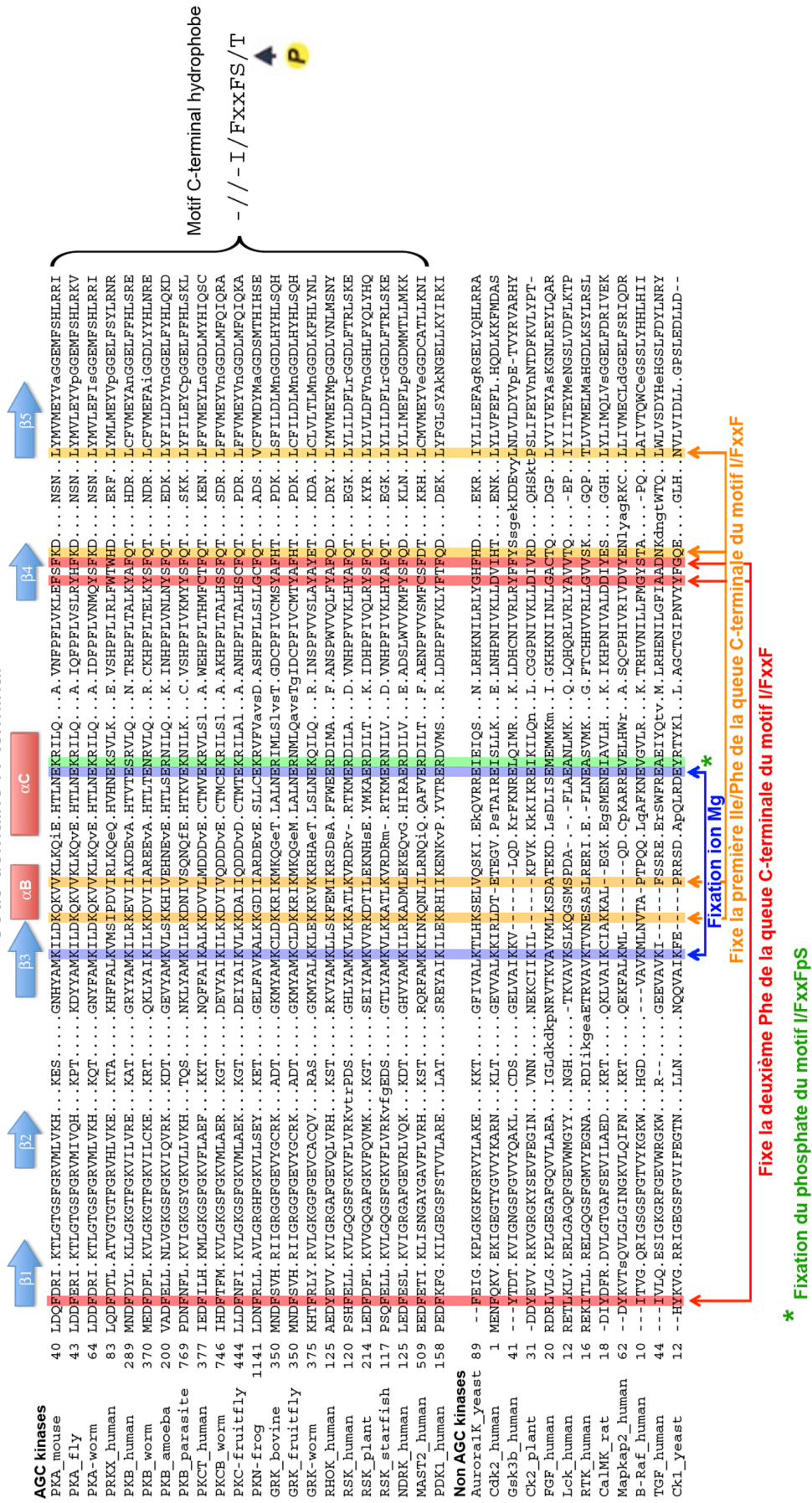


Figure 22 : Conservation des résidus des kinases AGC impliqués dans la fixation du motif hydrophobe de la queue C-terminale. Alignement de séquences du sous domaine N-terminal de kinase AGC et non AGC. Les résidus surlignés en orange correspondent aux résidus conservés dans la famille AGC qui interagissent avec Ile/Phe du motif hydrophobe de la queue C-terminale (I/FxxFpS/T), en rouge avec la deuxième Phe du motif hydrophobe de la queue C-terminale (I/FxxFpS/T), en vert avec le phosphate de Ser/Thr phosphorylé du motif hydrophobe de la queue C-terminale (I/FxxFpS/T). Les résidus surlignés en bleu sont les résidus clés pour le positionnement correct de l'ATP qui est commun à toutes les kinases.

2.4. Les domaines PDZ

Le domaine PDZ est ubiquitaire chez les organismes eucaryotes. Il y aurait 267 domaines PDZ différents dans le génome humain (65) présents dans 147 protéines d'après la base de données SMART. Ils sont aussi présents chez les plantes et les bactéries suggérant une origine lointaine. Ce sont des domaines essentiellement d'interaction protéines-protéines qui reconnaissent le site de fixation aux domaines PDZ (PDZ-BS) généralement situé à l'extrémité C-terminal des ligands (41). Ces interactions se révèlent être essentielles dans l'organisation des complexes de signalisation et de transduction du signal. Quelques constatations peuvent être déduites des nombreuses études portant la transduction du signal : (i) les nombreuses protéines dans les cascades de signalisation sont majoritairement connectées par des interactions protéine-protéine ; (ii) l'association des protéines de signalisation les unes aux autres forme de très larges complexes appelés complexes de signalisation ou transducisomes ; (iii) les transducisomes sont souvent attachés à la membrane cellulaire *via* des récepteurs transmembranaires et/ou d'autres protéines associées à la membrane (66). Le transducisome se divise en deux catégories : les protéines d'échafaudage contenant plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine qui permettent de former de larges complexes protéiques et les protéines de signalisation qui, associées à un domaine catalytique, augmentent la spécificité de substrats et améliorent la transduction du signal (67).

2.4.1. Structure

Les domaines PDZ sont composés de 80 à 100 acides aminés avec une topologie qui est très conservée malgré leur très faible identité de séquence (<15%) (68). Plus de 250 structures de domaines PDZ sont présentes dans la PDB depuis la résolution en 1996 de la première structure cristallographique obtenue avec le domaine PDZ-3 de PSD-95 en complexe avec son ligand (69).

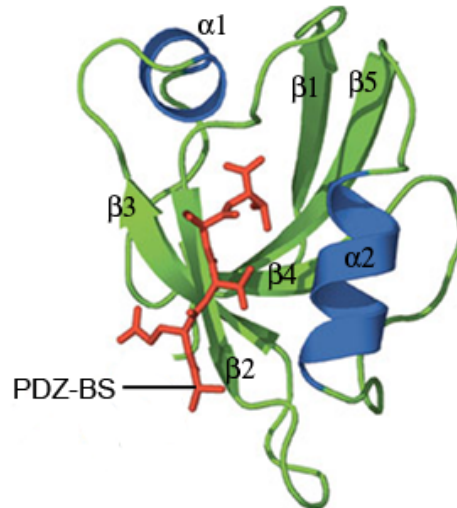


Figure 23 : Structure du 3^e domaine PDZ de PSD95 en interaction avec son ligand. Représentation en ruban du domaine PDZ en complexe (code PDB : 1BE9). Les hélices sont en bleu et les brins β en vert. Le peptide, représenté en « stick », est en violet. D'après Doyle *et al* (1996) (69).

Ainsi, les domaines PDZ forment une structure globulaire et compact avec 5 ou 6 brins β antiparallèles (β 1- β 6) et deux hélices α (α 1 et α 2). Les résidus du brin β 2 et de l'hélice α 2 forme l'essentiel du site de fixation du ligand (Fig.23).

2.4.2. Mode d'interaction des domaines PDZ

Interaction domaine PDZ/PDZ-BS

Initialement, il a été proposé que les trois derniers acides aminés C-terminaux du ligand sont suffisants pour former le complexe avec le domaine (70, 71). En effet d'après les premières structures, les trois premiers résidus du PDZ-BS s'insèrent dans le sillon formé par le brin β 2 et l'hélice α 2 du domaine PDZ et forment ainsi un brin β intermoléculaire avec le feuillet β 2/ β 3 du domaine PDZ. Le résidu en position 0 (P_0)⁷ du PDZ-BS vient se loger dans la cavité hydrophobe formée par le motif conservé FGF à l'entrée du brin β 2 et les résidus hydrophobes de l'hélice α 2. Le résidu P-1 est orienté vers le solvant et interagit préférentiellement avec les chaînes latérales du brin β 2. Le résidu P-2 interagit avec les résidus en bas de l'hélice α 2.

Sur cette base, les domaines PDZ ont alors été classés par rapport à la spécificité de reconnaissance du ligand. Ainsi, les domaines PDZ de classe I

⁷ Par convention, P_0 est le résidu à l'extrémité C-terminale en position 0. P-1 est le résidu en amont du résidu P_0 et ainsi de suite.

interagissent préférentiellement avec le motif S/T-X- Φ_{COOH} ; les domaines de classe II avec le motif Φ -X- Φ_{COOH} et les domaines de classe III avec le motif D/E-X- Φ_{COOH} , où X est n'importe quel acide aminé et Φ représente un résidu hydrophobe (72).

Cette classification est cependant discutée car trop restrictive et ne prend pas en compte les autres acides aminés en amont de P-2 (73-75). Il est indéniable que les trois premiers résidus constituent la base essentielle de l'interaction. Cependant la contribution des quatre ou cinq résidus en amont de ce site minimal de fixation contribue significativement à l'interaction en modulant l'affinité et la spécificité pour les domaines PDZ (76-79).

Ainsi de nouvelles propositions ont été faites pour caractériser les interactions PDZ/PDZ-BS en utilisant différentes approches. Une analyse à grande échelle sur l'interaction de 82 domaines PDZ (28 issus de *C.elegans* et 54 de *H.sapien*) a isolé 16 classes de domaines PDZ sur la base des 5 derniers acides aminés (au lieu de 3) C-terminaux des PDZ-BS (77). Une autre a présenté 25 classes de domaines PDZ à partir d'expériences faites sur 249 PDZ de toutes espèces confondues (<67% d'identité de séquence) en mutant deux positions critiques pour l'interaction avec le ligand: le résidu en bas de l'hélice $\alpha 2$ et celui à l'entrée du brin $\beta 2$ (80). À l'évidence, il est restrictif de chercher à classer les domaines PDZ dans des catégories discrètes sur leur unique capacité à lier ou non un ligand. Une quantification des interactions de 157 domaines PDZ avec 217 peptides dérivés de ligands naturels issus du génome de la souris a mis en évidence que les domaines PDZ forment un continuum en affinité et spécificité avec leur cible (81).

En revanche, il est utile sur la base de prédiction de définir la spécificité d'un ligand pour un domaine PDZ à partir de sa séquence primaire pour concevoir de nouveaux ligands (82). En effet, de telles méthodes ouvrent une voie très intéressante pour la conception de molécules inhibitrices. Plus difficile, il serait précieux de prédire la (les) cible(s) préférentielle(s) de certains pathogènes qui possèdent un PDZ-BS et qui potentiellement peuvent perturber une ou plusieurs voies de signalisation pour assurer leur propagation (83, 84).

Divergence du mode d'interaction canonique des domaines PDZ :

La régulation de l'interaction du domaine PDZ avec son partenaire ne se limite pas à un mécanisme d'interaction canonique PDZ/PDZ-BS. Certains domaines PDZ interagissent avec d'autres cibles que les motifs C-terminaux.

Dimérisation

Certains PDZ forment des homo ou hétéro dimères *in vitro*. D'abord considérées comme un artefact de cristallisation, plusieurs études ont révélé la pertinence biologique de ces interactions *in cellulo*. Le domaine PDZ de GRASP, sous sa forme monomérique, participe au trafic cellulaire des récepteurs glutamates à la membrane en interagissant avec leurs PDZ-BS (85). En absence du ligand endogène, GRASP forme un homodimère ou un homotétramère dans le cytoplasme selon sa concentration. La structure du domaine PDZ de GRASP, sans ligand endogène, indique que les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ de chaque protomère forme une surface de dimérisation (Fig.24 A) et que le PDZ-BS en C-terminal de GRASP vient se loger en *trans* entre l'hélice $\alpha 2$ et le brin $\beta 2$ de GRASP-PDZ rendant ainsi le site inaccessible pour d'autres ligands. L'ajout du ligand endogène de GRASP *in vitro* déplace l'équilibre oligomérique vers le monomère.

À l'inverse, la fixation d'un des ligands endogènes du PDZ de NHERF1 induit l'oligomérisation de NHERF1 *in vitro* et *in cellulo* (86). La comparaison de la structure des domaines PDZ de NHERF1 et de GRASP indique un mécanisme de dimérisation différent. En effet, les brin $\beta 1$ de chaque protomère de NHERF1 forment un feuillet antiparallèle (Fig.24 B).

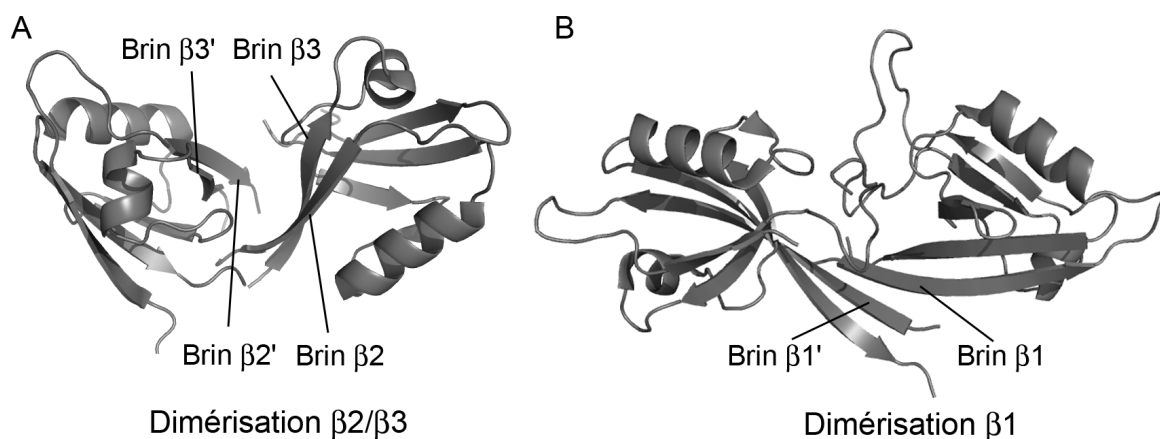


Figure 24 : Dimérisation des domaines PDZ. (A) Structure cristallographique du domaine PDZ de GRASP (code PDB : 2EG0). (B) Structure cristallographique du dimère du domaine PDZ de NHERF1 (code PDB : 1Q30).

Une étude *in vitro* récente vient de mettre en évidence que ce mécanisme de dimérisation est potentiellement bien plus répandu qu'attendu. En effet, l'analyse d'interaction PDZ-PDZ par polarisation de fluorescence *in vitro* sur une banque de 157 PDZ issus du génome de la souris (soit environ 25 000 interactions testées) indique que 30% des domaines PDZ forment, en solution, un complexe avec des constantes de dissociation comprises entre 0,5 et 25 μ M (87). Il serait nécessaire de rechercher les résidus qui sont systématiquement conservés parmi ces domaines capables de dimériser en comparaison avec ceux qui n'interagissent pas avec d'autres domaines PDZ. Cependant, la diversité des structures dimériques et le faible pourcentage d'identité des séquences primaires des domaines PDZ compliquent énormément l'analyse. De plus, il existe d'autres structures cristallographiques de domaine PDZ avec deux protomères dans une unité asymétrique qui possèdent une conformation différente de celles présentées dans la figure 24 A et B (88). Enfin, les données fonctionnelles *in cellulo* manquent pour pouvoir discuter de la conséquence biologique de ces associations.

Fixation d'un motif interne

Deux modes de fixation entre un domaine PDZ et un motif interne ont été décrits dans la littérature. Le domaine PDZ de PAR6 forme un complexe avec un motif interne linéaire de la protéine PALS1 se fixant dans le sillon du brin β 2 et de l'hélice α 2 (89) (Fig.25 A). Le résidu P(+1) du PDZ-BS interne interagit avec la boucle β 1 β 2 (Fig.25 A).

Une autre catégorie de motif interne possède quand à elle une structure caractéristique en épingle à cheveux à la sortie du brin β 5 du domaine PDZ et forme un complexe PDZ/PDZ-BS de type « *head to tail* » (Fig.25 B). Le complexe le mieux caractérisé est celui composé de la protéine nNOS avec la β -syntrophine. Le domaine PDZ de nNOS possède une extension en C-terminale avec une structure en épingle à cheveux à la sortie du brin β 5 qui vient se loger dans la poche de fixation canonique du domaine PDZ de la β -syntrophine (Fig.25 A).

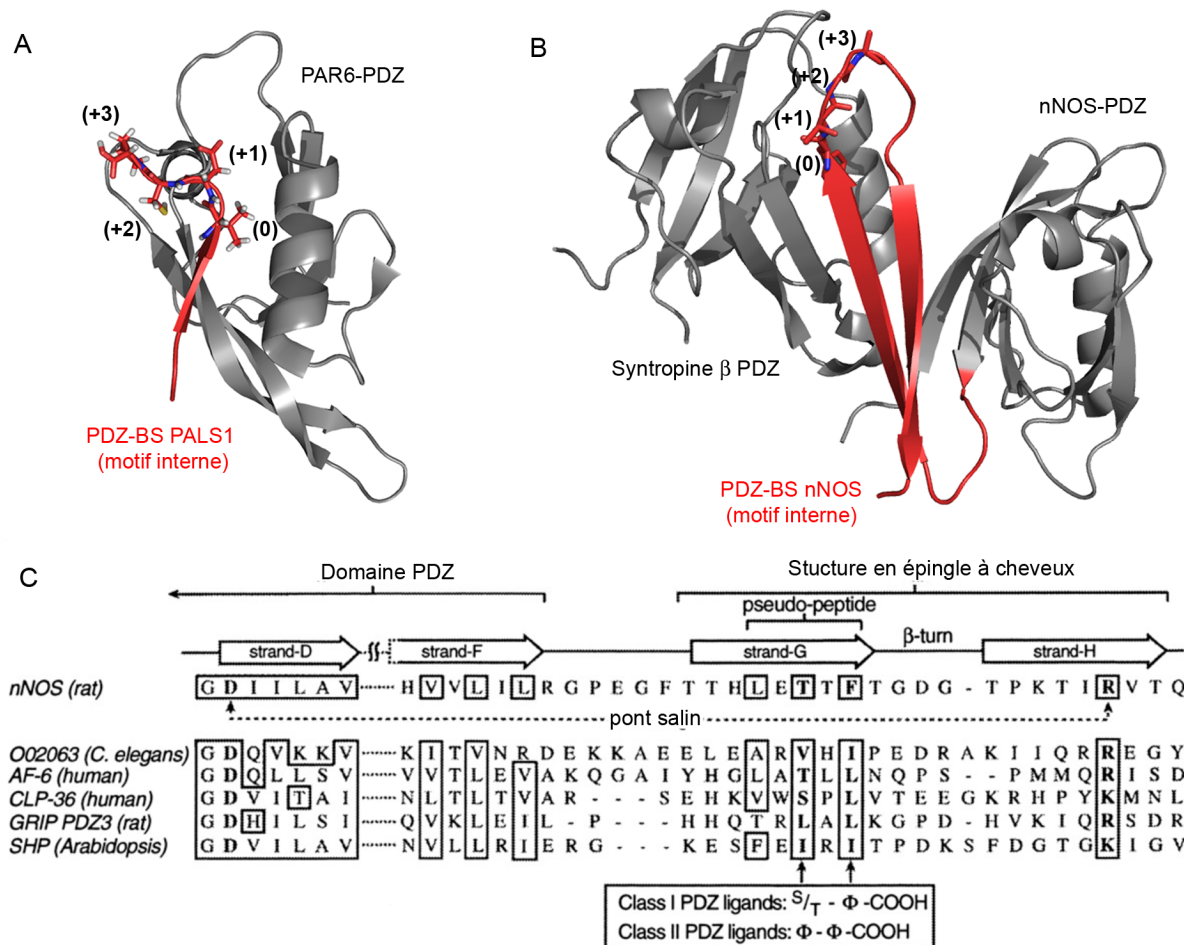


Figure 25 : Motif de fixation interne des domaines PDZ. (A) Structure cristallographique de PAR6-PDZ en complexe avec PALS1 (code PDB : 1X8S). (B) Structure cristallographique du complexe de nNOS avec le domaine PDZ de la β -syntrophin (code PDB : 1QAV). (C) Alignement de séquences des domaines PDZ qui présentent une potentielle extension en épingle à cheveux. Les résidus conservés sont encadrés. D'après Hillier *et al.*, (1999) (90).

Le groupement carboxylate en C-terminal du PDZ-BS est remplacé par un coude β . Les résidus en amont de ce coude, forme un pseudo-peptide (PDZ-BS interne). On retrouve pour ces pseudo-peptides les mêmes deux classes principales I (S/T-X-V) et II (ϕ -X- ϕ) de PDZ-BS. L'alignement de séquence de nNOS avec d'autres domaines PDZ neuronaux suggèrent que plusieurs résidus à la sortie du brin β 5 sont conservés et sont susceptibles de former une structure en épingle à cheveux (Fig.25 C). Il est ainsi hautement probable que le nombre d'interactions PDZ/PDZ-BS identifiées de ce type va s'accroître dans l'avenir.

Fixation à la membrane

Une dernière catégorie de domaines PDZ, très peu documentée, est capable d'interagir avec la membrane plasmique (91) soit par l'intermédiaire des phosphoinositides (92), soit par une interaction électrostatique avec la membrane (93).

2.4.3. Régulation de l'interaction des domaines PDZ

Le très grand nombre de domaines PDZ et de ligands humains pose la question cruciale du mode de régulation des interactions d'un domaine PDZ avec son ligand considérant l'importante redondance des séquences des quatre derniers acides aminés C-terminaux des PDZ-BS. La localisation cellulaire joue un rôle primordial dans la régulation de ces interactions. Des domaines supplémentaires des protéines avec un domaine PDZ et les séquences « signales » modulent la compartimentation cellulaire des protéines *in vivo*. De plus, l'expression des protéines est soumise à de nombreux facteurs de régulation qui contrôlent la synthèse. Ainsi, la concentration intracellulaire et l'affinité de chaque protagoniste sont bien entendu des facteurs décisifs pour favoriser ou non une interaction dans la cellule.

Affinité des complexes PDZ/PDZ-BS et PDZ/PDZ

Les constantes d'affinités des complexes PDZ/PDZ-BS et PDZ/PDZ mesurées *in vitro* sont majoritairement comprises entre 1 et 10 μ M (87, 94-96). En comparaison des constantes d'affinités de certains anticorps pour leur antigène, ces interactions peuvent être qualifiées de faibles. Cependant, elles sont adaptées au caractère transitoire de ces interactions impliquées dans les mécanismes de signalisation. Les liaisons hydrogènes, formées entre le domaine PDZ et le PDZ-BS, jouent un rôle essentiel dans l'affinité du complexe et plus particulièrement le groupement carboxylate qui, lorsqu'il est substitué par d'autres groupements (amide, alcool hydrazide, methyl ester), fait chuter drastiquement l'affinité (x50-100) (97). Ainsi, peut-on constater, par titrage calorimétrique isothermale, que la contribution enthalpique est largement majoritaire dans la formation des complexes PDZ/PDZ-BS.

Modifications post traductionnelles

Un changement de la spécificité du substrat ou de la poche d'interaction du domaine PDZ est un mécanisme supplémentaire pour moduler l'affinité du complexe. Ainsi, l'ajout d'un groupement phosphate sur une sérine, thréonine ou tyrosine sur le PDZ-BS peut abolir ou diminuer significativement l'interaction avec le domaine PDZ (Fig.26 A) (76, 98-100). À l'inverse, dans le cas de MRP2, la contribution d'une charge négative due à la phosphorylation du PDZ-BS peut augmenter l'affinité du ligand pour son domaine PDZ (101).

Les modifications de la poche de fixation du domaine PDZ sont aussi un mécanisme efficace pour abolir une interaction avec un ligand. Par exemple, à partir d'un stimulus externe (exemple : la lumière), le cinquième domaine PDZ d'INAD forme un pont disulfure entre l'hélice $\alpha 2$ et le brin $\beta 2$ qui interdit la fixation du PDZ-BS (Fig.26 B) (102). La phosphorylation de résidus proche de la poche de fixation du domaine PDZ peut aussi modifier la formation des complexes (103-105).

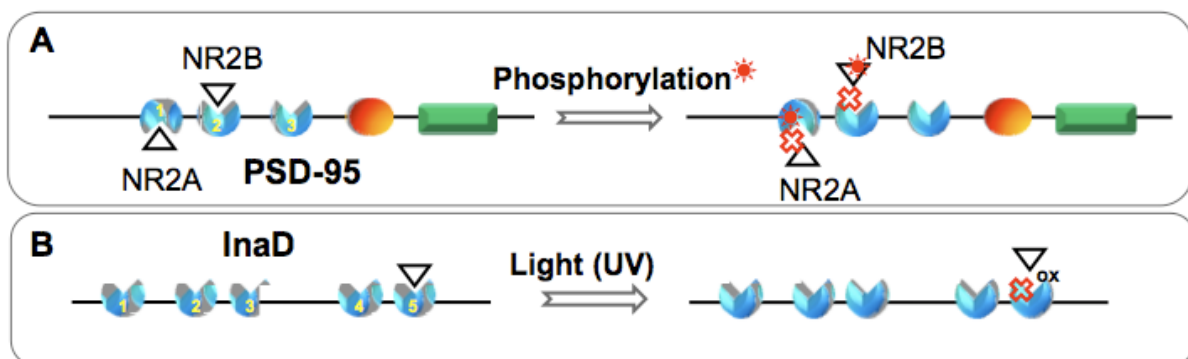


Figure 26 : Modifications post traductionnelles des PDZ-BS et des domaines PDZ qui modulent l'affinité des complexes PDZ/PDZ-BS. (A) Inhibition de l'interaction (symbolisée par une croix) due à la phosphorylation du PDZ-BS ou du domaine PDZ. (B) Suppression de l'interaction par la formation d'un pont disulfure (=ox) dans la poche de fixation du PDZ-BS. D'après Lee & Zheng, (2010) (106).

Tous ces différents mécanismes sont réversibles et permettent ainsi de réguler plus efficacement, en fonction de l'environnement cellulaire, la transmission de l'information dans un contexte *in vivo*.

Allostérie

La poche du domaine PDZ entre l'hélice $\alpha 2$ et le brin $\beta 2$, où vient se loger le PDZ-BS, possède des résidus très conservés. Cette interaction comme nous venons de le voir participe à la transduction du signal dans la cellule. Toutes ces interactions créent, à la surface du domaine PDZ, une perturbation énergétique qui, dans certains cas, se répercute, par un effet domino, sur une zone plus large au sein de la structure tridimensionnelle du domaine PDZ. Plusieurs études ont montré que ces résidus sont liés physiquement créant ainsi un « chemin énergétique » (94). Sur cette base et grâce aux nombreuses séquences disponibles de domaines PDZ, plusieurs outils informatiques ont été développés pour mettre en évidence les résidus conservés qui participent à ce phénomène allostérique (107-109). Ainsi, peut-on remarquer qu'à la suite de la fixation du PDZ-BS, des résidus des brins $\beta 3$, $\beta 4$ et $\alpha 1$ sont perturbés bien qu'il n'y ait pas d'interactions directes avec le PDZ-BS (Fig.27).



Figure 27 : 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) (110).

La question sur les conséquences de ces perturbations a été posée par plusieurs groupes. Celle-ci nous conduit aussi à réfléchir sur la nécessité d'un tel chemin énergétique. En effet, dans un contexte plus général, le domaine PDZ peut transmettre une information « structurale » à des domaines adjacents en *cis* ou en *trans*. Cette information structurale peut être utilisée pour moduler la fonction ou encore l'affinité de la protéine pour son ligand (111). Plusieurs études ont ainsi pu mettre en avant la relation entre dynamique et affinité du domaine PDZ pour son partenaire qui, pour certaines protéines, est aussi dépendante d'une extension supplémentaire au domaine PDZ en N- et/ou C-terminal. La protéine Par-6 possède en N-terminal du domaine PDZ de Par-6, à l'entrée du brin $\beta 1$, une séquence de reconnaissance de la protéine Cdc42. La formation de ce complexe, qui se trouve à

l'opposé du site de fixation du domaine PDZ, augmente l'affinité de Par-6-PDZ pour ses ligands (Pals1 et Par-3) d'un facteur 13. La fixation de Cdc42 entraîne effectivement une rigidification de certaines zones hautement dynamiques de l'apo-Par-6-PDZ.

Un autre exemple concerne la première structure d'un domaine PDZ résolue par cristallographie : le troisième domaine PDZ de PSD95. Ce domaine PDZ possède à la sortie du brin $\beta 5$ en C-terminal, une hélice supplémentaire qui flanque les brins $\beta 3$ et $\beta 2$. La présence de cette hélice, qui n'interagit pas avec le peptide, permet d'augmenter l'affinité du domaine PDZ d'un facteur 21 (112). La phosphorylation de la tyrosine sur cette hélice supplémentaire induit un changement de conformation, supprimant l'interaction de cette hélice avec $\beta 2$ - $\beta 3$ et de ce fait diminue la constante d'affinité du domaine PDZ pour son substrat (113).

Extension C- et N-terminal des domaines PDZ et organisation modulaire

La plupart des domaines PDZ sont définis par une structure canonique qui a été décrite dans les chapitres précédents : avec 5 brins β et 2 hélices α ⁸. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il existe des structures secondaires supplémentaires en N- et C-terminal. D'après une analyse bioinformatique, uniquement sur la base de prédiction de structure secondaire, ces extensions seraient présentes dans 40% des domaines PDZ humains testés (soit 107 sur les 267 PDZ totaux). Le rôle joué par ces extensions est particulièrement intéressant à plusieurs niveaux. Dans une revue récente, Luck *et al*, font une rétrospective très détaillée de cette littérature qui, pour le moment, n'en est qu'à son balbutiement. Comme, nous l'avons évoqué plus haut, l'extension de ces domaines PDZ peut moduler l'affinité avec leur ligand sans changer la structure globale du domaine PDZ « conventionnel ». Ces extensions jouent aussi un rôle important sur la dynamique de la protéine et sur leur stabilité conformationnelle (114).

Ces extensions peuvent aussi jouer un rôle dans l'orientation relative du domaine PDZ avec ses domaines adjacents. En effet, en allant toujours plus loin sur la notion de domaine, ainsi peut-on parler de domaines PDZ qui sont organisés en

⁸ La définition de domaine, n'est ici qu'une question de vocabulaire et est parfaitement discutable. Nous ne cherchons pas ici à redéfinir la notion de domaine. Pour aller un peu plus loin sur cette notion : la revue de Wang *et al*, (2010) et Luck *et al*, (2012).

ce que nous pourrions appeler des « supra » domaines. Plusieurs études récentes ont mis en évidence l'effet synergique de plusieurs domaines adjacents formant ainsi des homo- ou hétéro « supra-domaine ». Un fait marquant est le trio formé par les domaines PDZ/SH3/Guanylate Kinase que l'on retrouve dans de nombreuses protéines (ZO-1-3, MPP 1-7, CASK, DLG1-5 et CARMA 1-3) (Fig.28). L'affinité du domaine PDZ pour son ligand est, encore une fois, modulée par la présence de domaines adjacents. Ainsi l'affinité du domaine PDZ de ZO-1 et DLG1 chute drastiquement en l'absence des deux autres domaines (115, 116). Ces études biochimiques et structurales soulignent à la fois l'importance de l'extension C-terminal et l'orientation du domaine PDZ avec le domaine SH3 pour l'affinité du domaine PDZ. Une simple mutation à une position clef, qui supprime l'interaction entre le domaine SH3 et le domaine PDZ, est suffisante pour diminuer d'un facteur 8 l'affinité du complexe PDZ/PDZ-BS.

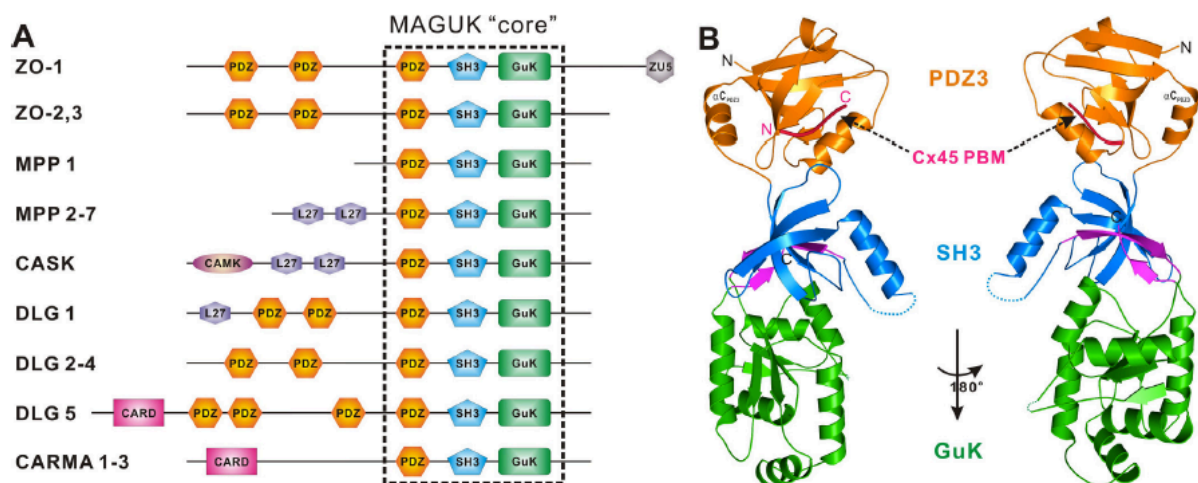


Figure 28 : Organisation en domaine des protéines MAGUK et structure du complexe ZO-1 PDZ3-SH3-GuK/peptide Cx4. (A) Schéma sur l'organisation en domaine des protéines MAGUK. Le « supra domaine » PDZ3-SH3-GuK est mis en évidence avec un carré en pointillés. (B) Structure du complexe ZO-1 PDZ3-SH3-GuK/peptide 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 est représenté en magenta et le peptide Cx45 en rose.

La présence du domaine PDZ peut aussi moduler la fonction d'autres domaines adjacents. C'est le cas, par exemple, de la protéine CASK (117) et de PTPN4 (travail de thèse de Pierre Maisonneuve, Unité de RMN des biomolécules). Pour cette dernière, l'efficacité catalytique du domaine phosphatase de PTPN4 est modulée par la fixation du PDZ-BS sur le domaine PDZ.

Dans le chapitre suivant, nous nous arrêterons plus en détails sur le cas particulier des domaines PDZ de la famille MAST en se basant sur les données présentées dans ce chapitre.

2.4.4. Les partenaires cellulaires de MAST2-PDZ

À ce jour, cinq partenaires du domaine PDZ de MAST2 ont été identifiés : la β -syntrophine (118), la periaxine (119), la protocadherine LKC (120), la protéine échangeuse Sodium/hydrogène 3 (NHE3) (51) et PTEN (52).

Interaction canonique :

Exceptée la β -syntrophine, ces protéines possèdent tous un PDZ-BS en C-terminal, mais seules les interactions des PDZ-BS de la phosphatase PTEN (-ITKV_{COOH}) et de la protocadherine LKC (-TIDL_{COOH}) avec MAST2-PDZ ont été confirmées *in vitro*. Les interactions de la periaxine (AAAV_{COOH}) et de NHE3 (STHM_{COOH}) avec MAST2-PDZ ont été identifiées par immunoblot mais aucune zone d'interaction n'a été déterminée et, contrairement à PTEN et la protocadherine LKC, nous ne savons pas si l'interaction est conservée lorsque le PDZ-BS C-terminal est altéré. Il est en effet possible que MAST2-PDZ interagissent avec un autre mode de fixation des domaines PDZ en interagissant avec un motif interne de NHE3 (121) ou en formant un hétérodimère *via* le domaine PDZ de la periaxine.

Interaction « atypique » :

Il existe, dans la littérature, des exemples d'interactions de domaines PDZ avec un motif interne (Cf *Fixation d'un motif interne*, p51). Dans ce court paragraphe, nous posons la question de savoir si la famille MAST possède une telle particularité. En effet, l'interaction, détectée par autoradiographie, de la β -syntrophine (fusionnée à une étiquette GST) avec MAST2 est un exemple très intéressant. Selon les auteurs de cette étude, les deux protéines forment un hétérodimère impliquant chacun leur domaine PDZ (118). Plusieurs constructions de MAST2 de tailles variables montrent effectivement que des constructions qui ne possèdent *a priori* que le domaine PDZ de MAST2 interagissent uniquement avec les délimitations de la β -syntrophine qui contiennent le domaine PDZ. L'interaction est abolie avec la

suppression du domaine PDZ de la β -syntrophine. Il n'existe cependant pas de structure de ce complexe qui puisse affirmer une interaction domaine PDZ-PDZ. Une interaction de type « *head to tail* » comme pour le complexe nNOS/ β -Syntrophine n'est pas à exclure.

En effet, les auteurs d'une autre étude qui montre une interaction entre le domaine PDZ de la β -syntrophine et un variant de MAST1 chez la souris, connu aussi sous le nom de SAST124 (*Syntrophin Associated Serine/Threonine*), exprimé uniquement dans le cerveau et localisé préférentiellement dans le noyau, dont la partie C-terminale juste en aval du domaine PDZ (à partir du résidu 1117) est tronquée (122), sont allés un peu plus loin dans leur raisonnement. Sur la base des alignements de séquence avec le domaine PDZ de nNOS, les auteurs suggèrent que l'interaction n'implique pas directement le domaine PDZ de SAST124 mais les résidus C-terminaux à la sortie du brin $\beta 5$ du domaine PDZ qui comme pour le complexe nNOS/ β -syntrophine forme une structure en épingle à cheveux qui vient se loger dans le site d'interaction du domaine PDZ de la β -syntrophine (Fig.25 B). L'alignement de séquence à la sortie du brin $\beta 5$ des domaines PDZ de nNOS, O02063, AF-6, CLP36, GRIP-PDZ3, SHP et MAST1-4 indique que les résidus qui forment une structure en épingle à cheveux à la sortie du brin $\beta 5$ du domaine PDZ de nNOS sont majoritairement conservés (Fig.29). Les domaines PDZ de MAST2 et SAST124 partagent 84% d'identité de séquence.

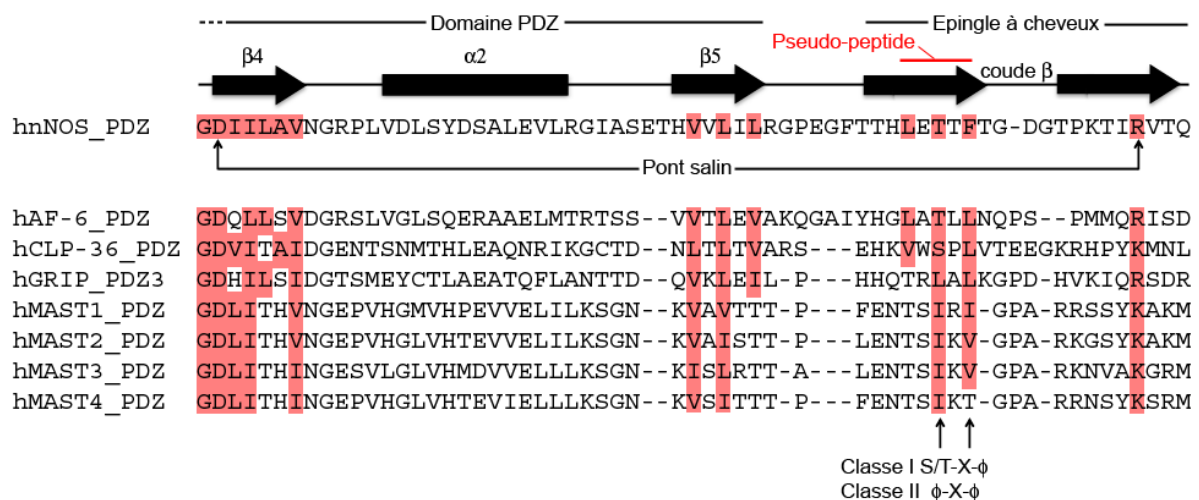


Figure 29 : Conservation d'un site putatif interne dans la famille MAST1-3. Alignement des séquences primaires de l'extension C-terminale en sortie des domaines PDZ humains de nNOS, AF-6, CLP-36, GRIP-PDZ3 et MAST1-4. Les brins β sont représentés par une flèche noire. L'hélice α est notée par un rectangle noir. Les résidus conservés par rapport à la séquence primaire de nNOS sont surlignés en rouge. Adapté à partir de Hillier *et al.*, (1999) (90).

Ainsi, en faisant cette analogie avec le complexe nNOS/ β -Syntrophine, il serait intéressant de vérifier expérimentalement ce mode d'interaction entre les domaines PDZ de MAST2 et la β -syntrophine. En effet, dans la première étude, les auteurs concluaient à une interaction PDZ-PDZ, or la délimitation de leurs constructions comporte le motif putatif d'interaction de type « *head to tail* ».

En conclusion, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour affirmer ou infirmer la formation d'un hétérodimère PDZ-PDZ entre MAST2 et la β -Syntrophine.

MAST2-PDZ forme-t-il un homodimère in vivo ?

Les structures du domaine PDZ des isoformes MAST1, 3 et 4 ont été résolues par cristallographie aux rayons X. Ces trois structures forment un homodimère dans l'unité asymétrique. La surface de dimérisation des domaines PDZ de MAST1 et 3 implique les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ de chaque protomère. Il est intéressant de constater que MAST1-PDZ, MAST3-PDZ et GRASP-PDZ adoptent une conformation similaire du domaine PDZ (Fig.30 A). L'alignement de séquence ne permet pas de dégager une conservation stricte des acides aminés situés à l'interface de dimérisation. En effet, les quatre principaux résidus clefs de GRASP-PDZ Tyr119, Leu121, Phe134 et Cys136 du feuillet $\beta 2\beta 3$ impliqués dans la dimérisation du domaine PDZ sont remplacés (dans l'ordre) par une Ile, une Val, une Met/Ile/Val et un Trp dans la famille MAST. Le caractère hydrophobe de ces résidus est néanmoins conservé. Par ailleurs, GRASP-PDZ et les MAST-PDZ possèdent, par rapport à la majorité des domaines PDZ, des brins $\beta 2$ et $\beta 3$ plus étendus qui fournissent une surface de dimérisation importante (Fig.30 A et B). La surface de dimérisation est différente pour le domaine PDZ de MAST4. En effet, les deux brins $\beta 2$ de chaque protomère forment un feuillet antiparallèle (Fig.30 A). Contrairement à MAST1-PDZ et MAST3-PDZ, le brin $\beta 3$ n'intervient pas dans la dimérisation du complexe. Seules la valine et l'isoleucine en bas du brin $\beta 2$ forment des contacts de Van der Waals.

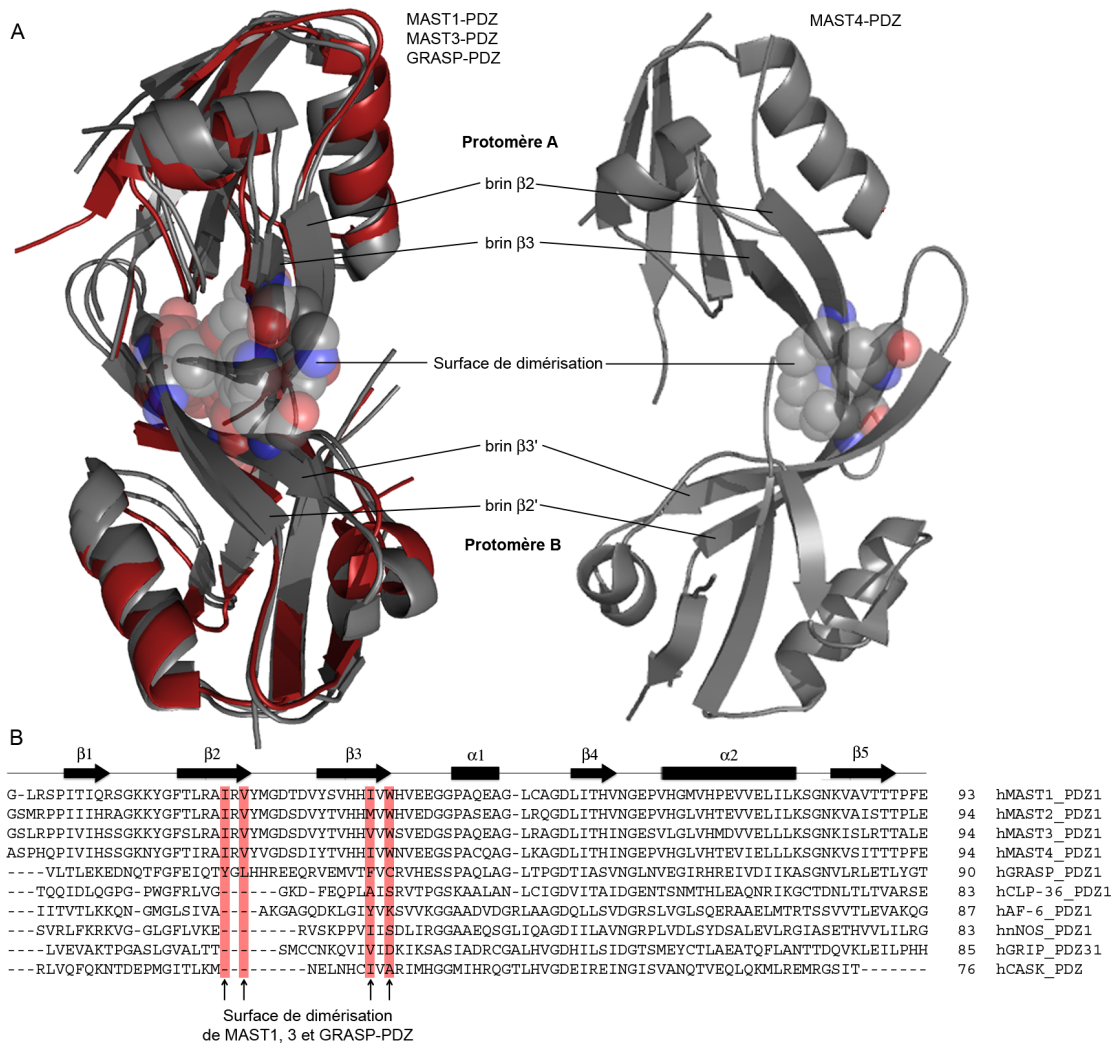


Figure 30 : Surface de dimérisation des domaines PDZ de la famille MAST. (A, panneau de gauche) Alignement des structures cristallographiques du dimère de GRASP-PDZ (en rouge, code PDZ : 2EG0) avec MAST1-PDZ et MAST3-PDZ (en gris, code PDB : 3PS4 et 3KHF). (A, panneau de droite) Structure cristallographique du dimère de MAST4-PDZ. La surface de dimérisation est représentée par des sphères. (B) Alignement de la séquence primaire de domaines PDZ neuronaux humains. Les résidus hydrophobes qui participent à la dimérisation du domaine PDZ de GRASP et de la famille MAST sont surlignés en rouge et indiqués par des flèches. Les structures secondaires de MAST1-PDZ sont représentées le long de la séquence.

Choix des constructions de MAST1,3,4-PDZ:

La structure cristallographique des trois domaines PDZ de MAST a été résolue par le consortium de génomique structurale, à Oxford. Pour faciliter la cristallisation, une méthode systématique a été mise en place en rajoutant en C-terminal du brin $\beta 5$ un PDZ-BS exogène (123). Cette technique leur a permis de cristalliser de nombreuses structures oligomériques de domaines PDZ dont celles de MAST1, 3 et 4. MAST1-PDZ et MAST3-PDZ forment ainsi un dimère où chaque PDZ-BS d'un protomère se loge dans le sillon de l'autre protomère (Fig.31 A). Ces

structures n'ont jamais été publiées dans un journal scientifique et aucune étude en solution sur l'autoassociation des MAST1,3,4-PDZ n'a encore été réalisée. Il est donc difficile de discuter du choix des expérimentateurs pour la séquence du PDZ-BS exogène C-terminal (-*QSLV*_{COOH} pour MAST1-PDZ et -*ETSV*_{COOH} pour MAST3-PDZ) et pour son lieu d'insertion (après la Thr1057 de MAST1 et la Thr1040 de MAST3). Ce choix, sans doute involontaire, permet que la séquence du PDZ-BS C-terminal exogène s'aligne parfaitement avec le PDZ-BS putatif interne défini plus haut (Fig.31 B).

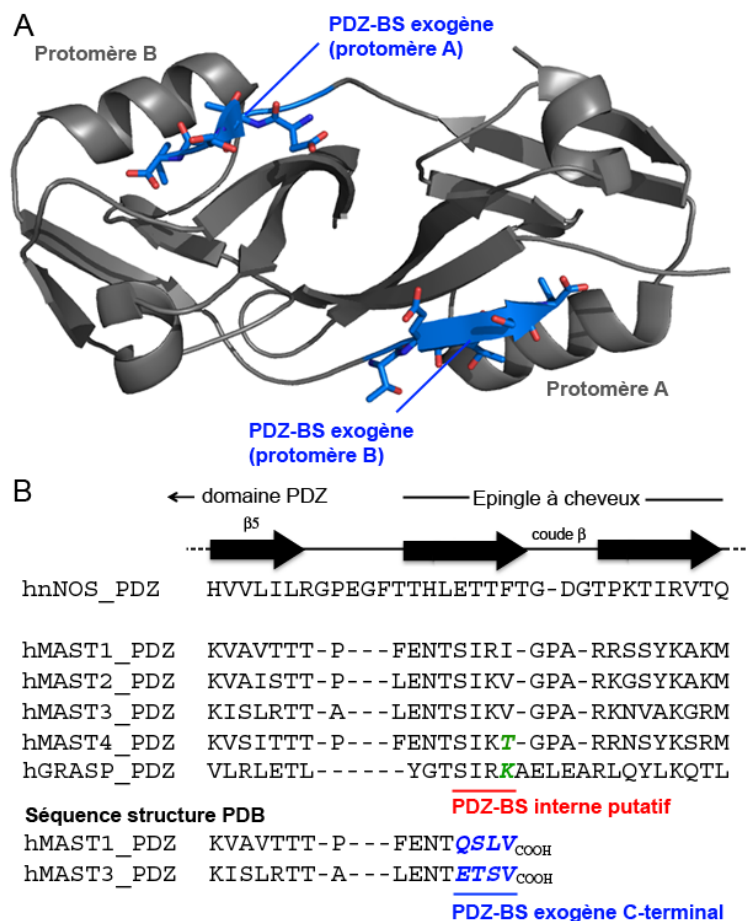


Figure 31 : Fixation du PDZ-BS de MAST1-PDZ et MAST3-PDZ. (A) Structure cristallographique du dimère de MAST3-PDZ. Le PDZ-BS exogène C-terminal de MAST3-PDZ est représenté en bleu. (B) Alignement de la séquence des vingt acides aminés à la sortie du brin β5. Le PDZ-BS interne putatif est souligné en rouge. La séquence primaire du PDZ-BS exogène C-terminal est indiquée en italique soulignée en bleu. Les résidus qui ne respectent pas le site consensus du PDZ-BS sont indiqués en vert et en italique.

MAST4 et GRASP ne possèdent pas de PDZ-BS putatif interne d'après l'analyse de séquence. Cependant le site de fixation de GRASP, lorsque GRASP est sous une forme oligomérique inactive, est auto-inhibé par la fixation, en *trans*, de son PDZ-BS en C-terminal (-*ESQL*_{COOH}).

Avec toutes ces données parcellaires, nous posons donc aujourd'hui la pertinence biologique des dimères observés par ces données cristallographiques sachant que la dimérisation de GRASP-PDZ est un moyen de régulation dans la cellule et que MAST1-PDZ et MAST3-PDZ autoassociés adoptent la même

conformation. La question est maintenant ouverte afin de comprendre le rôle dans la cellule de la dimérisation possible du domaine PDZ de la famille MAST.

2.4.5. Régulation inter-domaine de l'activité catalytique du domaine kinase de MAST2

Nous ne connaissons ni le mécanisme de régulation de l'activité du domaine catalytique de MAST2 ni la spécificité de son substrat bien que deux ligands aient été identifiés : la protéine NHE3 (51) et le domaine C-terminal de la phosphatase PTEN (52). L'efficacité de phosphorylation de PTEN dépend de l'interaction du domaine PDZ avec le PDZ-BS de PTEN. De plus, la présence du domaine PDZ de MAST2 induit une autophosphorylation de MAST2. Ces informations constituent un point de départ très intéressant pour envisager l'étude mécanistique de l'activité catalytique de MAST2.

Les deux domaines ont-ils évolué et fonctionnent-ils de manière synergique ? et la fixation du ligand sur le domaine PDZ de MAST2 peut-il induire le passage du domaine catalytique de MAST2 dans une conformation active (autophosphorylation, allostérie...) ?

La recombinaison des gènes codant pour des domaines de fonctions différentes a été proposée pour être une source majeure d'innovation évolutive (41). Dans un premier temps, il s'agit de regarder si au cours de l'évolution certains résidus, indispensables pour un fonctionnement synergique interdomaine, ont été conservés. Cependant, nous nous confrontons à une très faible source de données. Parmi les 518 kinases humaines identifiées, la combinaison intramoléculaire entre un domaine kinase et un domaine PDZ ne se retrouve que dans la famille MAST1-4 et la protéine CASK qui appartient à la famille des kinases CAMK. Cette protéine est composée d'un domaine kinase et d'un domaine PDZ en aval séparé par un « *linker* » qui possède deux domaines L27⁹. En aval du domaine PDZ, CASK possède aussi un domaine SH3⁷ et un domaine guanylate kinase. Le domaine PDZ, comme pour MAST2, augmente l'efficacité de phosphorylation du substrat (117). Le domaine kinase ne possède que 26% d'identité de séquence avec le domaine

⁹ L27 provient du nom des deux premières protéines qui ont été découvertes portant ce motif: Lin-2 et Lin-7. SH3 signifie SRC homology 3 domaines.

kinase MAST2 et 17% avec le domaine PDZ. L'analyse des séquences ne nous a pas permis de dégager de motifs spécifiques communs aux deux protéines.

Les domaines kinase et PDZ sont séparés par 213 acides aminés pour la protéine CASK et par 250 acides aminés pour la famille MAST. Nous avons vérifié sur cette longue séquence de MAST2 s'il y avait aussi des domaines L27 bien que ceux-ci ne soient pas nécessaires pour l'efficacité de phosphorylation de CASK. Ces domaines, composés de 50 à 60 acides aminés, forment 3 hélices et s'autoassocient en hétéro ou homodimères. Cependant, la séquence primaire du « linker » de MAST1, 2, 3 et 4 est très peu conservée (<13% d'identité de séquence), alors que le domaine kinase, possède une identité de séquence de plus de 90% et que le domaine PDZ a une identité de séquence entre 80 et 90%. L'identité de séquence du « linker » de MAST2 avec celui de CASK est aussi très faible (16%). Il est pourtant intéressant de noter que la prédiction de structure secondaire sur le « linker » de MAST2 suggère la présence d'hélices aux mêmes positions que le 2^e domaine L27 de CASK (Fig.32). L'identité de séquence n'est pas plus élevée que sur l'ensemble de la séquence du « linker ».

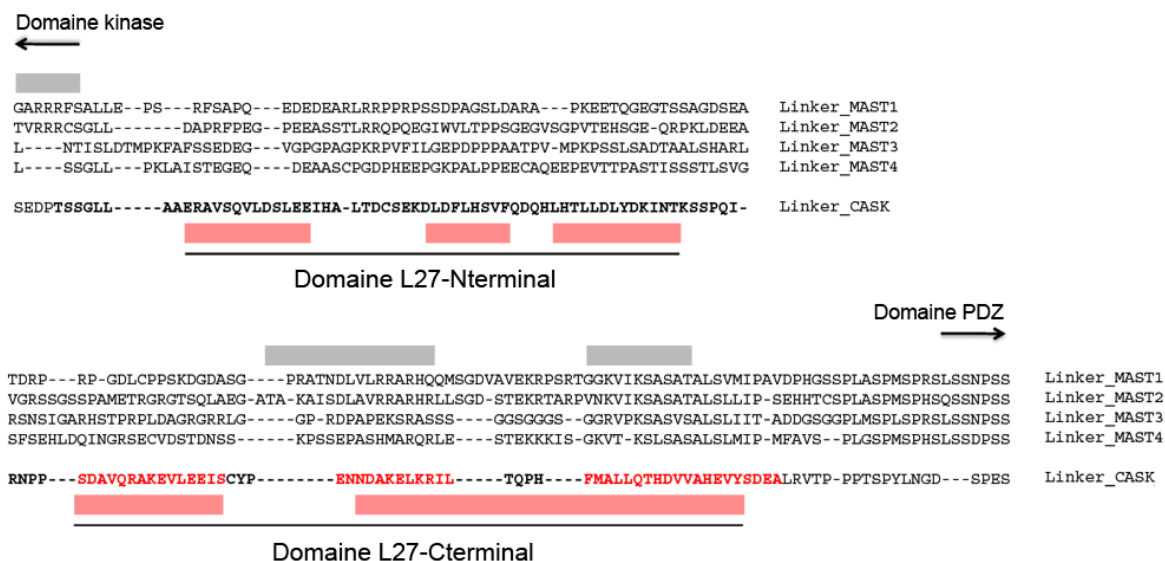


Figure 32 : Identification des domaines L27 putatifs de la famille MAST. Alignement de la séquence primaire du « linker » de MAST1-4 avec la séquence primaire du « linker » de CASK. Les acides aminés en gras correspondent à la délimitation des domaines L27 de CASK. Les résidus en rouge correspondent aux acides aminés qui forment une hélice dans la structure résolue par RMN (code PDB : 1Z8L). Les rectangles rouges correspondent à la prédiction de structures secondaires des hélices α pour la séquence de CASK. Les rectangles gris correspondent à la prédiction de structures secondaires des hélices α pour la séquence de MAST2.

Il reste encore certainement des domaines qui n'ont pu être identifiés sur la seule base d'alignement de séquence. En effet, au moins deux tiers des acides aminés de MAST2 n'ont pas de domaine défini.

2.5. La fonction cellulaire de MAST2

La fonction de MAST2 n'est pas clairement définie et nous ne connaissons pas le mécanisme de régulation de son activité. MAST2 s'exprime de manière ubiquitaire avec un taux d'expression variable selon le type cellulaire (Fig.13) (46). Cependant, la concentration intracellulaire de MAST2 dans une cellule semble être un facteur important pour la régulation de l'homéostasie cellulaire. Plusieurs études ont lié la surexpression de MAST2 avec le cancer du sein (124), des ovaires (125) et de la prostate (126). Récemment, une différence d'épissage des exons de MAST2 a été corrélée avec l'apparition de maladies neurodégénératives (127). Dans les neurones, MAST2 a de plus été identifiée comme un inducteur de la rétractation des neurites et un inhibiteur de l'élongation des neurites qui sont des marqueurs de la survie neuronale (36). En effet, une large étude du kinome a permis de regrouper, à partir de l'extinction des gènes de 750 kinases par ARN interférence, les kinases impliquées directement ou indirectement dans le contrôle de la pousse des neurites.

2.6 Prémisse d'une histoire d'un ménage à trois

Le domaine PDZ de MAST2 est une cible du PDZ-BS de la glycoprotéine G du virus de la rage. Nous aurons l'occasion de revenir à plusieurs reprises sur ces données dans la partie des résultats. Un lien existe entre MAST2, la glycoprotéine G et le déclenchement de la survie dans les neurones infectés avec un troisième protagoniste : PTEN. MAST2 et PTEN ont tous les deux été décrits comme inhibiteurs de la survie neuronale (36, 128) . Notre hypothèse au début de ce projet, est que l'interaction de MAST2-PDZ et du PDZ-BS de la phosphatase PTEN (52) est essentielle dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Nous proposons que, dans une cellule infectée par le virus de la rage, le PDZ-BS de la glycoprotéine G virale inhibe la formation du complexe MAST2/PTEN (Fig.33).

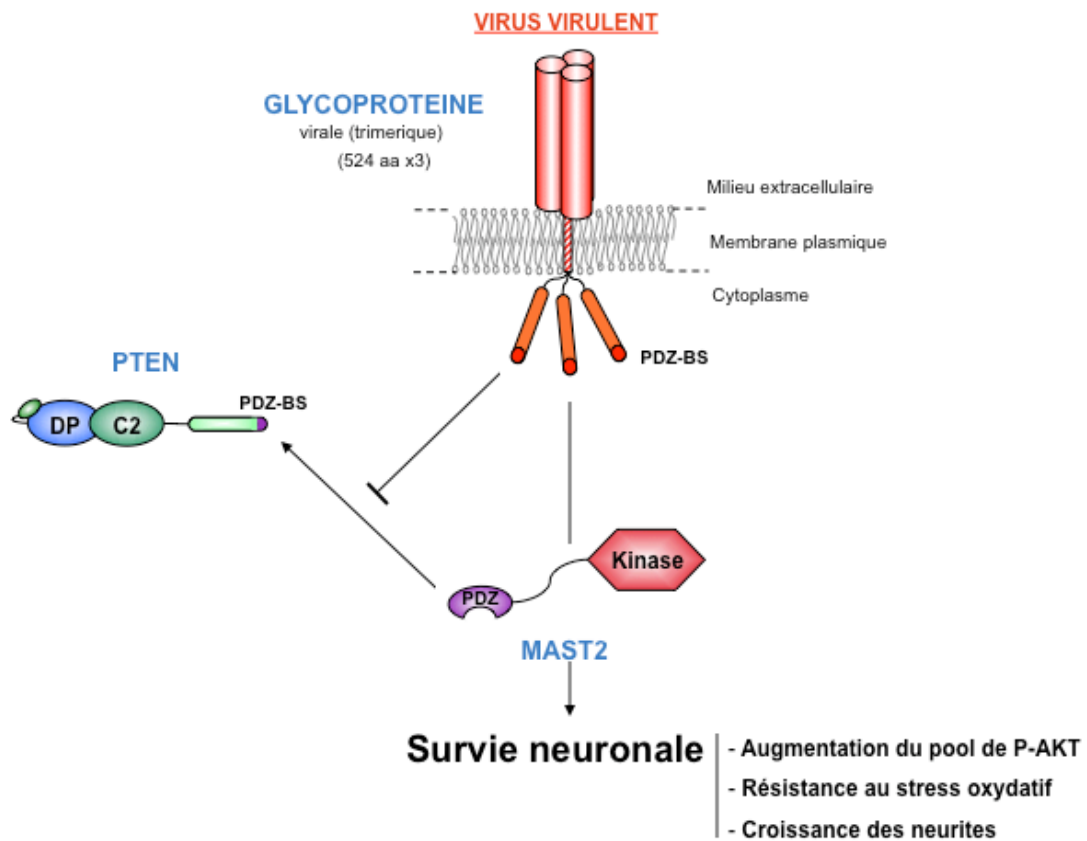


Figure 33 : Un ménage à trois. Lors de l'infection par la souche virulente, la glycoprotéine portant le site de fixation au domaine PDZ interagit avec MAST2-PDZ. La glycoprotéine inhibe la formation du complexe PTEN/MAST2 qui a pour conséquence, selon notre hypothèse, d'être responsable des phénotypes de survie observés.

Dans le prochain chapitre, nous nous arrêterons donc sur la phosphatase PTEN pour compléter notre compréhension sur les mécanismes de survies déclenchés par la glycoprotéine virale.

Chapitre 3

Phosphatase and TENsin homolog deleting on chromosome TEN (PTEN)

De par son mode de vie et des modifications de son environnement, l'Homme est confronté à une recrudescence de cancers. En 2008, l'OMS estimait à 13% la proportion de morts liées au cancer et prévoit une augmentation de plus de 30% d'ici 2030. Bien que plus de 1/3 des cancers pourraient être soignés avec un dépistage précoce, et que 40% d'entre eux pourraient être évités grâce à une meilleure hygiène de vie, l'avancée des connaissances sur les mécanismes de régulation des voies contrôlant la vie et la mort des cellules reste déterminante pour une lutte anti-tumorale efficace et complète.

La protéine humaine PTEN (PTEN) est la deuxième protéine la plus mutée après p53 et responsable de nombreux cancers. PTEN a été découverte en 1997 par deux équipes qui cherchaient à isoler un gène suppresseur de tumeur sur le chromosome 10q23 (129, 130). À 15 jours d'intervalle, ces équipes ont montré que la délétion homozygote du gène PTEN chez l'Homme était corrélée avec plus de 90% des tumeurs primitives du cerveau (glioblastomes) et que des mutations spécifiques étaient, elles aussi, corrélées avec l'apparition de tumeurs dans de nombreux tissus cellulaires. Dès 1996, une équipe avait fait le lien entre le locus du chromosome 10q23 et le syndrome de Cowden (maladie génétique avec forte probabilité de développer des tumeurs malignes) (131). 80% des familles atteintes par le syndrome de Cowden possèdent une mutation germinale sur le gène de PTEN (132). L'attention portée à cette protéine depuis, n'a cessé de croître (Fig.34) faisant de cette protéine une cible thérapeutique majeure.

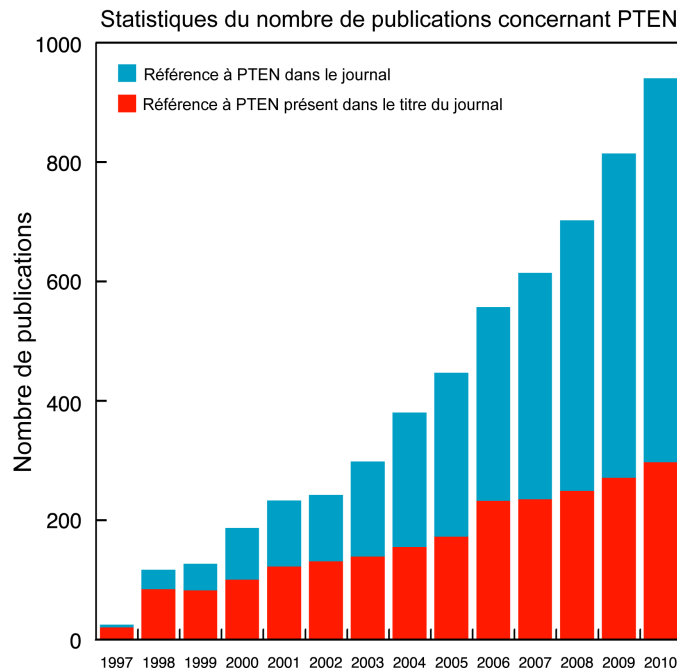


Figure 34 : Nombre de publications se référant à PTEN de 1997 à 2010. Source tirée de Pubmed.

Ces 15 ans de recherches sur PTEN ont révélé un niveau de régulation extrêmement fin et complexe permettant à PTEN de contrebalancer certaines voies de survie. L'analyse des phénotypes cellulaires et la caractérisation des caractéristiques moléculaires de PTEN ont permis de mieux appréhender les différentes pathologies liées à l'altération de la fonction de PTEN.

Je vais dans ce dernier chapitre exposer, dans un premier temps, l'état actuel des savoirs concernant la régulation de l'activité de PTEN, puis son implication dans les différentes pathologies connues.

3.1. Délimitation des domaines de PTEN

La protéine PTEN humaine est composée de 403 acides aminés. Elle possède 2 larges domaines : un domaine phosphatase de 172 acides aminés en N-terminal (Fig.35, en vert) et un domaine C2 de 160 acides aminés en C-terminal (Fig.35, en rouge). Ces deux domaines sont séparés par une séquence de 5 acides aminés (en noir). Les deux extrémités N-terminale (1-14) et C-terminale (352-403) de PTEN ne sont pas structurées mais jouent un rôle essentiel dans la localisation et la régulation de l'activité anti-proliférative de PTEN.

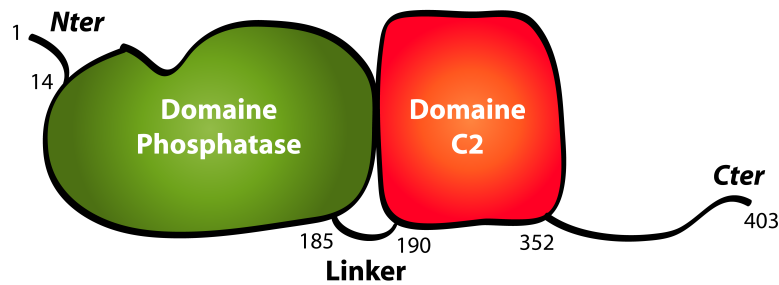


Figure 35 : Représentation schématique de PTEN. Le domaine phosphatase est représenté en vert et le domaine C2 en rouge. Les parties non structurées sont représentées par un trait noir.

3.1.1. Le domaine Phosphatase

La nature des substrats (protéines, acides nucléiques, sucres, lipides ...) des phosphatases humaines est extrêmement variée. Devant la très grande diversité de phosphatases, nous nous focaliserons uniquement sur une partie des phosphatases protéiques et lipidiques. Quatre superfamilles de phosphatases ont été isolées selon la spécificité de l'enzyme pour son substrat protéique ou lipidique. Ce cloisonnement n'est pas hermétique, il existe en effet des phosphatases avec une double spécificité : PTEN fait partie de cette catégorie qui représenterait 40% de la totalité des phosphatases identifiées (61/150) (133). Cependant, cette estimation est à prendre avec précaution. Un domaine catalytique peut, en effet, présenter une spécificité de substrats relativement large *in vitro* mais les contraintes *in vivo* (localisation subcellulaire, concentration, domaine adjacent...) peuvent réduire considérablement le spectre des substrats de la phosphatase. Le camembert ci-dessous (Fig.36) illustre la répartition actuelle des phosphatases humaines identifiées. De nombreuses inconnues subsistent cependant. Par exemple, l'identification de la première et unique, à l'heure actuelle, « Protein Histidine Phosphatase » humaine est récente (2002) en comparaison des premières études de Fisher et Krebs commencées en 1959 sur la phosphorylation des protéines.

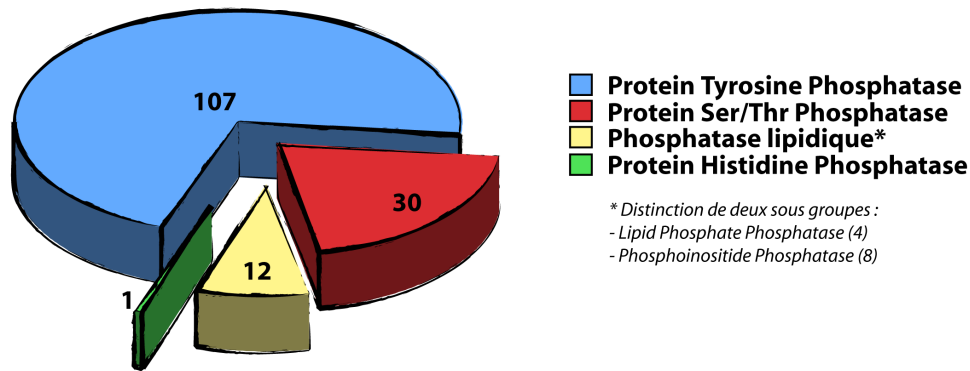


Figure 36 : Représentation de la répartition des différentes familles de phosphatases humaines. Le camembert illustre la synthèse issue des différentes sources (134-139).

Les « Protein Tyrosin Phosphatases »

PTEN a initialement été classée avec la famille des « Protein Tyrosine Phosphatase » (PTP). Elle possède une signature invariante caractéristique des PTP $\text{Cys(X)}_5\text{Arg}$ qui correspond à la boucle de fixation du groupement phosphate hydrolysable du substrat. La cystéine accepte le groupement phosphate à partir du substrat de la phosphotyrosine pour former un intermédiaire (Fig.37). La chaîne latérale de l'arginine permet de maintenir l'orientation correcte du groupement phosphate grâce au réseau de liaisons hydrogène. Le troisième acide aminé essentiel à cette catalyse, est un aspartate qui joue le rôle de donneur de proton au groupement anionique partant.

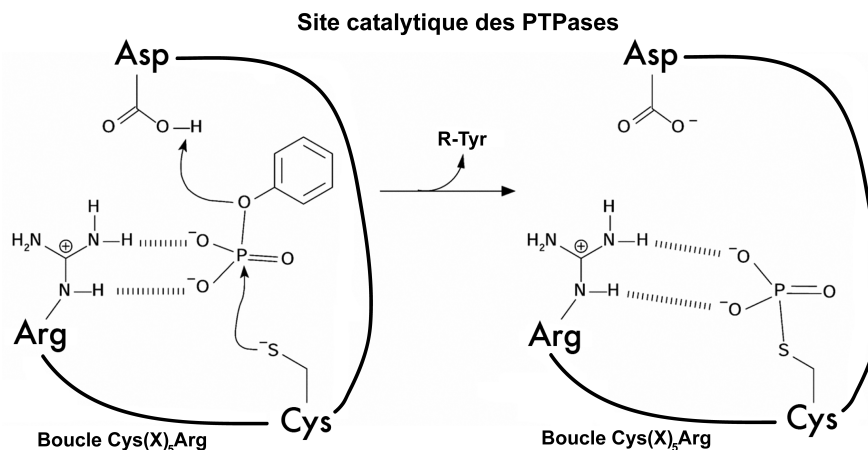


Figure 37 : Représentation du site catalytique des PTP. La fixation du groupement phosphate dans la poche catalytique au niveau de la boucle $\text{Cys(X)}_5\text{Arg}$, conduit à l'hydrolyse du substrat phosphorylé par l'intermédiaire de l'aspartate.

Malgré cette signature, la topologie des domaines catalytiques n'est pas conservée chez tous les membres de cette famille. Il a été proposé que la fonction

de protéines appartenant à la famille des PTP initialement différentes ait convergé vers une fonction commune (hydrolyse d'un groupement phosphate sur son substrat) tout en conservant une architecture « ancestrale ». Des études phylogénétiques et la résolution des structures tridimensionnelles des domaines catalytiques de certaines protéines ont mis en évidence que ces domaines partageaient un ancêtre commun avec d'autres domaines de fonction différente largement répandus dans les trois grands groupes phylogénétiques du vivant (procaryotes, eucaryotes et archées).

Les PTP se divisent en 4 classes qui sont présentées dans la figure 38.

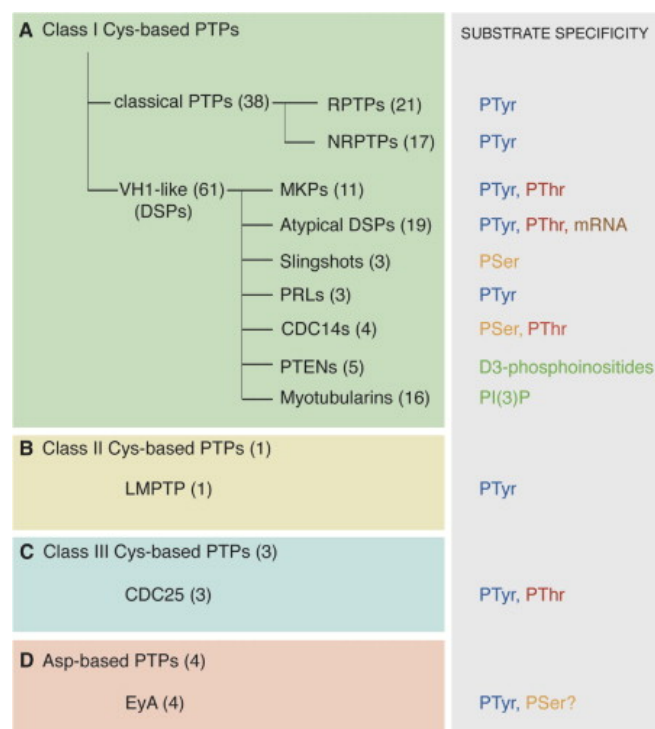


Figure 38 : Classification et spécificité des substrats des PTP. Les familles de PTP sont classées par couleur : classe I « Cys-based » PTP (vert), classe II « Cys-based » PTP (jaune), class III « Cys-based » PTP (bleu), et « Asp-based » PTP (saumon). La spécificité des substrats de chaque groupe est listée dans le tableau de droite. D'après Alonso *et al* (2004) (134).

- La classe I représente plus de 92% de la famille des PTP humaines (99/107). Cette classe est très diversifiée et peut être séparée en plusieurs sous-groupes selon un critère fonctionnel et modulaire. Ainsi sont regroupées les PTP récepteurs-like (RPTP) transmembranaires, les PTP non récepteurs-like (NRPTP) et plusieurs sous-groupes de protéines avec une double spécificité (DSP). Parmi celles-ci, nous retrouvons les MAP kinases phosphatases (MKP), les DSP dites

atypiques (« atypical » DSP) et 3 sous-groupes minoritaires composés des slingshots, des PRLs et des CDC14. Nous porterons une attention toute particulière aux deux derniers sous-groupes : celui de PTEN et des myotubularines qui appartiennent aux PTP/DSP capables d'hydrolyser spécifiquement le phosphate des dérivés phosphatidylinositols. PTEN déphosphorylent avec une plus grande spécificité le phosphate D3 des phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate alors que les myotubularines déphosphorylent surtout le phosphate D3 des phosphatidylinositol-3-phosphate. Ces phosphatases sont schématiquement représentées ci-dessous avec la délimitation de leurs différents domaines respectifs (Fig.39).

- La classe II compte une seule enzyme : la « *Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase* » (LMPTP). Comme son nom le souligne, cette protéine (18kDa) est plus petite que les autres PTP (140). Sa topologie est similaire à celle des arsenates reductases de *Saccharomyces cerevisiae* et *Bacillus subtilis* (141). Bien que son rôle physiologique ne soit pas encore clairement identifié, LMPTP est impliquée avec de nombreuses pathologies telles que : la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme, le diabète, la cardiomyopathie ou encore la maladie d'Alzheimer (142).

- La classe III est représentée par trois Cdc25 phosphatases. Ces domaines possèdent la même topologie que les domaines Rhodaneses. La fonction des Cdc25 aurait donc évolué en détournant la fonction sulfurtransférase initiale (143). Les Cdc25 phosphatases jouent un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et de la stabilité du génome (144).

- Le mécanisme d'hydrolyse de la classe IV est différent des trois autres classes : il est dépendant d'un cation nécessaire à l'hydrolyse du groupement phosphate. La classe IV se trouve aussi au croisement de deux familles d'enzymes : les PTP et les « *Haloalkanoic Acid Dehalogenase* » (HAD) (145). À ce jour, quatre protéines EYA ont été expérimentalement identifiées comme PTP et impliquées dans le développement embryonnaire des yeux, des muscles, les reins et les oreilles (146).

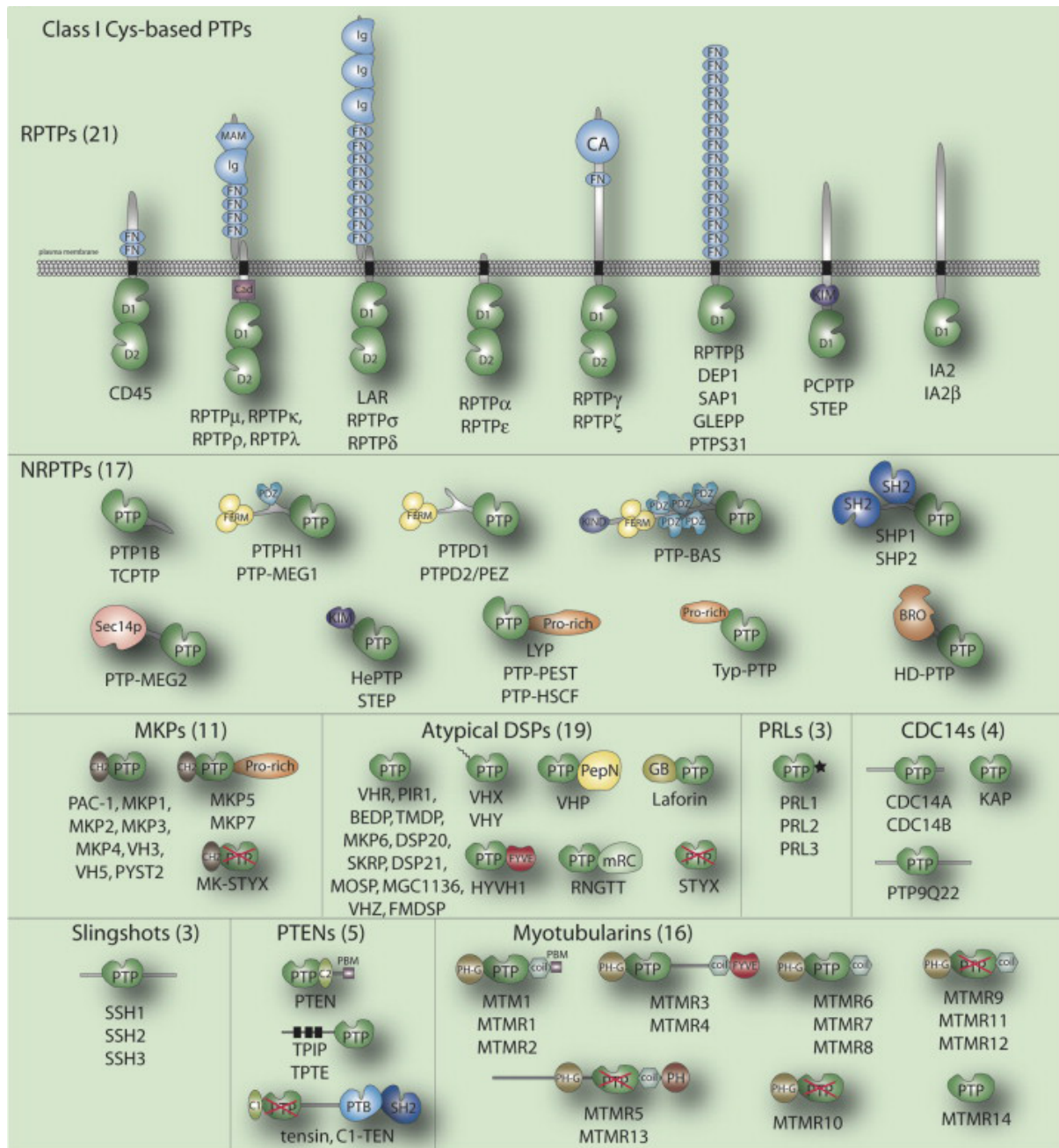


Figure 39 : Vue schématique de la composition de tous les membres de la famille PTP de classe 1. Abréviations : BRO, baculovirus BRO homology; C1, protein kinase C conserved region 1; C2, protein kinase C conserved region 2; CA, carbonic anhydrase-like; CAAX box, farnesylation signal; CH2, cdc25 homology 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, RPTP μ 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 catalytiquement est *a priori* inactif. D'après Alonso *et al* (2004) (134).

PTEN : Une phosphoinositide 3-phosphate phosphatase

Dès lors qu'il fut établi que la phosphatase PTEN était un gène suppresseur de tumeur, l'identification des substrats de PTEN présentait un intérêt majeur. Ce sont les recherches de T. Maehama et J. E. Dixon en 1998 qui proposèrent les premiers que le substrat *in vivo* de PTEN pouvait être un dérivé phosphate du phosphatidylinositol (PtdIns) : le PtdIns(3,4,5)P₃ (147). Rapidement, d'autres groupes ont démontré que la déphosphorylation du PtdIns(3,4,5)P₃ par PTEN était liée à sa fonction suppresseur de tumeur (148).

Les phosphoinositides sont des dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol (PtdIns). PtdIns est composé de deux chaînes carbonées et d'une tête polaire inositol qui peut être phosphorylée à partir des trois groupements hydroxyl sur son carbone 3, 4 et 5 par des kinases spécifiques Fig.40.

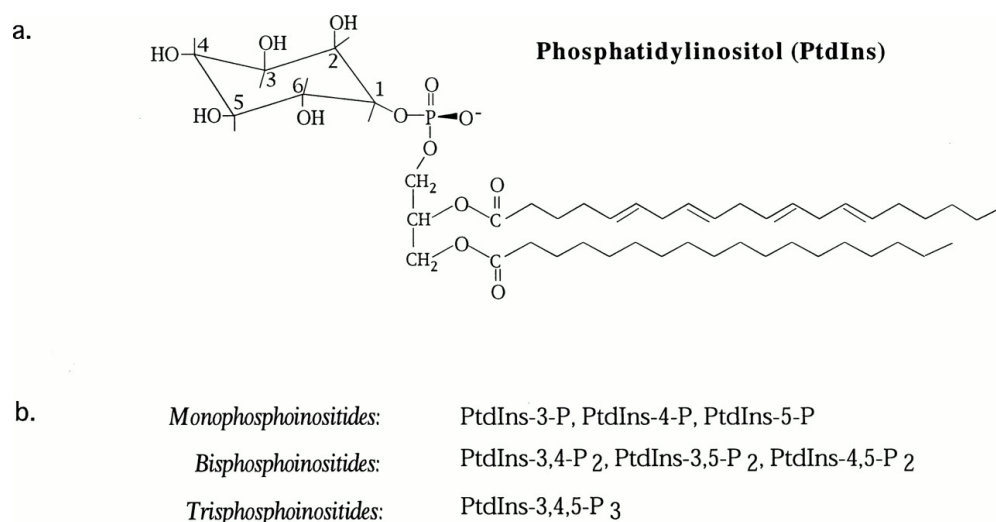


Figure 40 : Représentation de la structure chimique du phosphoinositole. (A) et de ses dérivés phosphorylés (B). D'après Fruman *et al* (1998) (149).

Les phosphoinositides représentent moins de 1% de la totalité des phospholipides (150). Les PtdIns-4-P et les PtdIns-4,5-P représentent respectivement 60% et 30% de la totalité des phosphoinositides (149). Malgré le très faible pourcentage de PtdIns-3,4,5-P, celui-ci joue un rôle précurseur important en interagissant avec des protéines intracellulaires qui participent au maintien de l'équilibre de nombreuses voies de régulation, parmi lesquelles : la prolifération cellulaire, la survie, la réorganisation du cytosquelette, le transport du glucose.

Plusieurs familles de kinases et de phosphatases participent à la régulation complexe de phosphorylation des phosphoinositides (Fig.41). Parmi les phosphatases, nous retrouvons la famille PTEN (PTEN, TPIP et TPTE) et la famille des myotubularines qui participent à l'hydrolyse du phosphate en position 3 des phosphoinositides.

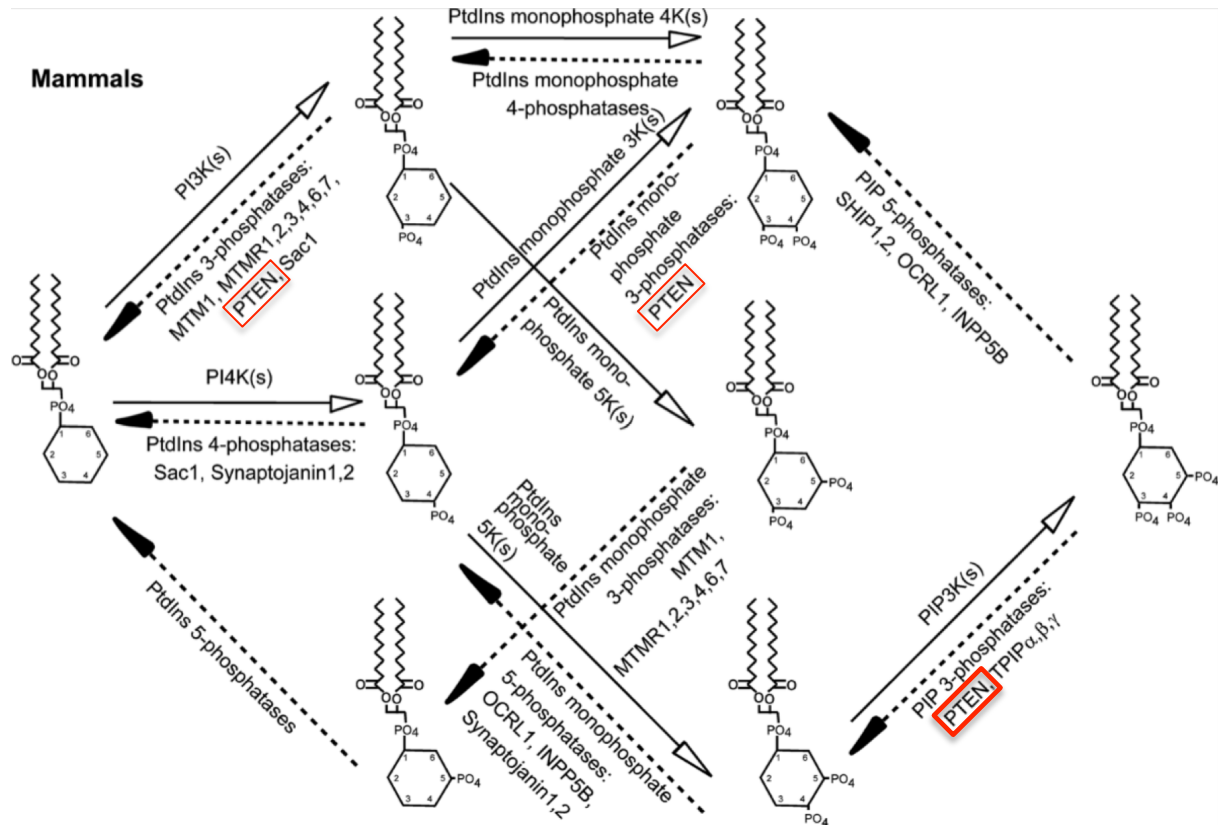


Figure 41 : Métabolisme des Phosphoinositides chez les mammifères. Les kinases et phosphatases identifiées qui régulent la synthèse des phosphoinositides sont indiquées sur le schéma. PTEN est encadré en rouge et déphosphoryle le phosphate en position D-3 du groupement inositol. PTEN déphosphoryle préférentiellement les PIP3 en PIP2 et est indiqué par un encadrement rouge en gras D'après Liu *et al* (2010) (150).

La structure de PTEN a été résolue en 1999 par cristallographie aux rayons X (151). Le domaine catalytique de PTEN est composé d'un feuillet central de 5 brins β entouré de 2 hélices α d'un côté de 4 hélices α de l'autre (Fig.42 B). La comparaison de la poche catalytique de PTEN avec la structure d'une PTP « classique » (PTPB1, première PTP caractérisée en 1988 (152)) montre que le site catalytique est plus large (151), condition qui semble déterminante pour la spécificité du substrat (Fig. 42 A).

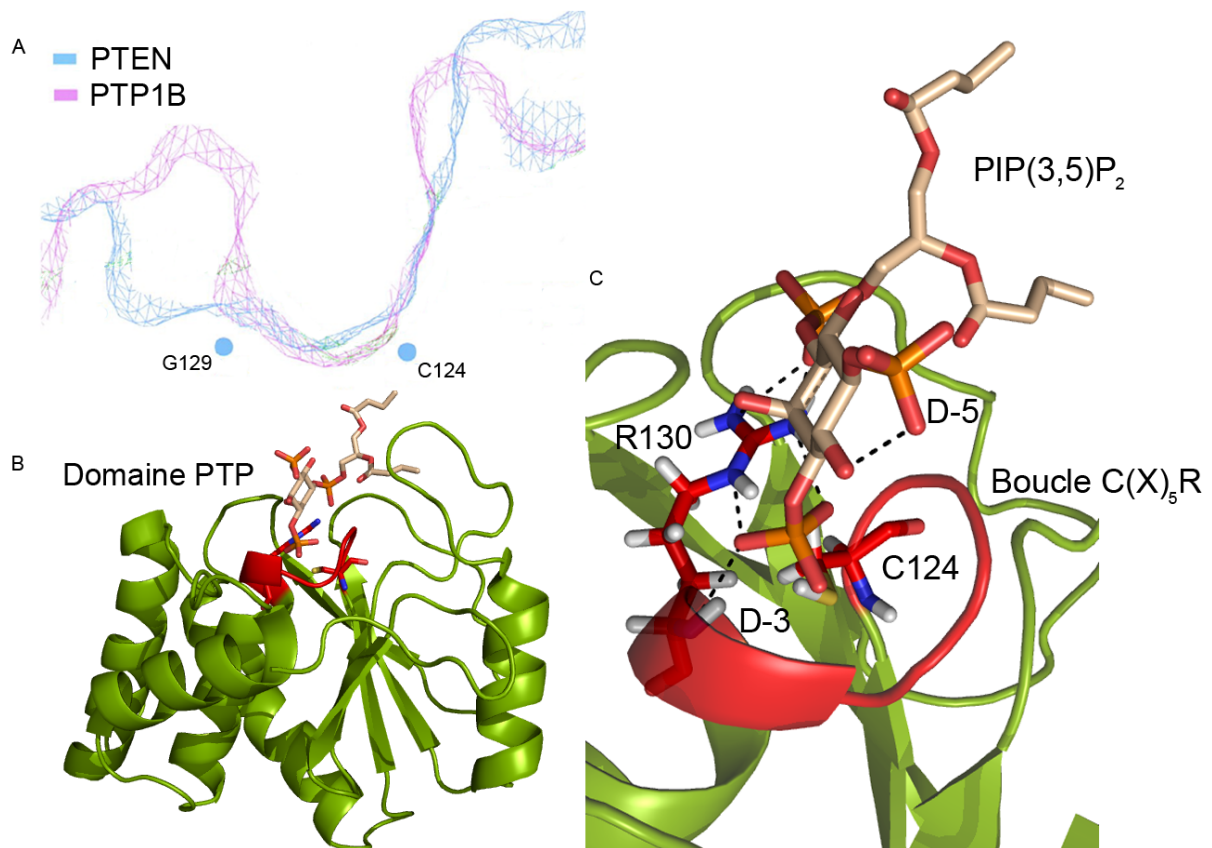


Figure 42 : Structure cristallographique du domaine catalytique de PTEN. (A) Coupe transversale de la surface de la poche du site actif de PTEN (en bleu) et de PTP1B (en rose), D'après Lee *et al* (1999) (151). (B) Représentation du domaine PTP de PTEN en vert, code PDB 1D5R. La boucle C(X)₅R est représentée en rouge. Les deux résidus de la boucle strictement conservés Arg130 et Cys124 sont représentés en bâtonnet rouge. La molécule PI(3,5)P₂ est représentée en bâtonnet beige. Code PDB 1ZVR. (C) Vue du site catalytique de PTEN montrant les ponts hydrogène (pointillés noirs) s'établissant avec le phosphate D3 de PI(3,5)P₂.

La superposition de la boucle Cys(X)₅Arg à partir de la structure de PTEN (code pdb :1D5R) et myotubularine 2 MTMR2 (code pdb : 1ZVR) nous a permis de positionner virtuellement la molécule PI(3,5)P₂ dans la poche catalytique de PTEN. Cette modélisation permet d'orienter le phosphate D-3 dans la poche et de proposer un mécanisme de déphosphorylation du PtdIns(3,4,5)P₃ par PTEN qui est semblable à celui des tyrosines (Fig.42). En effet, l'Arg130 établit plusieurs liaisons hydrogènes avec le phosphate D3, alors que la Cys124 est positionnée en face du phosphate D3 jouant son rôle d'accepteur (Fig.42 C). La constante de dissociation de PTEN pour le substrat PtdIns-3,4,5-P est de 59 μM avec une efficacité ($K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) de $7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (153).

PTEN possède-t-elle une activité phosphatase protéique ?

Cette question a été abordée dès le début de la découverte de PTEN après sa classification parmi les PTP. Cette question reste toujours ouverte à la discussion. PTEN possède une double spécificité (protéique et lipidique), puisque qu'elle est capable de déphosphoryler des tyrosines, des sérines, et des thréonines *in vitro* (154, 155). Cependant l'affinité et la vitesse de catalyse sont faibles, voir nulles, en comparaison avec celles de la déphosphorylation de PtdIns-3,4,5-P. La kinase FAK (« Focal Adhesion Kinase »), impliquée dans l'adhésion cellulaire, a été identifiée comme un substrat de PTEN *in vivo* dans des cellules de fibroblastes (NIH 3T3) à partir d'expériences de co-immunoprécipitation. Les auteurs ont mis en évidence que l'état de phosphorylation de FAK dépendait de l'activité du domaine catalytique de PTEN (156). Cependant, ni diminution de la phosphorylation de FAK, ni co-immunoprécipitation avec PTEN n'ont été constatées sur deux autres lignées cellulaires de glioblastomes (U87MG et LN229) (157). Plus récemment, il a été observé que PTEN co-immunoprécipite avec FAK dans des carcinomes colorectaux (cellules HT-29). En appliquant sur les cellules un débit fluide de force variable, les auteurs ont constaté que le niveau de phosphorylation de FAK est corrélé avec la force d'adhésion de la cellule. Cette dernière est inversement proportionnelle à la quantité de PTEN intracellulaire (158). Ainsi, la déphosphorylation de FAK par PTEN induirait une diminution de l'adhésion des cellules.

Une équipe a récemment mis en évidence que PTEN possède une activité phosphatase nucléaire sur le facteur de transcription « Cyclic AMP Response Element-Binding » (CREB) (159). PTEN déphosphoryle Ser133 de CREB et inhibe ainsi sa fonction. L'activité de CREB est dépendante de cette phosphorylation. CREB régule la transcription de gènes impliqués dans la croissance cellulaire.

Enfin, une équipe proposa en 2004 que PTEN-Cter puisse être son propre substrat mais sans apporter d'évidences expérimentales (160). Cette auto-déphosphorylation a été mise en évidence expérimentalement que très récemment à partir d'un peptide de PTEN-Cter (DHYRYSDDTTDSDPENE) phosphorylé par CK2 en présence d' γ -³²P ATP. Ainsi la déphosphorylation de PTEN-Cter permettrait de réguler la fonction inhibitrice de la survie de PTEN (161). Il y a fort à penser que de nouvelles évidences viendront compléter ces résultats très prochainement. À suivre attentivement...

3.1.2. Le domaine C2

La spécificité des phosphatases dépend en partie de la poche catalytique et des changements conformationnels locaux induits par la fixation d'un substrat (162). *In vivo*, l'activité de la protéine dépend aussi de sa localisation cellulaire et de son accessibilité aux substrats. Comme illustré par la figure 39, la diversité des modules qui accompagnent les domaines PTP est remarquable. Ces domaines participent de façon synergique ou indépendante à l'activité spécifique de l'enzyme et à la régulation des voies de signalisation. Dans cette partie, je traiterai plus spécifiquement du domaine C2 adjacent au domaine PTP pour comprendre son rôle dans la fonction de PTEN.

La superfamille des domaines C2

La superfamille des domaines C2 est très répandue chez les eucaryotes. Les domaines C2 s'associent préférentiellement aux lipides et se divisent en 7 familles : AIDA-C2, PTEN-C2, NT-C2, PKC-C2¹⁰, DOCK-C2, PI3K-C2 et B9-C2 (163). On ne retrouve pas d'équivalent chez la bactérie. Il est proposé que ces domaines C2 soient apparus avec les eucaryotes et que la diversité des domaines C2 ait émergé en parallèle de plusieurs structures intracellulaires typiquement eucaryotes, telles que le système de trafic vésiculaire, l'ancrage de l'actine et du cytosquelette aux membranes plasmiques et vésiculaires, la localisation des « small GTPases » aux membranes ou encore la transduction de signaux à partir de phospholipides (163).

La famille de PTEN-C2

La famille de PTEN-C2 est composée de 7 protéines (Fig.43). Le domaine phosphatase est situé systématiquement en amont du domaine C2 séparé par une séquence de 5 à 7 aa.

¹⁰ Cette famille a été la première étudiée. La fixation des PKC-C2 est dépendante de la fixation d'ions Calcium. Ce mode de fixation a très vite été généralisé aux autres domaines C2, faisant des domaines C2 indépendants des ions Calcium une exception. Il est intéressant de constater qu'une étude phylogénétique de 2010 (33) a fait passer les PKC-C2 (seule famille dépendante de la fixation du Ca²⁺) du rang commun à celui d'exception.

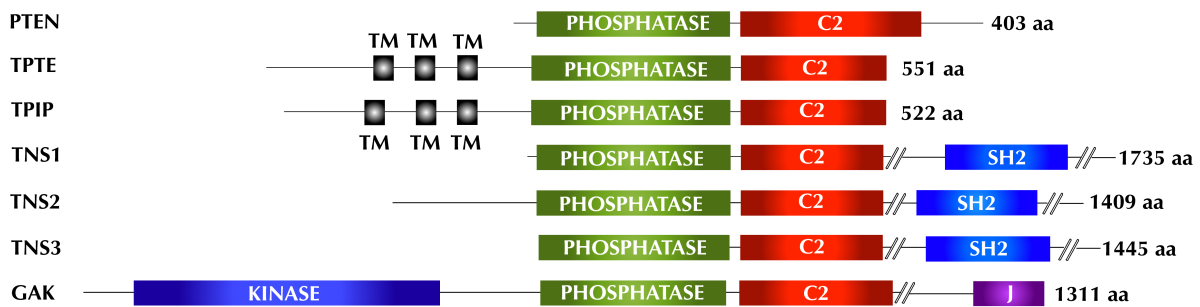


Figure 43 : Alignement des domaines des protéines appartenant à la famille de PTEN-C2. Les segments transmembranaires sont représentés en noir, les domaines phosphatases en vert, le domaine kinase en bleu foncé, les domaines C2 en rouge, les domaines SH2 (domaine α/β de 100aa, liaison à une tyrosine phosphorylée) en bleu clair et le domaine J (domaine de 4 hélices α de 60 aa, liaison à Hsc70, motif conservé HPD (164)) en violet.

Cette famille de protéine illustre la diversité fonctionnelle et spatiale associée à la spécificité des domaines C2 (160, 165). En effet, TPTE est localisé préférentiellement dans le golgi et TPIP dans le réticulum endoplasmique des cellules testiculaires. Leurs fonctions cellulaires sont encore très mal définies, bien qu'une activité phosphoinositide 3-phosphate ait été mise en évidence (166). La famille des protéines tensins 1, 2 et 3 (TNS1, 2 et 3) est localisée principalement autour de la matrice extracellulaire et du cytosquelette. Elles jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire et exercent une fonction suppresseur de tumeur (167). Pour terminer, la protéine Cyclin-G-associated kinase (GAK) est un cofacteur de la protéine Hsc70 responsable de la décapsulation des vésicules de clathrines (164), mécanisme important de l'endocytose.

Rôle du domaine C2 de PTEN

Le domaine C2 de PTEN est constitué de 161 acides aminés qui forment un tonneau β avec une large boucle C2 (Gly282-Asp312) essentielle pour la fonction suppresseur de tumeur de PTEN. Cette boucle affecte la fixation de PTEN à la membrane et la dégradation de PTEN *in vivo* (168).

La constante de dissociation *in vitro* du domaine C2 pour les vésicules lipidiques composées de POPC¹/POPS¹¹ (8:2) est de 7 μ M (169). Cette affinité augmente d'un facteur 30 en présence du domaine PTP de PTEN, suggérant un effet coopératif des deux domaines pour la fixation de PTEN à la membrane. Das *et al.*, ont mis en évidence que PTEN interagit avec les membranes particulièrement

¹¹ POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; POPS, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine.

riches en lipides chargés négativement tels que les POPS. En comparant l'affinité *in vitro* de PTEN pour des vésicules ayant une composition lipidique proche de la membrane plasmique du feuillet cytoplasmique POPC/POPE¹²/POPS/POPI¹²/cholesterol (12:35:22:9:22) et de la membrane nucléaire côté cytoplasmique POPC/POPE/POPS/POPI (61:21:4:7:7), les auteurs montrent que PTEN se fixe, dans la première condition, avec une affinité de 440nM alors qu'il ne note aucune interaction dans la deuxième condition¹³ présentant moins de lipides chargés négativement.

L'ajout de KCl (500mM), diminue drastiquement l'affinité de PTEN à la membrane d'un facteur 10000 suggérant une interaction essentiellement électrostatique (169) avec une contribution minoritaire des contacts hydrophobes (170). L'étude de la structure de PTEN met en évidence deux « patches » basiques sur le domaine C2 (K221, K223, K266, K267, K269, H272 et K327) et un « patch » basique sur le domaine PTP (R47, R161, K163, K164) pouvant interagir avec les POPS de la membrane plasmique des cellules (Fig.44). La mutation de la séquence 263-K-M-L-K-K-D-K-269 en alanine 263-A-A-G-A-A-D-A-269 ne modifie pas la structure du domaine C2 mais affecte la fixation de PTEN à la membrane *in vitro* (151).

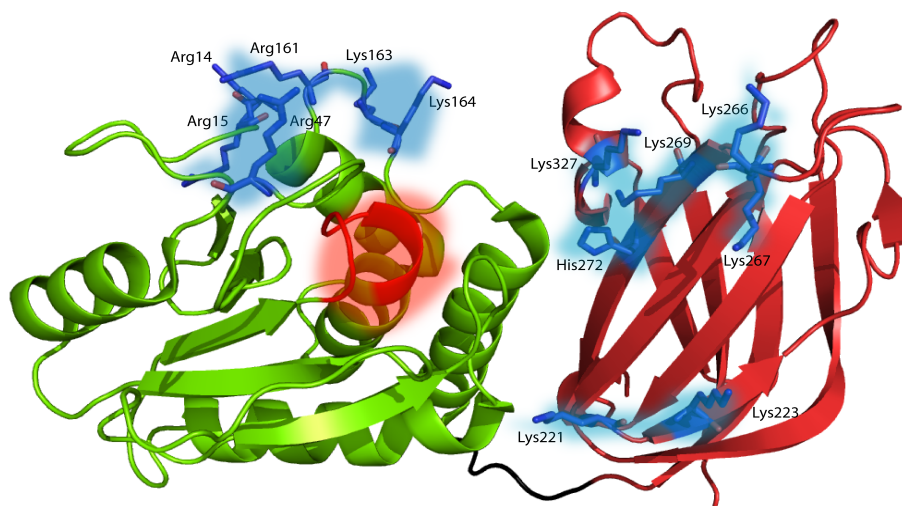


Figure 44 : Vue de la structure cristalline de PTEN. Le domaine PTP est représenté en vert. Le domaine C2 en rouge. Les trois patches basiques interagissant avec la membrane plasmique sont illuminés en bleu, les chaînes latérales illustrées en bâtonnet bleu. La boucle catalytique du domaine PTP est illuminée en rouge.

¹² POPE, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; POPI, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol.

¹³ La différence de composition en cholestérol dans les deux conditions n'est pas mise en cause dans la fixation du domaine C2 à la membrane. La différence de composition des vésicules POPC/POPS (8:2) ou POPC/POPS/cholestérol (6:2:2) n'affecte pas l'affinité *in vitro* de PTEN avec la membrane.

L'interaction de ces résidus basiques avec les POPS permettrait ainsi de présenter correctement la poche enzymatique aux PtdIns(3,4,5)P₃. Les domaines PTP et C2 semblent indissociables pour la fixation de PTEN à la membrane et l'activité catalytique de PTEN. L'interface d'interaction PTP/C2 est un élément essentiel : il suffit de supprimer une liaison hydrogène interdomaine, pour diminuer l'activité catalytique de 85% (151).

3.1.3 La partie N-terminal : effecteur allostérique?

Nous venons de voir que le domaine C2 interagissait avec les POPS des membranes et que le domaine PTP contribuait significativement à l'affinité aux membranes. Redfern *et al* sont allés plus loin dans la mécanistique de fixation de PTEN à la membrane en étudiant la partie N-terminal de PTEN (171).

La partie N-terminale est composée de 22 acides aminés (1-21) sans structure secondaire. Cette étude débouche sur plusieurs observations (171) :

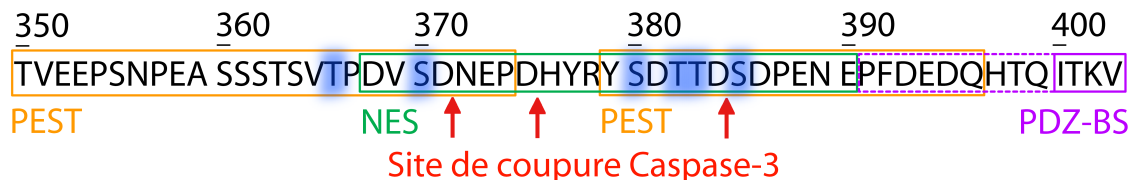
- La suppression des 15 premiers résidus N-terminaux diminue significativement l'activité enzymatique.
- La partie N-terminale se fixe préférentiellement aux PtdIns-4,5-P. Ce nouvel ancrage augmente l'affinité d'un facteur 12 mais la fixation du domaine C2 et PTP aux POPS n'est pas modifiée. PTEN interagit ainsi avec les POPS et les PtdIns-4,5-P de manière synergique et totalement indépendante.
- La fixation de la partie N-terminale aux PtdIns-4,5-P induit un changement de conformation du domaine PTP (expérience réalisée par dichroïsme circulaire). Des études structurales supplémentaires seraient nécessaires pour élucider ce phénomène allostérique car nous ne savons pas quelle région du domaine PTP est concernée. Une piste intéressante est la boucle catalytique « WPD ». En effet, cette boucle, importante pour la catalyse du substrat, adopte, dans de nombreuses PTP, une dynamique de transition ouverte/fermée qui module l'affinité pour le substrat et l'efficacité catalytique (162). Cela n'a encore jamais été mis en évidence avec le domaine PTP de PTEN.

3.1.4. La partie C-terminale : une combinaison d'acides aminés riche en informations

Il est communément admis que les larges régions désordonnées (au-delà de 50 aa) peuvent être essentielles dans la régulation des voies de signalisation (172). Le domaine C-terminal de PTEN (PTEN-Cter) est composé de 53 acides aminés sans structure secondaire et possède une combinaison d'acides aminés riche en informations (Fig. 45) avec :

- Sept sites de phosphorylation impliquant plusieurs kinases: CK2 (173), GSK3- β (174), MAST2 (52) et LKB1 (175).
- Une séquence (368-390) qui code pour un site putatif d'exclusion nucléaire (NES) (176).
- Trois sites de coupure par la Caspase-3.
- Deux séquences PEST¹⁴ (350-374 et 379-396) (177).
- Un site de fixation au domaine PDZ (PDZ-BS) qui permet le recrutement de plusieurs partenaires (MAGI-2 (178), MAGI-3 (179), Dlg1 et MAST2 (52)).

Nous reviendrons plus précisément, dans les paragraphes suivants, sur la conséquence de ces modifications traductionnelles sur la régulation de PTEN.



Site de phosphorylation

Figure 45 : Séquence de PTEN-Cter. Les sites de coupure par la Caspase-3 sont indiqués par des flèches rouges. Les sites de phosphorylations sont surlignés en bleu. Les deux domaines PEST sont encadrés en orange. Le signal d'exclusion nucléaire (NES) est indiqué par un cadre vert. Le site de fixation au domaine PDZ est encadré en violet. Le site d'interaction étendu du domaine PDZ de MAST2 est indiqué par des pointillés violets.

¹⁴ Les domaines PEST désignent une région riche en proline (P), Glutamine (E), Sérine (S) ou Thréonine (T). Ces séquences sont liées à une diminution de la $\frac{1}{2}$ vie de la protéine. De nombreuses régions classées comme domaine PEST ont, rétrospectivement, été attribuées aux phosphodégrons. Les phosphodégrons sont des séquences potentiellement phosphorylables qui contrôlent (suivant l'état de phosphorylation) la dégradation des protéines par l'intermédiaire des ubiquitines ligases qui reconnaissent ces régions spécifiques.

Par ailleurs, nous constatons que les sites de phosphorylation chevauchent les autres séquences de signalisation. Plusieurs expériences montrent que le recrutement des partenaires de PTEN *via* le PDZ-BS, sa demi-vie ainsi que sa localisation cellulaire sont dépendants de l'état de phosphorylation de PTEN-Cter (173, 177, 180-182).

La suppression de PTEN-Cter ou la mutation des sites de phosphorylation en alanine conduit à deux mêmes conséquences: d'une part, l'accumulation de PTEN dans le noyau comparé à la protéine native (182), d'autre part la baisse significative de la demi-vie de PTEN *in vivo* (183).

Par ailleurs, la suppression ou la mutation de PTEN-Cter augmente l'efficacité de l'activité biologique de PTEN *in vivo* (183). Cette observation peut être expliquée par la phosphorylation de PTEN-Cter qui diminue la fixation de PTEN à la membrane (Fig.46).

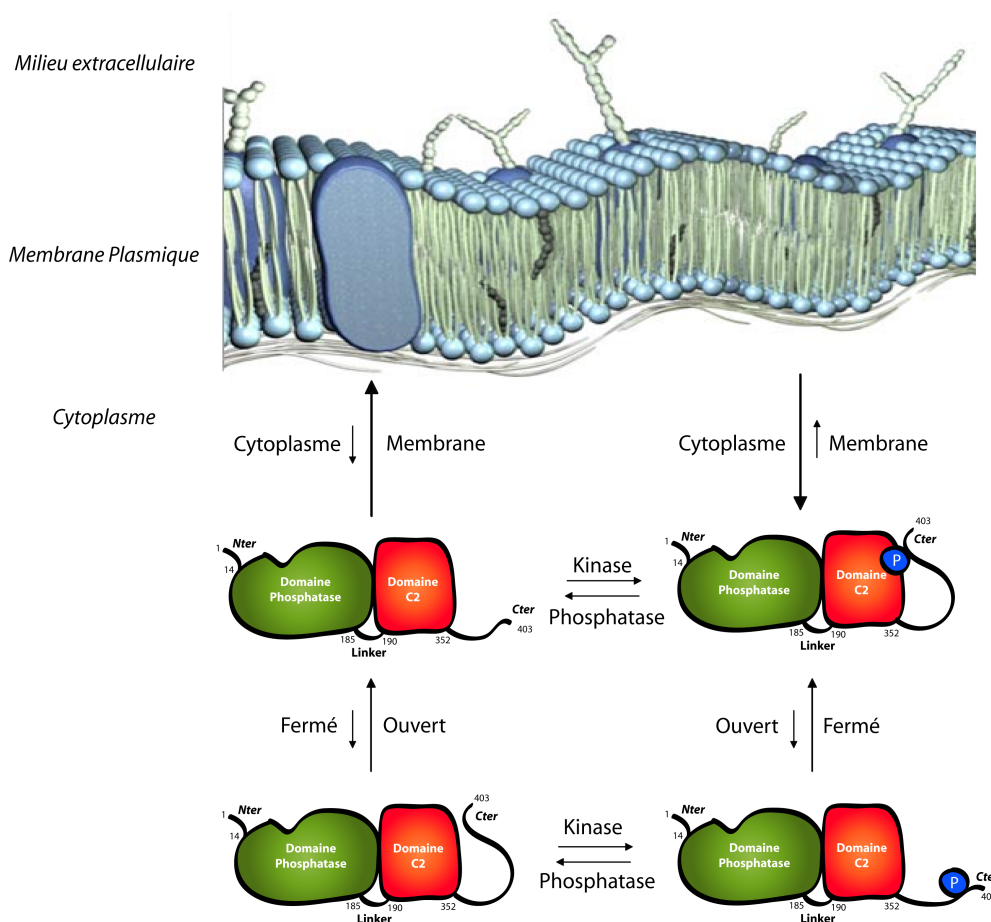


Figure 46 : Illustration de la fixation de PTEN à la membrane dépendante de la phosphorylation de PTEN-Cter. La déphosphorylation de PTEN-Cter favorise la conformation ouverte et la fixation de PTEN à la membrane (et inversement). Le modèle est basé sur les observations de Vazquez *et al* (184) et Rahdar *et al* (185).

Un modèle en échange avec une conformation ouverte/fermée a été proposé par comparaison du temps de résidence à la membrane de PTEN sauvage et des mutants dont les sites de phosphorylation de la queue C-terminal ont été substitué par des alanines (185). La suppression des sites de phosphorylation augmente le temps de résidence de plus d'un facteur 2. Dans la figure 46, PTEN-Cter phosphorylé interagit avec le domaine C2. L'interaction du domaine C2 avec PTEN-Cter masque le site de fixation des POPS et diminue l'interaction transitoire de PTEN avec la membrane. Lorsque PTEN-Cter est déphosphorylé, PTEN-Cter adopte une conformation principalement ouverte. Le site de fixation des POPS est de nouveau accessible et, par conséquent, augmente la fixation du domaine C2 à la membrane.

3.2. La régulation de PTEN

PTEN est régulée à plusieurs niveaux depuis la synthèse de son gène jusqu'à sa dégradation (Fig.47). Les premiers niveaux de régulation sont le contrôle de la synthèse du gène *pten* et la traduction de l'ARN_{messenger}. L'activité et le devenir de PTEN dépendront ensuite des différentes interactions mises en jeu modulant les modifications post-traductionnelles, sa dégradation, son activité et sa localisation sub-cellulaire.

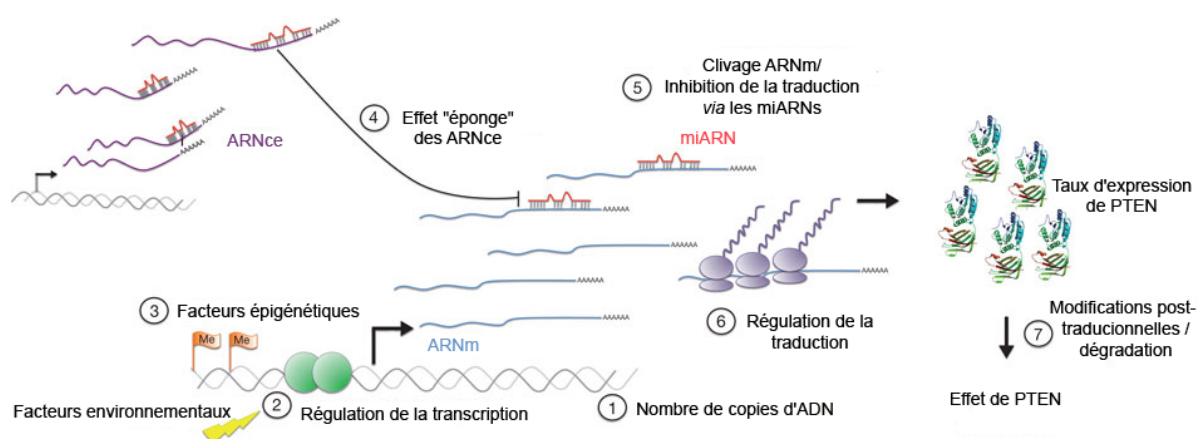


Figure 47 : Interactions entre les facteurs codants et non-codants qui déterminent la concentration finale de PTEN. Mécanisme « classique » de la copie du brin d'ADN de PTEN (1), Régulations transcriptionnelle (2) et épigénétique (3) qui affectent l'expression de l'ARNm de PTEN. Le niveau d'ARNm de PTEN ou la traduction est contrôlé par les miARNs (5). La disponibilité des miARN est également contrôlée par l'intermédiaire des ARNce (« *competing endogenous* ») (4). D'après Berger *et al* (2011) (3).

PTEN est une protéine cytoplasmique qui par différents mécanismes est transportée à la membrane et dans le noyau. Ainsi, l'activité de PTEN dépendra essentiellement des nombreuses contraintes qui régulent sa localisation dans la cellule pour maintenir l'homéostasie.

3.2.1. Le contrôle de la transcription du gène

Le gène de PTEN est composé de 9 exons avec une région de 100kb sur le chromosome humain 10q23 (Fig.48 A).

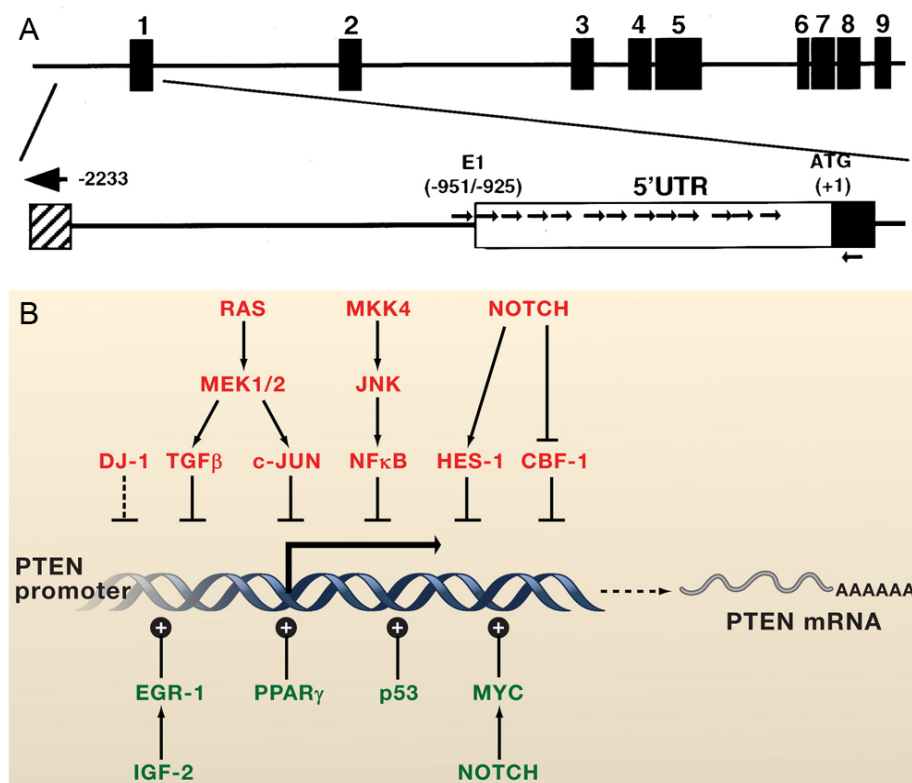


Figure 48 : Régulation de la transcription du gène de PTEN. (A) (en haut) Représentation schématique du locus de PTEN (GenBank accession number AF067844). Les exons sont illustrés par des boîtes noires 1-9. (En bas) Agrandissement de la région en amont du codon « start ». La position des oligonucléotides utilisés pour identifier le site de transcription est représentée. La numérotation des résidus est relative au codon ATG (+1). D'après Stambolic *et al* (2001) (186). De nombreux protéines régulent positivement la transcription de PTEN (EGR-1, PPAR γ , Myc, and p53) et négativement (NF κ B, c-Jun, HES, and TGF β signaling). NOTCH1 peut activer ou inhiber la transcription de PTEN selon le contexte cellulaire (187).

Le promoteur de *pten* (-2233 à +1) ne possède pas de séquence spécifique des « TATA box » et ne contient pas non plus de site de fixation pour un grand

nombre d'autres facteurs de transcription de liaison à l'ADN (186). Cependant, il existe des sites spécifiques de liaison à l'ADN reconnus par des protéines qui régulent positivement ou négativement la transcription du gène *pten*. Dans la figure 48 B, les protéines qui régulent positivement la transcription de PTEN, de façon directe (trait plein) ou indirecte (pointillé), sont indiquées en vert. Les protéines qui régulent la transcription négativement, sont indiquées en rouge (187). Les protéines régulatrices de la transcription de *pten* sont aussi soumises soit à une régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle par d'autres molécules (188) (PTEN compris).

Un deuxième niveau de régulation intervient dans le cytoplasme, en inhibant la traduction par le biais de micro ARN qui se fixent sur l'ARNm de PTEN et qui bloquent la synthèse de la protéine (189). En effet, de récentes expériences ont mis en évidence l'existence d'un pseudogène PTEN (*PTENP1*) qui contrôle la traduction de PTEN en inhibant les miARN qui ciblent l'ARNm de PTEN. Cette séquence est appelée ARN « Competing Effect » (ARNce). L'ARNm de *PTENP1* contrôle la traduction de PTEN en interagissant avec les miARN qui ciblent l'ARNm de PTEN (190) (Fig.49). Il s'agit ici, comme l'indique la figure 49, d'un mécanisme de traduction qui est contrôlé par une double inhibition.

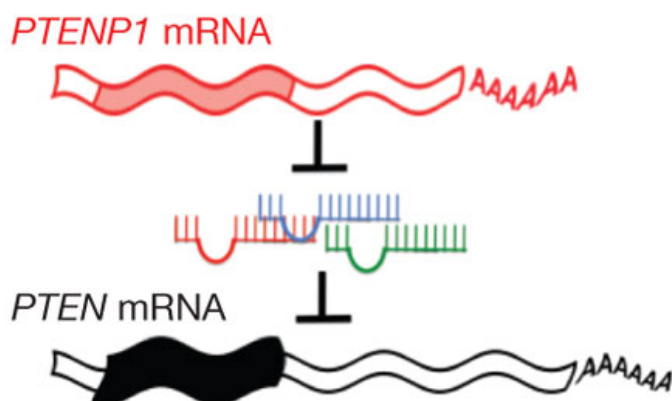
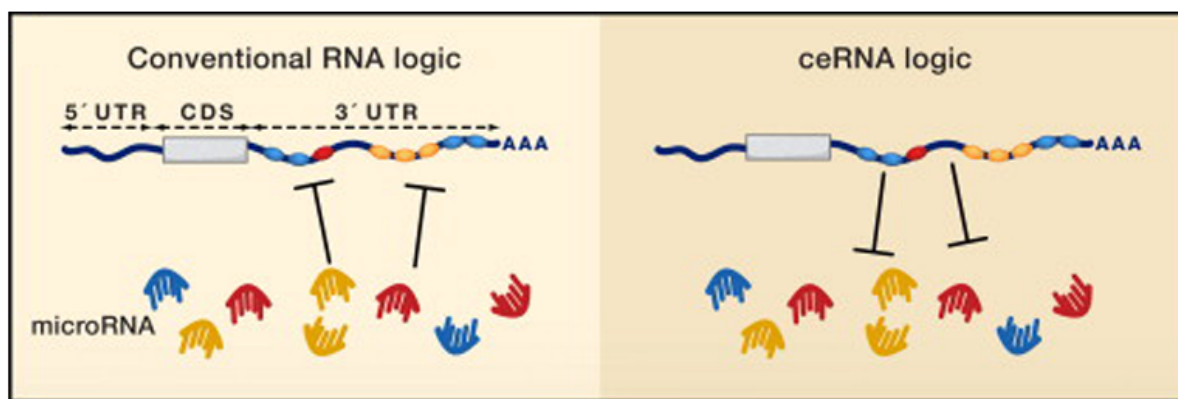


Figure 49 : Régulation de la traduction de PTEN. En haut à gauche : Inhibition de la traduction par la fixation des miARN sur la séquence d'ARNm(1) cible. En haut à droite : Interaction d'un ARNm(2) sur un miARN ciblant l'ARNm(1). D'après Salmena *et al* (2011) (191). En bas : contrôle de la traduction de PTEN dépendant du niveau de transcription de l'ARNm de *PTENP1*. D'après Poliseno *et al* (2010) (190).

3.2.2. Les partenaires cellulaires

De nombreuses protéines cellulaires liant PTEN ont été identifiées. Le tableau 1 présente une liste des partenaires humains qui interagissent directement *in vitro* avec les différents domaines de PTEN.

Tableau 1 : Partenaires cellulaires de PTEN, d'après Gericke *et al* (2006) (192), Bonifant *et al* (193), Salmena *et al* (2008) (187), Van Diepen *et al* (2009) (194), Song *et al* (2011) (195).

Protéines cellulaires	Domaine d'interaction de PTEN
Smad2/3	PTP
PCAF	PTP
Androgen receptor	PTP
Caveolin-1	Domaine C2
neutral endopeptidase	Domaine C2
MVP	Domaine C2
p53	Domaine C2

PDGFR	Domaine C2
MSP58	Domaine C2
CENP-C	Domaine C2
PICT-1	Domaine C2
Rock	Domaine C2
Thioredoxin-1	Domaine C2
NEDD4-1	Domaine C2/PTEN-Nter
LKB1	Domaine C2/PTEN-Cter
CK2	PTEN-Cter
GSK3-Beta	PTEN-Cter
MyosinVa	PTEN-Cter
MAGI-2	PDZ-BS
MAGI-3	PDZ-BS
hDLG	PDZ-BS
hMAST205	PDZ-BS
MAGI-1b	PDZ-BS
SAST	PDZ-BS
MAST3	PDZ-BS
Bazooka/PAR-3	PDZ-BS
NHERF	PDZ-BS
S1P2R	N.D.
NMDAR	N.D.
FAK/Paxillin	N.D.
Caspase 8	N.D.
TFG	N.D.
P300/CPB	N.D.
APC/CDH1	N.D.

La rencontre de PTEN avec ses partenaires aboutit à une modification de l'activité cellulaire (catalytique et non catalytique), à un contrôle de la dégradation de PTEN, à une relocalisation subcellulaire ou encore à des modifications post-traductionnelles. Ces modifications affectent à leur tour les réseaux d'interactions avec pour conséquence « d'allumer » ou « d'éteindre » certaines voies de signalisation. L'interactome de PTEN est, par exemple, modulé par la phosphorylation de PTEN-Cter. À partir d'extrait cellulaire, Vazquez *et al* ont démontré que PTEN sauvage (phosphorylé dans les cellules d'après les western blot anti-Ser380) migre préférentiellement vers les bas poids moléculaires (47 - 100kDa) alors que les mutants non phosphorylables migre plutôt vers les hauts poids moléculaires (> 600kDa) (184). Ces données suggèrent que la phosphorylation de PTEN-Cter module l'interaction avec ces partenaires cellulaires. 37 protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse à partir d'expériences de

« pull down » en utilisant une étiquette histidine en C-terminal¹⁵. Les auteurs ont ainsi pu identifier de nouveaux partenaires directs ou indirects (196). Ces protéines sont représentées selon leur domaine d'activité dans la figure 50.

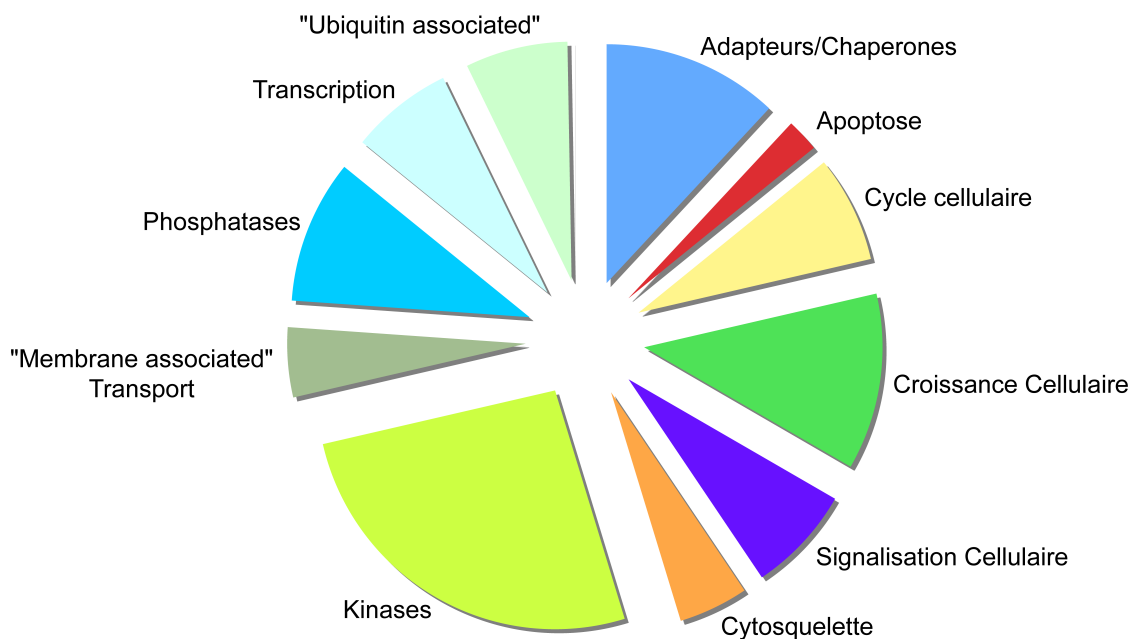


Figure 50 : Répartition des partenaires directs et indirects de PTEN selon leur fonction. L'expérience a été réalisée à partir de "pull down" couplée à la spectrométrie de masse sur des extraits cellulaires humains. La protéine PTEN avec l'étiquette histidine en C-terminal a été produite chez *E.coli* (196).

Ainsi, nous constatons que l'interactome de PTEN est riche et semble participer à la régulation de nombreuses voies de signalisation que nous détaillerons dans les paragraphes suivants.

3.2.3. Les modifications Post-traductionnelles

La régulation de PTEN passe par plusieurs modifications post-traductionnelles qui, nous le verrons, concerne l'ensemble de la séquence de PTEN. Bien que plusieurs éléments soient établis, la corrélation entre la fonction de la protéine et les modifications post-traductionnelles demande encore de nombreuses investigations pour identifier le rôle de chacune d'elles. L'analyse est, de plus, rendue complexe puisqu'une modification peut avoir des conséquences différentes

¹⁵ Le choix de l'étiquette en C-terminal n'est peut-être pas judicieux car il masque le site de fixation au domaine PDZ. Par conséquent, des partenaires potentiels n'ont pas pu être identifiés par cette méthode. (En d'autres termes, il aurait fallu les deux positions d'étiquette pour être complet ...)

sur le devenir de PTEN selon le contexte cellulaire et les modifications post-traductionnelles environnantes.

Dans cette partie, je traiterai ainsi des modifications post-traductionnelles et des facteurs de régulation identifiés. Je me focaliserai plus particulièrement sur les partenaires de PTEN qui possèdent des domaines kinase, phosphatase, ubiquitine ligase ou encore acetyltransférase.

Oxydation

Sous certaines conditions physiologiques, des réactions produisent des radicaux libres (O_2^-) hautement réactifs. Ces radicaux libres produisent à leur tour des espèces réactives à l'oxygène (ROS) à partir d'une réaction en chaîne dont l'intermédiaire principal est l'eau oxygénée (H_2O_2). Ces molécules à forte concentration sont nocives pour les organismes vivants et détériorent une partie des constituants cellulaires majeurs. Au cours de l'évolution, certaines cellules se sont adaptées en faisant des ROS un élément de signalisation pour contre balancer l'effet d'un stress oxydatif (197). Le domaine catalytique de PTEN possède deux cystéines (Cys71 et Cys124) dont l'état d'oxydation dépend des ROS. L'état d'oxydation de ces cystéines module l'activité catalytique de PTEN. En effet, cette activité (PIP3 \rightarrow PIP2) diminue *in vitro* lorsque Cys71 et Cys124 sont à l'état oxydé et *in vivo* lorsque la cellule est soumise à un stress oxydatif par ajout de H_2O_2 (Fig.51) (198-200).

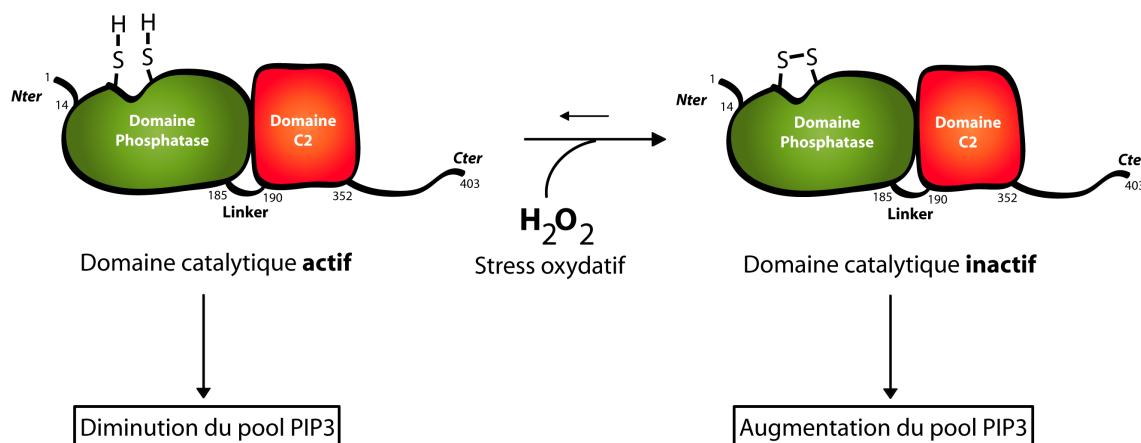


Figure 51 : Schéma représentant l'inactivation du domaine catalytique via un mécanisme d'oxydation. Les chaînes latérales des cystéines 71 et 124 apparaissent sous leur forme oxydée (S-S) et réduite (S-H).

Ce mécanisme participerait ainsi à la résistance au stress oxydatif en rendant le domaine catalytique inactif. Cela entraîne une augmentation du « pool » de PIP3 qui favorise *in vivo* les voies de signalisation qui participent à la survie cellulaire et au métabolisme (Cf figure. 6, p28).

Acétylation

Trois lysines acétylées de PTEN ont été identifiées *in vivo* (K125, K128 et K402) impliquant deux acétyltransférases, PCAF et CBP, et déacétylées par SIRT1 (201, 202). Très peu d'informations sont disponibles sur ce mécanisme. Les lysines 125 et 128 se situent sur la boucle catalytique Cys(X)₅Arg. L'activité catalytique (PIP3->PIP2) de PTEN est diminuée de 45 % *in vitro* lorsque ces deux lysines sont acétylées par PCAF (201). Peut-être pouvons-nous noter ici une certaine incohérence quant à la réalité biologique. En effet, PCAF et CBP sont des protéines nucléaires et l'activité catalytique mesurée *in vitro* de PTEN est sub-membrane plasmique. Cela sous-entend qu'après l'acétylation de K125 et K128 dans le noyau, PTEN doit être exportée vers la membrane sans être déacétylé pour exercer un contrôle négatif sur l'activité catalytique de PTEN à la membrane. Il est cependant possible d'imaginer qu'une acétyltransférase cytoplasmique soit impliquée dans ce processus de régulation de l'activité catalytique de PTEN. En absence d'expériences complémentaires, il convient donc d'être prudent avant d'établir une corrélation entre l'acétylation de PTEN et son activité phosphatase *in vivo*.

Ces mêmes auteurs ont montré que l'acétylation de PTEN conduit à l'arrêt de la phase G1 du cycle cellulaire. Parallèlement, il a été montré que la diminution de quantité de PTEN nucléaire est corrélée avec l'activation de la phase S du cycle cellulaire (203). Ainsi, nous pouvons nous interroger sur le lien direct qui relie la relocalisation cellulaire de PTEN, le cycle cellulaire et l'acétylation de K125 et K128 de PTEN. Cela constituerait un élément important pour faire progresser nos connaissances sur le mécanisme de régulation de PTEN.

L'acétylation de K402 par la CBP, est *a priori* indépendante des deux autres lysines. K402 se situe dans le site de fixation des domaines PDZ. Cette acétylation diminue l'affinité de PTEN-Cter pour les domaines PDZ de hDlg et MAGI-2 (202). Les autres domaines PDZ (NERHF, MAST) qui ciblent PTEN-Cter n'ont pas été testés. Encore une fois, la question de la localisation n'est pas abordée et nous nous

heurtons à la même interrogation que précédemment. Les protéines contenant les domaines PDZ qui ciblent PTEN sont principalement sub-membranaires ou cytoplasmiques. La CBP est une protéine nucléaire. L'augmentation de la force d'interaction de hDlg et MAGI-2 avec PTEN-Cter constatée *in vitro* a-t-elle vraiment une réalité dans la cellule?

Caspase

PTEN est clivée *in vivo* par la caspase-3 dans plusieurs sites de PTEN-Cter (Fig.52) (177). Ce clivage supprime le PDZ-BS et diminue drastiquement la durée de vie de PTEN dans la cellule. L'efficacité de clivage de la caspase-3 dépend aussi de l'état de phosphorylation de PTEN-Cter. Le clivage de PTEN-Cter est également dépendant de la caspase-9. La caspase-9 fait partie des caspases initiatrices. C'est à dire qu'elles ne clivent pas directement PTEN-Cter mais sont responsables de l'activation de la caspase-3. Les caspases initiatrices se retrouvent essentiellement dans des complexes de haut poids moléculaires. Nous aurons noté dans le tableau 1 que PTEN interagit avec la caspase-8 qui fait partie, comme la caspase-9, des caspases initiatrices. La question qui nous vient donc à l'esprit est : est-il possible que PTEN participe à sa propre régulation en activant (directement ou indirectement), les caspases initiatrices (8 et 9¹⁶) à partir du recrutement de PTEN dans les complexes de haut poids moléculaires ?

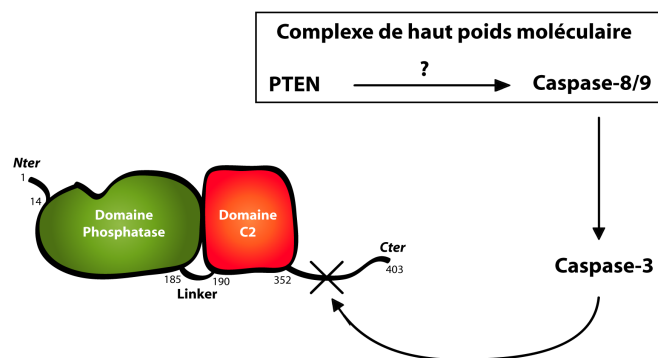


Figure 52 : Mécanisme du clivage de PTEN-Cter par la caspase-3

¹⁶ La caspase 9 est synthétisée sous une forme monomérique inactive. L'activation de la caspase-9 passe par la formation d'un homodimère qui permet le clivage d'un de ses sites. Il est intéressant de noter que l'activation de la caspase-9 est inhibée par la phosphorylation de la Ser144. Sa déphosphorylation, par une kinase inconnue (PTEN ?), induit l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3.

Phosphorylation

Nous avons déjà discuté de l'importance de la phosphorylation de PTEN-Cter sur la modulation de l'activité catalytique, la localisation cellulaire, la demi-vie PTEN et l'interaction de PTEN avec ses partenaires. Plusieurs protéines phosphorylant (CK2, GSK3- β , LKB1, MAST2) ou induisant (PICT-1) la phosphorylation de PTEN ont été identifiées. Toutes les informations sont résumées dans la figure 53.

De nombreuses études *in vitro* portées sur la phosphorylation de PTEN-Cter, ont mis en évidence les 5 résidus (Ser 370, Ser380, Thr382/83 et Ser385) phosphorylés par CK2- α (173, 183) et les deux résidus phosphorylés (Ser362 et Thr366) par GSK3- β (174) en substituant les sérines et thréonines par des alanines. Une étude a mis en évidence, à partir des cellules de glioblastomes qui surexpriment PTEN, que les seuls les résidus 370 et 385 étaient détectés par spectrométrie de masse (204). Les autres sites n'ont pu être mis en évidence par cette technique. Toutes ces données sont parcellaires et aucune étude, jusqu'à présent, n'a produit des données faisant la synthèse de tous ces résultats. L'étude cinétique de la phosphorylation par la kinase n'est pas documentée. Le site consensuel reconnu préférentiellement par kinase CK2 est la séquence SxxE (205, 206).

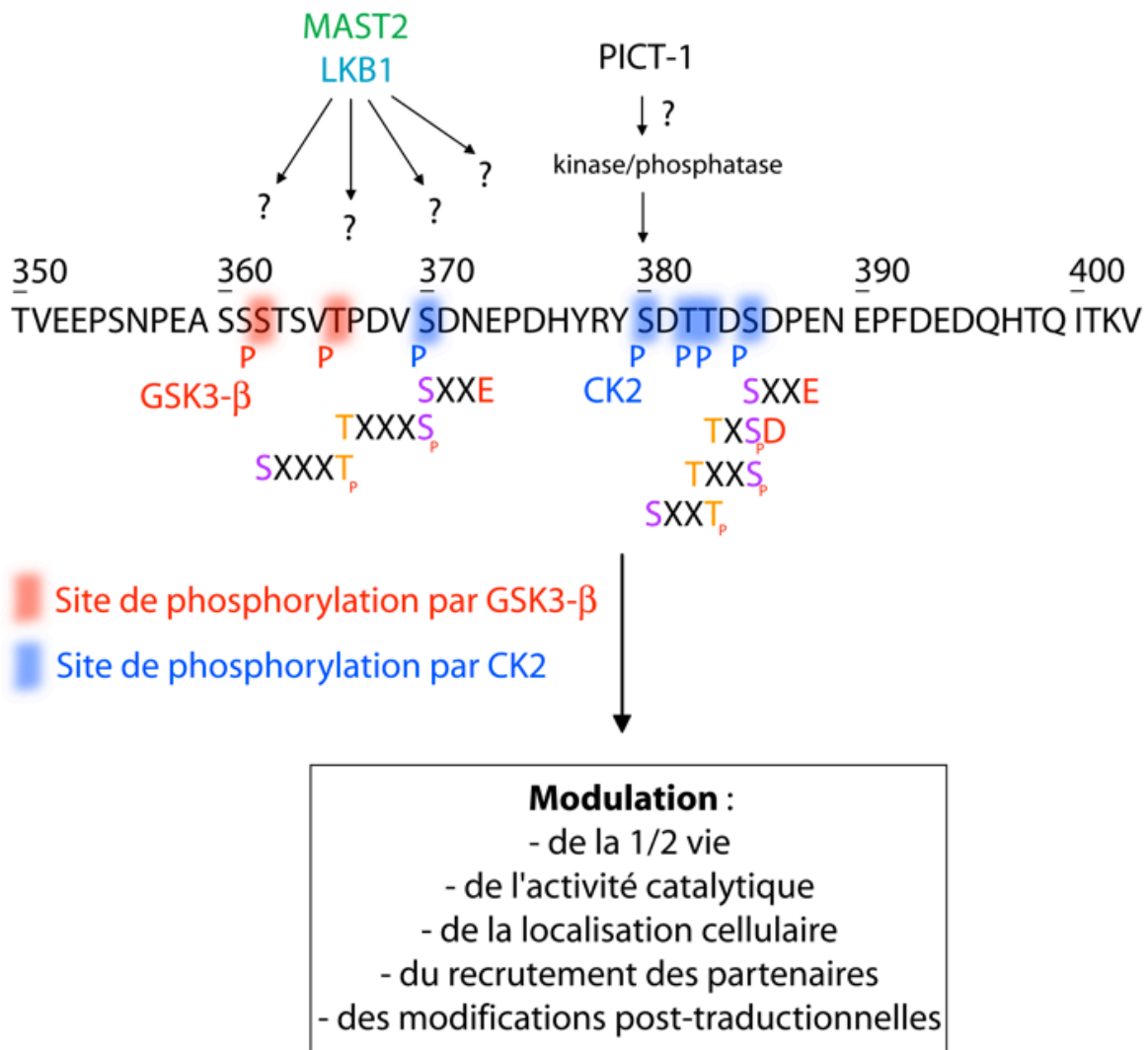


Figure 53 : Phosphorylations de PTEN-Cter et ses conséquences. Les sites phosphorylés par CK2 sont en bleu, ceux par GSK3-β sont en rouge. Le site consensus minimal reconnu par CK2 est SXXE/ résidu anionique. Le site consensus minimal reconnu par GSK3-β est SXXXE/résidu anionique et TPXXE/résidu anionique.

Cependant un environnement chargé négativement en aval du substrat de CK2 peut être suffisant pour induire la phosphorylation (206). Il est intéressant de noter que la phosphorylation de S362 et T366 par GSK3-β n'est possible qu'après phosphorylation de S370 par CK2 (174). Les deux autres kinases MAST2 et LKB1 phosphorylent PTEN-Cter *in vitro* mais le/les site(s) de phosphorylation n'ont pas été identifiés (52, 175). Les multiples combinaisons de phosphorylation couplées aux nombreuses conséquences sur les propriétés de PTEN rendent l'interprétation des expériences particulièrement difficile. Il est en effet très délicat de corrélérer un phénotype cellulaire avec la phosphorylation d'un unique site. Des paramètres supplémentaires sont évidemment à prendre en compte mais la synthèse de tous ces résultats est rendue difficile tant les variables sont nombreuses et difficilement

corrélabes. À cela viennent s'ajouter, les kinases qui ciblent un même résidu. Il est probable que MAST2 et LKB1 ciblent un résidu phosphorylé par CK2. De plus, PICT-1, qui a été identifié comme un gène suppresseur de tumeur, favorise la phosphorylation de S380 par l'intermédiaire d'une kinase ou phosphatase non identifiée (207). La complémentarité de différentes approches (biophysique, biologie moléculaire, biologie cellulaire...) est indispensable pour aborder ce mécanisme de régulation de PTEN.

Les phosphorylations de S229, T232, T319 et T321, présentes sur la face opposée du site de fixation des POPS du domaine C2, semble jouer aussi un rôle essentiel pour la fonction de PTEN. La substitution de ces 4 résidus en alanine supprime complètement la fonction de PTEN¹⁷ (208). La kinase identifiée est la kinase Rock.

La phosphorylation de Y240 et Y315 dans le domaine C2, joue un rôle important sur la fonction de PTEN (209). En effet, la mutation de ces deux résidus conduit à une diminution drastique de l'activité catalytique lipidique de PTEN. Aucune tyrosine kinase n'a été identifiée responsable de ces phosphorylations.

Phosphorylation de PTEN et localisation sub-membranaire

Le transport de PTEN à la membrane est un mécanisme actif. En effet, PTEN est amenée à la membrane par la myosinVa (194). Ce moteur moléculaire transporte des molécules ou organelles par l'intermédiaire de l'actine. L'interaction de PTEN avec la myosinVa dépend de PTEN-Cter et de ses sérines et thréonines qui doivent être phosphorylées. Les phosphorylations nécessaires au transport de PTEN n'ont pas été clairement déterminées. Paradoxalement, PTEN doit être sous sa forme active (non phosphorylée) pour déphosphoryler PIP3 à la membrane. En effet la déphosphorylation de PTEN-Cter induit la fixation du domaine C2 qui permet d'orienter le domaine PTP qui peut exercer son activité catalytique en déphosphorylant les PIP3 en PIP2. Ainsi, l'activité catalytique de PTEN est contrôlée indirectement par la phosphorylation de PTEN-Cter qui module la fixation du

¹⁷ Les auteurs ont suivi deux voies de régulation dont PTEN joue le rôle d'intermédiaire : la voie de phosphorylation de la kinase AKT et le chimiotactisme dans des cellules embryonnaires de foies humains.

domaine C2 à la membrane. Cela suggère qu'une phosphatase membranaire, potentiellement PTEN elle-même, permettrait de l'activer.

Ubiquitination

L'ubiquitine ligase NEDD4-1 interagit avec PTEN *in vivo*. La polyubiquitination de PTEN par NEDD4-1 *in vivo* module la fonction inhibitrice de survie de PTEN (210). En effet, la surexpression de NEDD4-1 dans des cellules HeLa provoque une augmentation de la prolifération cellulaire et l'extinction de son gène provoque une régression tumorale dans des xénogreffes chez des souris. La polyubiquitination des protéines dans la cellule est suivie de la dégradation de la protéine par le protéasome (211). L'inhibition du protéasome conduit aux mêmes observations, suggérant ainsi le rôle oncogène de NEDD4-1, responsable de la dégradation de PTEN par le protéasome *via* la polyubiquitination. On note que les domaines PEST et de la phosphorylation de PTEN-Cter régulent également la dégradation de PTEN par le protéasome. La phosphorylation de PTEN-Cter inhibe indirectement la polyubiquitination de PTEN (212). Cependant il n'existe pas de démonstration qui indique que l'interaction de NEDD4-1 ou d'autres ubiquitines ligases avec PTEN est modulée par la phosphorylation de son domaine C-terminal.

NEDD4-1 peut aussi jouer un rôle de modulateur de la localisation cellulaire. Alors que la polyubiquitination de PTEN séquestre la protéine dans le cytoplasme pour une dégradation par le protéasome, la monoubiquitination de Lys13 et Lys289 favorise le transport de PTEN dans le noyau¹⁸. Lys13 se trouve dans la séquence N-terminale non structurée qui contient un signal de localisation dans le noyau (NLS). L'ubiquitination de Lys13 contribue à la localisation nucléaire de PTEN. Lys289 est située sur la large boucle non-structurée du domaine C2 (Fig.54). Le maintien de PTEN dans le noyau est aussi contrôlé, en partie, par la protéine HAUSP qui hydrolyse les sites monoubiquitinilés de PTEN (Lys13 et Lys289) dans le noyau (213).

¹⁸ Le mécanisme de transport de PTEN à la membrane reste un sujet de débat. Un groupe a en effet mis en évidence que la localisation de PTEN pouvait être faite par diffusion passive tandis que d'autres groupes ont montré que la distribution nucléaire de PTEN dépend des NLS et NES putatifs, notamment par l'intermédiaire de la protéine MVP ou du mécanisme dépendant de Ran. L'analyse du transport nucléaire est complexe en raison notamment des nombreuses modifications post-traductionnelles qui participent à la distribution cellulaire de PTEN.

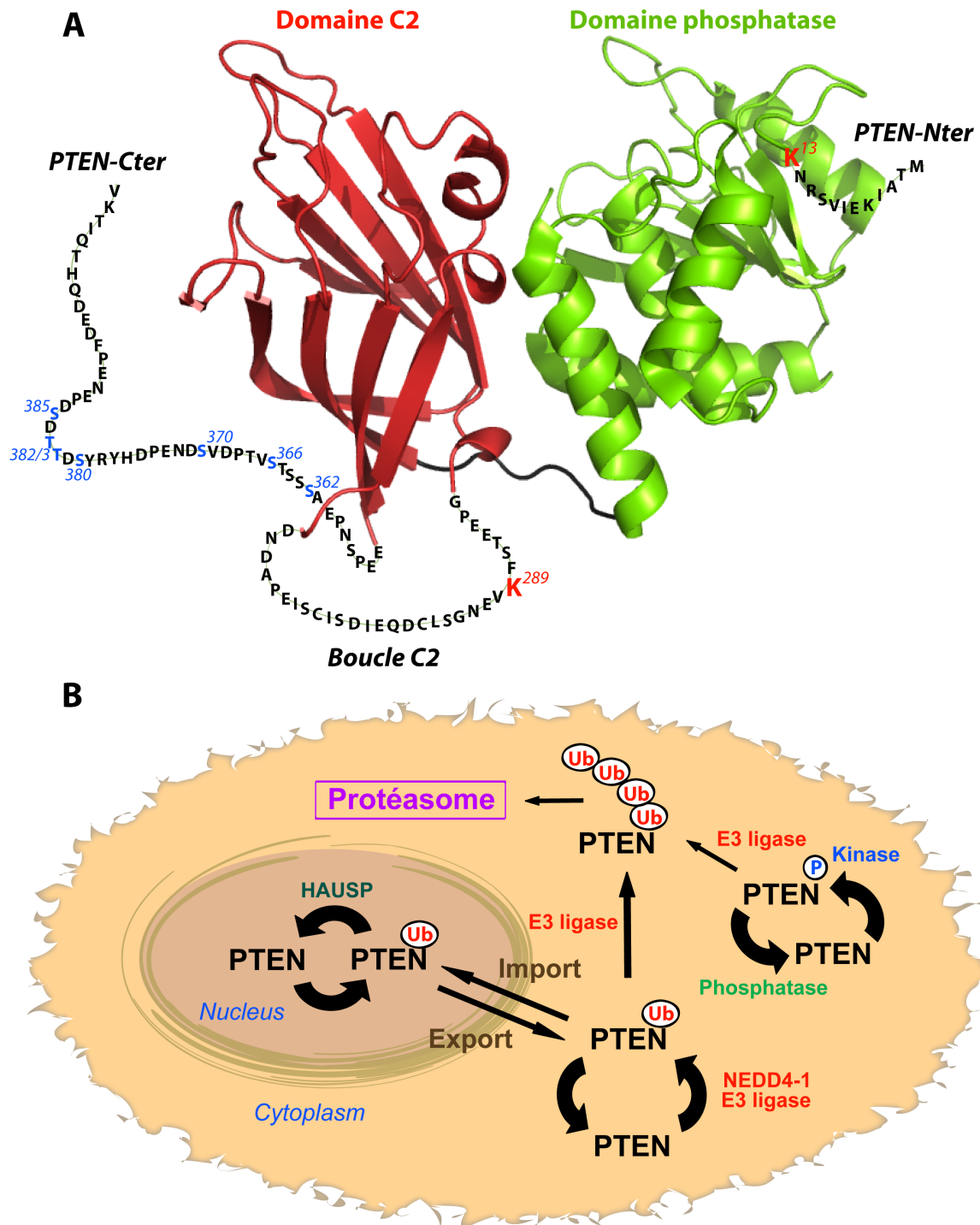


Figure 54 : Structure de PTEN et localisation cellulaire (A) Structure cristallographique de PTEN (1DR5). Le domaine phosphatase est en vert. Le domaine C2 est en rouge. Les séquences en aa des parties sans structures secondaires intrinsèques et absentes du cristal (PTEN-Cter, PTEN-Nter et la boucle C2) sont indiquées. K13 et K289 sont en caractère rouge. Les sérines et thréonines de PTEN-Cter phosphorylés sont représentées en bleu. (B) Mécanisme de régulation de la localisation de PTEN selon les modifications post-traductionnelles de la phosphatase (ubiquitinylation et phosphorylation). D'après Trotman *et al* (2007) (214), Wang *et al* (2007) (210), Song *et al* (2008) (213) et Maccario *et al* (2010) (212).

3.3. Fonctions cellulaires de PTEN

PTEN est une protéine multifonctionnelle : elle exerce ses fonctions qui sont dépendantes ou non de son activité catalytique et plus particulièrement de son activité catalytique **lipidique** dans différents compartiments cellulaires.

3.3.1. Fonctions cellulaires « catalytique-dépendantes »

La localisation de PTEN à la membrane plasmique induit la déphosphorylation des molécules de PIP3 en PIP2. Les molécules de PIP3 sont des précurseurs cellulaires qui sont reconnues et qui interagissent avec les domaines « Pleckstrin homology » (PH) (215). Ces domaines, d'une centaine d'acides aminés, peuvent être considérés comme des modules, associés généralement à d'autres domaines, qui participent, entre autre, à la régulation des voies de signalisation intracellulaire telle que la voie de phosphorylation d'AKT (216).

Contrôle de la voie de phosphorylation de AKT

La protéine kinase AKT contrôle, *via* son domaine catalytique, plusieurs voies de régulation cellulaire pro-survie (Fig.55). Le domaine catalytique d'AKT est activé par la kinase PDK1 qui phosphoryle un résidu de la boucle d'activation du site catalytique d'AKT (33). L'activation de la kinase AKT est aussi dépendante de l'interaction des PIP3 avec le domaine PH (Pleckstrin Homology) que possède AKT et PDK1. Cette interaction permet ainsi d'enrichir localement AKT et PDK1 sous la membrane plasmique. PTEN joue le rôle de contre balancier en diminuant la quantité de PIP3 à la membrane et de ce fait diminue indirectement la quantité de molécules AKT active (33) (Fig.55).

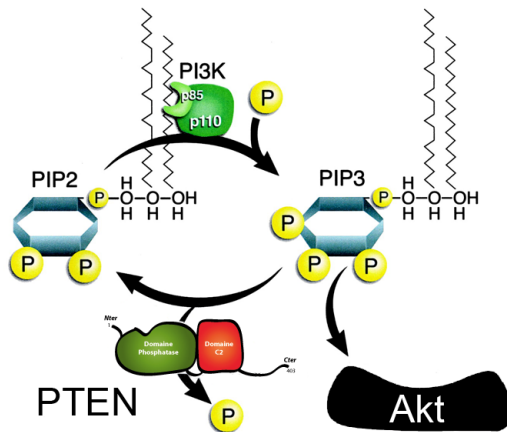
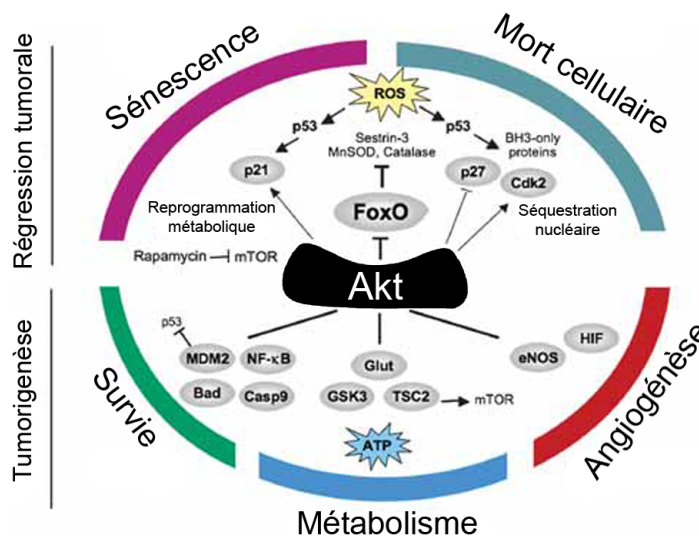


Figure 55 : Voie d'activation de la protéine kinase AKT par l'intermédiaire des PIP3. PI3K phosphoryle la position D-3 du phosphoinositides (haut de figure) tandis que PTEN déphosphoryle cette même position. La phosphorylation de D-3 permet le recrutement et l'activation de la protéine AKT. D'après Sansal *et al* (2004) (1). Dans le bas de figure, l'activation d'AKT inhibe la mort cellulaire et la sénescence et active la survie, le métabolisme et l'angiogénèse de la cellule. D'après Los *et al* (2009) (4).



Le maintien de l'équilibre des activités de PI3K et de PTEN permet ainsi de contrôler la phosphorylation de la position D-3 du PIP3 et ainsi de moduler les voies activées par AKT à savoir : la sénescence, la mort cellulaire, l'angiogénèse, le métabolisme et la survie.

Contrôle du chimiotactisme

De nombreuses autres voies de signalisation, moins bien caractérisées que la voie AKT, sont dépendantes de la concentration de PIP3 à la membrane. Les protéines PHDA et Crac, qui possèdent un domaine PH, participent au chimiotactisme et la polarisation cellulaire (217, 218).

3.3.2. Fonctions cellulaires « catalytique-indépendantes »

Ces dernières années, plusieurs études ont mis évidence des fonctions de PTEN dans le noyau, indépendantes de son activité catalytique. Ainsi plusieurs

études ont mis en évidence que PTEN nucléaire participait au maintien de l'intégrité chromosomale et au contrôle de la prolifération cellulaire et à la sénescence (Fig.56).

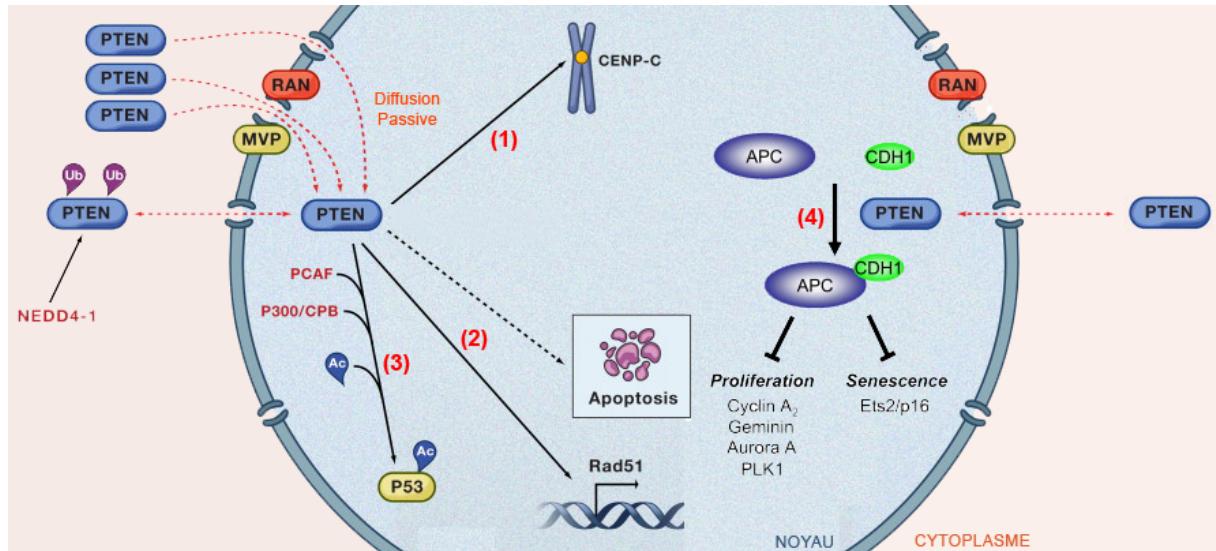


Figure 56 : Relocalisation de PTEN dans le noyau et régulation de plusieurs voies de signalisation via un mécanisme indépendant du domaine catalytique de la phosphatase. (1) Dans le noyau, PTEN s'associe à la protéine C du centromère (CENP-C) (219). La suppression de cette interaction conduit à une déstabilisation du centromère. (2) PTEN est associée *in vivo* au promoteur de la protéine RAD51 et participe positivement au contrôle de la transcription de RAD51 qui est impliqué dans la réparation de l'ADN (219). (3) PTEN favorise la formation du complexe entre l'acétyltransférase p300 et le facteur de transcription p53. P53 est alors acétylé avec pour conséquence d'induire la tétramérisation et d'augmenter la stabilité du facteur de transcription (220). (4) La fixation de PTEN avec CDH1, augmente l'activité du complexe APC/CDH1. Ce complexe possède une activité suppresseur de tumeur en inhibant les voies de régulation contrôlant la sénescence et la prolifération cellulaire. Song *et al* démontrent le rôle anti-prolifératif de PTEN nucléaire qui ne dépend pas de l'activité catalytique de PTEN (195). D'après Salmena *et al* (2008) (187) et Song *et al* (2011) (195).

3.4. Pathogénie neurologique associée à PTEN

PTEN est une protéine ubiquitaire qui est localisée différemment selon le type cellulaire (221-225). Je me focaliserai sur les pathologies neurologiques liées à PTEN.

Un dysfonctionnement de PTEN est très souvent associé au développement de tumeurs des cellules neuronales humaines (20-30%), parfois très agressives (226). Cependant, certaines mutations de PTEN conduisent à des troubles neurologiques parmi lesquels nous pouvons citer : Alzheimer (227), la maladie de Cowden (228), certains signes autistiques (229), des retards mentaux, ou encore

des troubles psychiatriques (229). PTEN ne possède pas d'isoformes pour compenser une éventuelle perte de fonction.

Cependant, comme nous l'avons décrit précédemment, le niveau de régulation de PTEN est tel qu'il est très difficile de proposer un mécanisme moléculaire expliquant, sans ambiguïté, le phénotype cellulaire associé. Les réseaux d'interactions sont si inter-connectés les uns aux autres, qu'il est particulièrement délicat de décorrélérer les effets indirects des conséquences directes d'une perte de fonctionnalité de PTEN. De plus, les phénotypes analysés *in cellulo* sont particulièrement liés à l'environnement cellulaire, aux tissus ou aux types cellulaires. Les conclusions d'une observation *in cellulo* font parfois l'objet de vives critiques, au minimum d'une certaine vigilance quant à leur généralisation *in vivo*.

Dans ce paragraphe, nous tâcherons donc de traiter ces observations phénotypiques en ayant conscience de la limite de chacune des approches utilisées, d'où la nécessité d'utiliser une approche pluridisciplinaire pour assoir la pertinence d'un phénotype lié à la fonction de PTEN.

3.4.1. Aspects cliniques

PTEN régule de nombreux processus cellulaires essentiels pour le développement et l'homéostasie de la cellule. Il n'est donc pas étonnant d'observer des pathologies diversifiées liées aux dysfonctionnements de la régulation de PTEN. Une mutation peut en effet, altérer directement l'activité catalytique (« hot spot ») ou perturber le réseau d'interaction, les modifications post-traductionnelles ou encore la localisation cellulaire de PTEN. La figure ci-dessous illustre la fréquence d'apparition des mutations du gène PTEN pour des patients ayant développé une tumeur (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). Plus de la moitié de ces mutations affecte le domaine catalytique. Seulement 2% des mutations apparaissent sur la partie C-terminale (Fig.57).

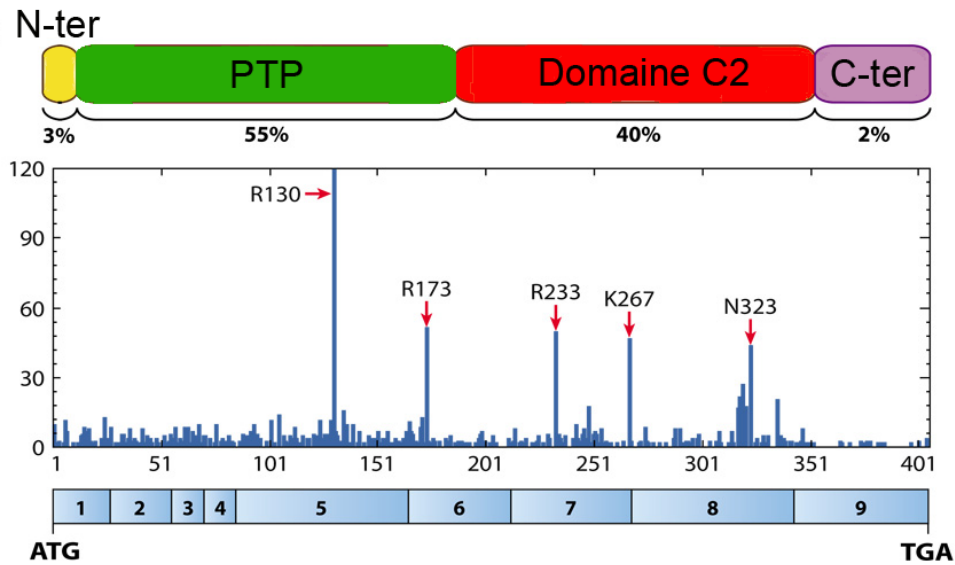


Figure 57 : Fréquence des mutations de PTEN associées à l'apparition de tumeurs en fonction de la position de l'acide aminé de PTEN. En haut, délimitation des domaines de la protéine PTEN. Au milieu, fréquence de mutation le long de la séquence en aa de PTEN. En bas, représentation des 9 exons de PTEN. D'après Chalhoub *et al* (2009) (226).

Nous verrons aussi que la concentration intracellulaire de PTEN actif est un élément important pour la régulation de la cellule.

Ces conséquences sont parfois malheureuses pour l'Homme en entraînant une mort prématurée ou un retard mental.

Mutations Germinales

Les mutations germinales de PTEN sont souvent associées à une prédisposition aux développements de tumeurs et à l'apparition certaines pathologies qui affectent le développement de certaines régions du cerveau humain telles que les syndromes de Lhermitte-Duclos (SLD) et de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (SBBR) (60% des cas dépistés présentent des mutations germinales). Le SLD est souvent associé à un développement anormal et un élargissement du cervelet avec un risque de développer un cancer. Le SBBR s'accompagne entre autre d'une macrocéphalie et d'un retard mental dans 50% des cas mais contrairement au SLD, il ne présente *a priori* pas de susceptibilité de développer une tumeur.

La macroencéphalie d'individus qui présentent des signes autistiques ou un retard mental est liée à des mutations de résidus conservés de PTEN (229, 230). L'analyse de la séquence du gène PTEN de patients autistes indique que 17%

d'entre eux possèdent une mutation germinale. Cependant pour toutes ces études, aucune ne propose un mécanisme moléculaire qui soit lié à ces phénotypes.

Enfin, des études réalisées sur des cellules de cerveau de cadavres humains sains (*a priori*) ou de malades souffrant d'Alzheimer ont mis en évidence que la distribution de PTEN était significativement altérée avec une exclusion partielle du noyau (227, 231) et que la phosphorylation de S380 de PTEN-Cter était aussi significativement diminuée chez les personnes atteintes d'Alzheimer (232).

Mutations Somatiques

Au vu de l'extrême complexité de la régulation de PTEN dépendant de sa séquence, la probabilité qu'une mutation ponctuelle ait des conséquences pathologiques pour l'homme est importante. L'altération de l'activité de PTEN dans les astrocytes conduit à la formation de tumeurs primitives du cerveau, dites tardives (stade 4), parmi les plus agressives appelées glioblastomes multiformes (GBM) (233). L'incapacité de PTEN à réguler une ou plusieurs voies de régulations ne fait qu'aggraver le pouvoir tumorigène de la cellule neuronale.

Haploinsuffisance

Une diminution incontrôlée de la concentration intracellulaire de PTEN a un effet néfaste sur la régulation de la cellule et conduit systématiquement au développement de cellules tumorales. Dans des modèles de glioblastomes humains au stade précoce, la diminution de taux d'expression de PTEN accélère la formation de glioblastomes de stade tardif (3 et 4) (234). La prolifération cellulaire est inversement proportionnelle au pourcentage de PTEN actif dans la cellule jusqu'à un certain point. En effet, l'inhibition totale de synthèse de PTEN conduit à un mécanisme cellulaire de sénescence (3) (Fig.58).

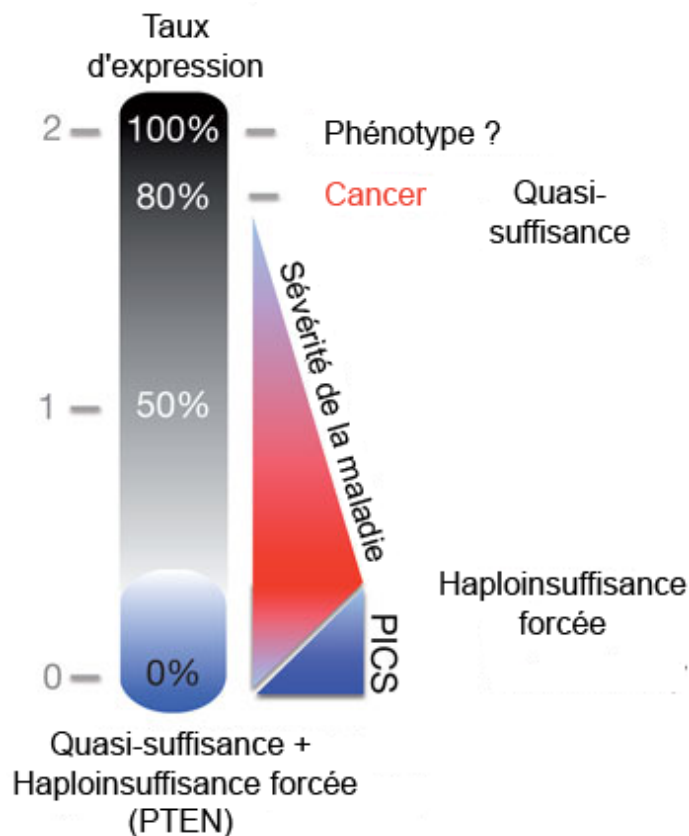


Figure 58 : Quasi-suffisance et haploinsuffisance “forcée”. La quasi-suffisance correspond à l’altération de l’activité suppresseur de tumeur de PTEN après une faible inhibition de l’expression de PTEN. L’haploinsuffisance “forcée” signifie que la diminution de l’expression de PTEN est plus tumorigène que la perte totale d’expression. Cela s’explique par l’activation, dans la cellule, d’un mécanisme de sénescence qui peut être assimilé à un mécanisme de sécurité cellulaire lorsqu’il y a perte complète de l’expression de PTEN. Abréviation : PICS : « *PTEN* loss-induced cellular senescence ». D’après Berger *et al* (2011) (3).

3.4.2. Enjeux thérapeutiques liés à PTEN

Parmi l’ensemble des études étiologiques qui ont été reliées à PTEN, très peu ont abordé la biochimie ou la biophysique de la phosphatase dans le but de corrélérer un dysfonctionnement du mécanisme moléculaire de PTEN avec le développement d’une tumeur ou avec la présence de troubles neurologiques dont nous avons discuté précédemment. Bien souvent, un raccourci est très vite franchi entre l’observation de mutation du gène de PTEN et le phénotype cellulaire associé sans établir les conséquences de la mutation sur les propriétés de la phosphatase.

La fonction de PTEN a très vite été reliée à la régulation négative de la voie de signalisation pro-survie de la kinase PI3K/AKT dès la découverte de la spécificité du substrat de son domaine catalytique. Pour rétablir un déséquilibre lié au dysfonctionnement de PTEN qui n’est alors plus capable de maintenir l’homéostasie cellulaire, plusieurs molécules ont été développées pour enrayer la production de PIP3 par la kinase PI3K ou pour diminuer l’activité catalytique d’AKT en inhibant son domaine kinase ou celui de PDK1, responsable de l’activation d’AKT (235).

Cependant, l'activité de PTEN est particulièrement complexe et ne peut être réduite qu'à l'activité catalytique lipidique de PTEN¹⁹. Une mutation sur le gène de PTEN peut avoir un effet pleïtrophe. Les mécanismes qui régulent la localisation subcellulaire, sa demi-vie, le contrôle de la synthèse des protéines, l'activité indépendante de l'activité catalytique de PTEN sont certainement à prendre avec autant de considération dans l'apparition des diverses pathologies. Cela exige donc une approche fondamentale sur plusieurs fronts pour aboutir à la conception de molécules efficaces.

Le dérèglement de l'homéostasie cellulaire peut aussi être induit par l'infection d'un pathogène qui, à partir des protéines exogènes issues de son génome, court-circuite les voies de signalisation pour en tirer un avantage pour sa dissémination dans l'organisme. Dans certains cas le pathogène provoque la mort de la cellule, dans d'autres cas, il induit la survie de la cellule comme le virus de la rage que nous avons décrit dans le chapitre 1. Ce virus neurotrophe a en effet acquis la capacité d'induire la survie des neurones qu'il infecte. Nos récentes études ont mis en évidence un lien, que nous discuterons dans la partie résultats, entre la phosphatase PTEN et la survie du neurone induite par le virus de la rage. Nous pouvons alors tirer parti de ces connaissances pour identifier de nouvelles cibles telles que MAST2.

¹⁹ Cet exemple permet d'illustrer mes propos sur l'intérêt d'une approche pluridisciplinaire. En effet, la mutation de K289 sur la large boucle du domaine C2 a été corrélée avec la maladie de Cowden et l'apparition de cancers (prostate et colon). Les études biochimiques *in vitro* et *in cellulo* ont pu mettre en évidence que K289 est monoubiquitinilé par une ubiquitine E3 ligase *in vitro* et *in cellulo* (80, 83). Cette ubiquitination est nécessaire pour le contrôle de trafic subcellulaire cytoplasmique et nucléaire de PTEN. Les auteurs montrent que la mutation inhibe l'importation de PTEN dans le noyau. Rétrospectivement, nous voyons que de certaines tumeurs sont liées à une localisation subcellulaire anormale de PTEN. Cette avancée nous permet d'envisager de nouvelles pistes pour contrôler le trafic cellulaire de PTEN à partir des données biochimiques. Ces recherches ont permis aussi d'identifier de nouvelles cibles potentielles. Ce cercle vertueux (génétique -> biochimie -> biologie moléculaire et cellulaire ->...) est à mon sens un très bon exemple pour le développement d'un sujet de recherche.

Problématiques

L'objectif de ma thèse « Implication de la kinase MAST2 et de la phosphatase PTEN dans la survie neuronale induite par la glycoprotéine du virus de la rage » est d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de la survie neuronale induite par le virus de la rage. Ce virus neurotrope induit une encéphalomyélite d'issue toujours fatale. Sa virulence est fondée sur sa capacité à induire la survie du neurone qu'il infecte. L'Unité de Neuroimmunologie Virale dirigée par M. Lafon, avec qui nous collaborons, a montré que la glycoprotéine G virale est responsable du phénotype de survie de la cellule infectée. Plus précisément, les quatre acides aminés C-terminaux de la glycoprotéine G (-QTRL_{COOH}) sont essentiels : ils codent pour un motif de reconnaissance de domaine PDZ (PDZ-BS). Les domaines PDZ sont composés d'environ 100 acides aminés impliqués dans la régulation de nombreuses voies de signalisation *via* des interactions protéine-protéine. Les partenaires neuronaux de la glycoprotéine virale ont été identifiés par double-hybride : la glycoprotéine de survie reconnaît uniquement deux isoformes de la famille des microtubule associated serine threonine kinase (MAST1 et MAST2) (Préhaud *et al*, 2010, Annexe 2). La kinase MAST2 possède une fonction inhibitrice de survie en régulant négativement l'élongation des neurites et en induisant leur rétraction. MAST2 interagit avec le PDZ-BS de PTEN, qui comme MAST2, inhibe la survie neuronale.

L'infection virale, comme l'extinction des gènes PTEN ou MAST2, déclenche la survie du neurone infecté. Nous avons proposé l'hypothèse, avec nos collaborateurs, que la glycoprotéine virale serait capable d'inhiber le complexe PTEN/MAST2 en entrant en compétition avec PTEN pour sa liaison au domaine PDZ. Mon projet de thèse a consisté à tester cette hypothèse, aussi bien au niveau structural *in vitro* que biologique *in cellulo*. Pour cela, j'ai résolu les structures par RMN des deux complexes formés par MAST2-PDZ avec les domaines C-terminaux de liaison de PTEN et de la glycoprotéine G et j'ai étudié les propriétés biophysiques de ces interactions. J'ai par ailleurs suivi le devenir de PTEN au cours de l'infection virale, en faisant l'hypothèse que l'inhibition de la formation du complexe MAST2/PTEN se traduit, lors de l'infection, soit par sa dégradation, soit par sa relocalisation subcellulaire.

Mon projet de thèse consiste donc en une étude structure-fonction du domaine PDZ de MAST2 (MAST2-PDZ) en interaction avec ses ligands viraux (Cyto13-G) et endogènes (PTEN-Cter) afin de proposer un mécanisme moléculaire à l'origine de la survie du neurone infecté (Résultats 1). Dès le début du projet, nous avons constaté que MAST2-PDZ a la propriété de s'autoassocier *in vitro*, régulée par la fixation du ligand. Nous avons étudié dans le détail ce mécanisme par diverses approches biophysiques.

Nous avons proposé que l'interaction MAST2-PDZ/PTEN-Cter module la phosphorylation du domaine C-terminal de PTEN par MAST2. PTEN est phosphorylée en plusieurs sites par différentes kinases exprimées dans les cellules neuronales. Dans un premier temps, nous avons étudié finement la phosphorylation de PTEN-Cter *in vitro* par des kinases purifiées en associant RMN et spectrométrie de masse. Nous avons comparé le profil de phosphorylation *in vitro* avec celui obtenu dans des extraits de neuroblastomes humains. Nous avons dans un deuxième temps entrepris la production du domaine kinase MAST2 par différentes approches (Résultats 2).

Enfin, nous avons montré que des peptides ciblant MAST2-PDZ ont la capacité de déclencher par eux-mêmes la survie de cellules dans lesquelles ils ont pénétré. Nous avons alors utilisé les structures de MAST2-PDZ en complexe afin d'optimiser des séquences peptidiques capables de restaurer la survie de neurones en souffrance en postulant que les molécules les plus affines pour MAST2 sont potentiellement les plus efficaces pour induire la survie neuronale (Résultats 3).

Résultats

Résultats 1

« L'interaction de MAST2 avec la glycoprotéine G déclenche la survie de neuroblastomes infectés par le virus de la rage et s'accompagne d'une relocalisation cellulaire de PTEN. »

Résumé

PTEN et MAST2 sont deux protéines inhibitrices de la survie neuronale qui dans la cellule forment un complexe protéique grâce à l'association du domaine PDZ de MAST2 avec la séquence C-terminale de PTEN porteuse d'un site de liaison aux domaines PDZ (PDZ-BS). Dans une cellule neuronale infectée par le virus de la rage (RAVB), le PDZ-BS porté par le C-terminal du domaine cytoplasmique de la glycoprotéine virale (Cyto-G) se lie également au MAST2-PDZ. L'infection virale comme l'extinction des gènes PTEN ou MAST2 déclenchent la survie du neurone infecté, suggérant que la glycoprotéine virale est capable d'inhiber le complexe PTEN/MAST2 en entrant en compétition avec la phosphatase pour le site de liaison au PDZ. Afin de proposer les bases moléculaires d'une telle compétition, les structures par RMN des complexes formés par MAST2-PDZ et les séquences C-terminales de PTEN et de Cyto-G ont été résolues. Nous avons constaté que ces deux complexes PDZ/ligands possèdent une même surface étendue et originale d'interaction et que les peptides viraux et endogènes possèdent des propriétés communes de liaison que nous avons étudiées en détail. De plus, nous avons mis en évidence que la glycoprotéine G virale favorise l'exclusion nucléaire de PTEN dans des cellules de neuroblastomes infectés. Cette relocalisation est dépendante du PDZ-BS de la glycoprotéine G. Notre étude montre que la localisation cellulaire de PTEN est perturbée par l'inhibition du complexe MAST2/PTEN *via* le PDZ-BS de la glycoprotéine G et ouvre des perspectives sur le mécanisme de régulation de PTEN lié à la survie neuronale.

1.1. Article : Terrien *et al*

Interference of PTEN/MAST2 interaction by a viral protein leads to PTEN cellular relocalization.

Elouan Terrien^{1,2,3}, Alain Chaffotte^{1,2}, Mireille Lafage^{4,5}, Zakir Kahn^{4,5}, Christophe Prehaud^{4,5}, Florence Cordier^{1,2}, Catherine Simenel^{1,2}, Muriel Delepierre^{1,2}, Henri Buc⁶, Monique Lafon^{4,5*}, Nicolas Wolff^{1,2*}

1. Institut Pasteur, Unité de Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules, Département de Biologie Structurale et Chimie F-75015 Paris, France

2. CNRS, UMR3528 F-75015 Paris, France

3. Univ. Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

4. Institut Pasteur, Unité de Neuroimmunologie Virale, Département de Virologie F-75015 Paris, France

5. CNRS, URA3015 F-75015 Paris, France

6. Institut Pasteur F-75015 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed:

E-mail: monique.lafon@pasteur.fr tel : +33 (0)1 45 68 87 52; fax : +33 (0)1 40 61 33 12

E-mail: nicolas.wolff@pasteur.fr tel : +33 (0)1 45 68 88 72 ; fax : +33 (0)1 45 68 89 29

One sentence summary: A viral protein as a tool for PTEN trafficking study

Title: 96 characters

Manuscript: approximately **9840 words**

Abstract 223 words

Two inhibitors of neuronal survival, the PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) and MAST2 (microtubule-associated Ser/Thr kinase 2) proteins, interact together *via* the PDZ domain of MAST2 (MAST2-PDZ) and the C terminal sequence of PTEN (PDZ-BS). When human neuroblastoma cells are infected by rabies virus (RABV), MAST2-PDZ is also targeted by the C-terminal PDZ-BS of the viral G protein. RABV infection triggers survival in a PDZ-BS–dependent fashion, as does the silencing of *PTEN* or *MAST2*. The viral G protein and PTEN may then compete to bind the MAST2-PDZ. The C-terminal sequences of PTEN and of RABV G protein interact strongly and similarly with MAST2-PDZ. The NMR structures of these complexes exhibit the same unexpected large surface of interaction, a structural basis for the specificity of these recognitions. Additionally, expression of the viral G protein in infected neuroblastoma cells promotes the nuclear exclusion of PTEN in a PDZ-BS–dependent manner without alteration of the total cellular pool of PTEN. These findings suggest that the formation of a complex between MAST2 and PTEN is specifically affected by the viral G protein, and emphasize how the disruption of a critical protein-protein interaction regulates intracellular PTEN trafficking. In turn, the data show how the viral protein might be used to decipher the underlying molecular mechanisms, and to clarify how PTEN subcellular localization regulates neuronal survival.

Introduction

The phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 protein (PTEN) is widely expressed in brain, preferentially in neurons and at the synapse (1), where it affects neuronal survival (neurite outgrowth and axonal regeneration). Through its ability to dephosphorylate the 3' position of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PTEN inhibits the survival/proliferative signaling pathway initiated by phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and relayed by the downstream AKT serine threonine kinases (2-4). Inactivation of PTEN exerts a neuroprotective effect on neuronal precursors (5), enhances self-renewal or proliferation of neural progenitors (6), promotes dendritic and axonal growth, and modulates axon branching (7-11).

PTEN, originally described as a protein localized in the cytoplasm, can also be found at the plasma membrane (12), in micro-domains (13), and in the nucleus, where it exerts additional functions likely independently of its phosphatase activity (14). Cellular compartmentalization is critical for the regulation of PTEN functions (15). In particular, PTEN must be brought to the plasma membrane to antagonize PI3K activity. The balance between nuclear and cytoplasmic localization of PTEN is crucially affected during tumorigenesis, apoptotic processes and neurosurvival after ischemia (16,17). Localization and posttranslational modifications are not independent events; the nuclear import of PTEN requires mono-ubiquitination at specific lysine residues (18) and the interaction with the Nedd4 family-interacting protein 1 (Ndfip1), a protein regulating PTEN ubiquitination (17). In addition, maintenance and entry of PTEN in nucleus is clearly affected by phosphorylation of its unstructured C-terminal domain (PTEN-Cter), itself related to the ubiquitinated status of PTEN (15, 17, 19). Nevertheless, a detailed mechanism of action encompassing all these observations is still lacking (20, 21).

For PTEN to be fully active at the membrane, a stretch of several Ser/Thr residues present in PTEN-Cter must be dephosphorylated (22). PTEN function is also modulated by its insertion in numerous multi-protein complexes. PTEN-Cter interacts with scaffold proteins such as membrane-associated guanylate inverted kinase 2 (MAGI2) (23), Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (NHERF) (24), prostate apoptosis response 3 (Par-3) (25) or the microtubule-associated Ser/Thr kinases 1, 2, and 3 (MAST1, 2, and 3). The sequestration of only a small fraction of PTEN by NHERF at the plasma membrane is sufficient to attenuate AKT survival signaling in cells treated with platelet-derived growth factor (24). The binding of MAST2 to PTEN has also been demonstrated to increase the efficiency of PTEN phosphorylation (26). The interaction between these two proteins involves a PDZ domain

(MAST2-PDZ) located in the central part of MAST2 (27, 28) and a PDZ binding site (PDZ-BS) formed by the final three amino acids (aa) (-TKV_{COOH}) of PTEN. PDZ domains are modular structures, 80 to 100 aa long, and are well known to mediate transient protein-protein interactions (29) that are centrally involved in organizing signal transduction pathways. MAST2 is a submembrane protein localized at the postsynaptic region of the neuromuscular junction and central synapses in several parts of the brain (30, 31). It belongs to the family of AGC kinases. MAST2 was identified as an antagonist of neuronal survival *via* its ability to inhibit neurites outgrowth and to stimulate neurites retraction (32), and MAST2 inactivation in human neuroblastoma cells triggers survival as PTEN silencing does in rat dorsal root ganglion neurons (33).

Assessing the role of the PDZ-BS of PTEN may be one way to advance the understanding of PTEN function in neuronal survival. Indeed, the interaction established by the PTEN PDZ-BS with the MAST2-PDZ can be specifically challenged in living cells because it has been previously shown that MAST2-PDZ is also targeted by the C-terminus (-TRL_{COOH}) of the envelope G protein of the rabies virus (RABV) (34, 35). RABV is a strictly neurotropic virus that has acquired the selective advantage to promote the survival of the neurons that it infects (36). The interaction between MAST2-PDZ and the PDZ-BS of the RABV G protein results in the selective recruitment of MAST2 at the membrane of RABV-infected cells. Provided that the RABV strain is a virulent one, this recruitment deeply influences the fate of the infected neuronal cells by activating the cellular P-Akt pathway and promoting neurites outgrowth (35). Neurons are then affected in a manner qualitatively similar to the attenuation of endogenous PTEN. On this basis, we surmised that, if the competition between PTEN and the G protein towards the PDZ domain of MAST2 was specific enough, infection by a virulent RABV strain would target and abolish this sole interaction of PTEN in cells. This would likely result in a discrete perturbation of a functional feature of endogenous PTEN.

To understand the respective binding specificities of PTEN and RABV G protein with MAST2-PDZ, we solved the structures of the MAST2-PDZ domain in complex with the 13 aa C-terminal sequences of PTEN (MAST2-PDZ/PTEN13-Cter) and of RABV G protein (MAST2-PDZ/Cyto13-att). Astonishingly, the C-terminal domains of PTEN and RABV G protein each possess the same unexpected network of connectivity, defining a common and original surface of interaction with the MAST2-PDZ domain. Next, we analyzed the fate of PTEN localization in infected neuronal cells when the formation of the complex between MAST2-PDZ and PTEN is likely prevented by the viral G protein. Our results strongly

support the possibility that RABV Cyto-G may compete efficiently with PTEN to bind the MAST2-PDZ, resulting in a drastic alteration of sub-cellular PTEN localization.

Results

PTEN13-Cter binds to MAST2-PDZ via both canonical and distal interactions. The interaction between MAST2-PDZ and PTEN13-Cter was quantified in vitro by means of isothermal titration microcalorimetry experiments. The apparent dissociation constant $K_D(\text{app})$ was 2 μM at a concentration of 1.8 μM monomer units. Binding was mainly driven by an overall enthalpy contribution ($\Delta H_{\text{app}} \approx -6$ kCal/mol). Then, the complex was analyzed at the atomic level by means of NMR experiments.

The structure of the MAST2-PDZ/PTEN13-Cter complex was solved by NMR (Fig. 1A). NOE assignment and structure calculation of the MAST2-PDZ/PTEN13-Cter complex were performed using ARIA2.2 and HADDOCK software programs. Sixty-seven intermolecular distances between MAST2-PDZ and PTEN13-Cter were estimated from filtered NOE NMR experiments. The final ensemble of ten structures of lowest energies has an average pair-wise root mean square deviation (RMSD) of $0.9 \pm 0.2 \text{ \AA}$ for backbone atoms (Table S1).

MAST2-PDZ adopts the topology of the PDZ domain, with five β -strands and two α -helices. As expected, the extreme C-terminus of the PTEN13-Cter interacts tightly with the PDZ binding groove composed of $\alpha 2$ -helix and $\beta 2$ -strand. It forms an antiparallel β -strand via a complete set of canonical intermolecular backbone hydrogen bonds. Eighty-six percent of intermolecular NOEs involve the final three C-terminal amino acids of PTEN13-Cter (-TKV_{COOH}). MAST2-PDZ possesses the class I domain-specific interaction network, which allows recognition of the consensus sequence Ser/Thr-X- Φ _{COOH} where X is any residue and Φ is a hydrophobic residue. The backbone amides of Tyr¹⁷, Gly¹⁸, and Phe¹⁹ of the carboxylate-binding loop are hydrogen-bonded to the C-terminus of PTEN13-Cter, while the side chain of Val⁽⁰⁾ enters the deep hydrophobic cavity formed by Tyr¹⁷, Phe¹⁹, Val⁷⁷, Ile⁸⁰, and Leu⁸¹. The cationic side chain of Lys⁽⁻¹⁾ interacts with the methyl side chain of Thr²⁰ of the MAST2-PDZ through hydrophobic contacts, and is linked to Glu⁴³ through an ionic bond downstream of the $\beta 3$ strand. The methyl side chain of Thr⁽⁻²⁾ establishes a hydrophobic interaction with the side chain of Val⁷⁷ from the $\alpha 2$ helix, and its hydroxyl group is hydrogen-bonded to the N $\epsilon 2$ of His⁷³. Ile⁽⁻³⁾ is stabilized by hydrophobic contacts involving the aliphatic side-chain of Arg²².

Additionally, we identified that the N-terminal sequence of PTEN13-Cter also interacts with MAST2-PDZ. The originality of this binding mode arises from the interactions occurring between the N-terminal aromatic residue of PTEN13-Cter Phe⁽⁻¹¹⁾ and the β 2, β 3, and β 5 strands of the MAST2-PDZ. Phe⁽⁻¹¹⁾ interacts with exposed hydrophobic residues of β 2 and β 3 strands (Fig. 1B). Intermolecular NOEs were observed between the benzyl side chain of Phe⁽⁻¹¹⁾ and the Ile²⁴, Met³⁹, Val²⁶, and Leu⁹⁴ side chains of MAST2-PDZ β 2, β 3, and β 5 strands (fig. S1). This hydrophobic cluster is conserved in the MAST family (MAST1, 2, 3, and 4) (Fig. 1C). The Trp⁴¹ indole group of the MAST2-PDZ is at 4-5 Å from the Phe⁽⁻¹¹⁾ benzyl side chain in an edge-to-face conformation. Notably, we did not observe any contacts between the central 6-aa linker separating the two anchor points and the PDZ domain.

Thus, the complex formed by the PTEN13-Cter and the MAST2-PDZ involves both the final four aa at the C-terminus of the peptide and a second anchorage site composed of the N-terminal Phe residue interacting with exposed residues of the MAST2-PDZ β -sheet.

The RABV Cyto13att mimics the binding mode of PTEN13-Cter with MAST2-PDZ. Analysis of the binding mode of MAST2-PDZ with the 13-aa C-terminal domains of four different RABV G peptides (Cyto13-vir, Cyto13-att, Cyto13-IRL, and Cyto13-ARL) (Table1) revealed a $K_D(\text{app})$ ranging from 0.57 to 14 μM ; Cyto13-att had the greatest affinity (0.57 μM). We solved the NMR structure of the MAST2-PDZ/Cyto13-att complex (Fig. 1D). The RMSD of the 10 lowest-energy structures was 0.89 ± 0.2 Å for backbone atoms. The C-terminal anchor, which encodes a class I PDZ-BS, is constituted by the final three C-terminal peptide residues (-TRL_{COOH}) inserted into the PDZ binding pocket in a conventional mode. This interaction network is similar to the one observed for PTEN13-Cter (-TKV_{COOH}). Competition binding experiments, done by NMR, showed that PTEN13-Cter and Cyto13-att peptides compete at the same site for the binding to MAST2-PDZ (fig. S2). As previously described (27), the substitution (Gln to Glu) at position -3 of Cyto13-vir and Cyto13-att, respectively, leads to a contrasted phenotype due to a relaxation of specificity; however, as observed by NMR, the mutation leads to only minor conformational fluctuations of the MAST2-PDZ (fig. S3). The binding of RABV G peptides to the MAST2-PDZ is mainly driven by a large enthalpy contribution ($\Delta H_{(\text{app})} \approx -10$ kcal/mol). In addition, we demonstrated that MAST2-PDZ can also bind class II PDZ-BS (-ARL_{COOH} and -IRL_{COOH}) and various residues in position -3 (Asp, Gln, and Glu), expressed by different RABV strains, without a drastic decrease of affinity (Table 1). The O ϵ 2 atom of Glu⁽⁻³⁾ accepts hydrogen bonds from

the guanidino group of Arg²² from the β 2 strand. The variety of residues at positions -2 and -3 of the four tested viral sequences highlights the robustness of MAST2-PDZ to accept a variety of aa.

As observed for Phe⁽⁻¹¹⁾ of PTEN13-Cter, a second distal anchor point involving Trp⁽⁻¹¹⁾ binds the hydrophobic cluster of β 2- β 3 strands (a cluster strictly aligned with the cluster observed for PTEN13-Cter). The MAST2-PDZ residues in contact are Ile²⁴ and Val²⁶ of the β 2 strand and Trp⁴¹ of the β 3 strand (Fig. 1E). Intermolecular NOEs indicate that the indole group of MAST2-PDZ Trp⁴¹ in the β 3-strand interacts with the indole group of the Trp⁽⁻¹¹⁾ of Cyto13-att at 2-3 Å (fig. S4). The side chains of Trp⁴¹ and Trp⁽⁻¹¹⁾ adopt an edge-to-face conformation. As observed for the MAST2-PDZ/PTEN13-Cter complex, no contact was detected between the 6-aa linker separating the two anchor points and the PDZ domain. The flexibility of the conserved Gly pair likely favors the distortion required to insure a concomitant contact at the two anchors. Notably, Trp⁽⁻¹¹⁾ and at least one of the two Gly residues are conserved in the majority of RABV G proteins.

To assess the respective energetic contributions of the anchor points, bindings were measured (Table 1) with a tetrapeptide (Cyto4-att) encompassing the four C-terminal residues, and a peptide that contains a Trp to Ala substitution at position -11 (Cyto13-att-W(-11)A). Suppression of the 9 aa upstream of Cyto13-att decreased the $K_D(\text{app})$ of Cyto4-att by 11-fold (6.37 μM), while the W(-11)A substitution decreased the $K_D(\text{app})$ of Cyto13-att-W(-11)A by 3-fold (1.64 μM). The loss of the N-terminal anchor is energetically equivalent to the loss of the crucial interaction occurring at position -2 monitored with the -ARL_{COOH} and -IRL_{COOH} PDZ-BS, which indicates that although the C-terminal anchor is the major contributor to the overall binding enthalpy, the N-terminal anchor also plays a critical role in the optimal and specific interaction with the MAST2-PDZ.

Altogether, these results indicate that PTEN and RABV G have striking similarities in their mode of binding to the MAST2-PDZ. The interaction of PTEN and viral peptides with the MAST2-PDZ involves both canonical PDZ-BS/PDZ interaction and distal binding that includes the contribution of a second anchor to the extended β 2/ β 3 strands of the PDZ domain.

Both PTEN13-Cter and Cyto13-att favor full dissociation of dimeric MAST2-PDZ. At high concentrations and in the absence of peptide, multimeric forms of MAST2-PDZ coexist in solution. At concentrations below 100 μM , the monomeric and dimeric species strongly

predominate over the other multimeric forms, in agreement with our sedimentation experiments (Table 2). Sedimentation equilibrium experiments performed at various speeds (22,000, 26,000, 32,000, and 44,000 rpm) and at different concentrations (30, 45, 180, and 722 μM) yielded an equilibrium dissociation constant of 29 μM compatible with the progressive shift in the emission fluorescence spectrum of the protein when the concentration of MAST2-PDZ is varied (fig. S5).

Upon addition of PTEN13-Cter, this multimer equilibrium is shifted fully towards the monomer species (Table 2). Such a shift was also observed when Cyto13-att was added to the solution, indicating that the two peptides have the same ability to favor the monomeric species of MAST2-PDZ. The multimer equilibrium is not affected by the addition of the truncated Cyto9- $\Delta 4$, indicating that the PDZ-BS is required for the dissociation of MAST2-PDZ.

Tightly associated dimers have been observed for the X-ray structures of the MAST1-PDZ and MAST3-PDZ domains (Fig. 2A, *left panels*). These dimeric structures have been artificially stabilized via the *cis* addition of a PDZ-BS at the C-terminal end of the PDZ, each protomer binding the PDZ-BS of the other. The monomer-monomer interface involves the conserved hydrophobic clusters of $\beta 2/\beta 3$ strands from each MAST1 and MAST3 PDZ protomer. This hydrophobic cluster is also conserved in MAST2-PDZ and is involved in the binding of the N-terminal sequences of PTEN13-Cter and Cyto13-att (Fig. 2A *middle and right panels*, and Fig. 2B). Consequently, we propose that the N-terminal anchor of Cyto13-att precludes the MAST2-PDZ self association by masking the hydrophobic clusters of the $\beta 2/\beta 3$ strands.

To confirm that the dissociation of MAST2-PDZ dimers by the peptides follows a similar mechanism, we compared the fluorimetry titrations of MAST2-PDZ at 2 μM and 30 μM by PTEN13-Cter and Cyto13-att. Based on the monomer/dimer equilibrium constant of 29 μM , we calculated the percentages of monomer that are equal to 89% and 49% for 2 μM and 30 μM , respectively. Indeed, both peptides induce a fluorescence change of Trp⁴¹ in MAST2-PDZ. We established that the peptides quasi-exclusively bind to the MAST2-PDZ monomers. The $K_D(\text{app})$ of the monomer-peptide complex, deduced from a simple site-to-site mechanism at 2 μM of MAST2-PDZ, approximates the true dissociation constant. As expected, at this MAST2-PDZ concentration, only very low peptide binding cooperativity is observed, and the $K_D(\text{app})$ displayed in Table 1 are extremely close to the true K_D .

The in vitro interaction of RABV Cyto13-att or PTEN13-Cter with MAST2-PDZ is therefore a synergistic mechanism involving the N- and C-terminal anchors that prevents the self-association of MAST2-PDZ. Again, regarding this property, RABV Cyto13-att and PTEN13-Cter display a striking similarity.

The PDZ-BS of RABV G protein decreases the pool of nuclear PTEN in RABV-infected neuroblastoma cells. Having shown that the C-terminal sequences of PTEN and the RABV G protein have similar structural and biophysical properties, we next examined the possibility that the fate of PTEN was modified in infected neuronal cells through a competition between RABV G protein and PTEN. For this purpose, human-derived neuroblastoma SH-SY-5Y cells were non-infected (N.I) or fully infected for either 24 hours or 48 hours with recombinant RABV (rRABV) expressing either the full-length G protein (RABV-vir) or a PDZ-BS-deleted G protein (RABV-Δ4). PTEN and G protein amount were compared in the three conditions by Western blotting (Fig. 3A), and quantified by chemiluminescence analysis (Fig. 3B). G/PTEN ratio were calculated in the infected cells. Results are shown for 48 hours after rRABV infection. As shown in Fig. 3A, RABV infection slightly modifies the global concentration of PTEN whereas the concentration of the RABV G protein vastly overcomes that of PTEN in all cases (Fig. 3C). Thus, a complex occurring between MAST2-PDZ and PTEN-Cter is likely abolished in the infected cells.

To assay the impact of this putative disruption, we used confocal microscopy and compared the cellular distribution of PTEN in rRABV-infected and in N.I cells 48 hours post-infection. Cells were three colors-stained with a mouse monoclonal antibody raised against RABV G protein to detect infected cells (Fig. 4A), Hoechst staining to delineate the nucleus (Fig. 4, A to D), and a rabbit polyclonal PTEN-specific antibody (Fig. 4, C and D). In RABV-infected neuroblastoma cells (Fig. 4A), as already observed (27) the protein G is exclusively located in the cytoplasm with accumulation at the plasma membrane. In the absence of infection (Fig. 4D) PTEN is detected in both the cytoplasm and in the nucleus. In striking contrast to what happens in N.I cells, RABV infection triggers the exclusion of PTEN from the nucleus (Fig. 4C). This is marked, firstly, by the absence of correlation between the two fluorescent signals corresponding to PTEN and the nucleus respectively in RABV-vir-infected cells (Fig. 4, E and F) as compared to NI cells (Fig. 4, G and H) and, secondly, by the decrease of the ratio between nuclear and cytoplasmic PTEN after RABV-vir infection (0.60) compared with NI (0.92) (Fig. 4I). The observation in RABV-Δ4 infected

cells that this ratio (0.87) was similar from those of NI cells (0.92) indicates that RABV excludes PTEN from the nucleus in a PDZ-BS–dependent fashion (Fig. 4I).

The same type of cells was infected with a lentivirus engineered to deliver the G protein of RABV-vir only. As shown in Fig. 5A, in a cell expressing the G protein (green), fluorescence intensity of PTEN in the nucleus is faint (nucleus remains blue in the merge image) suggesting nuclear exclusion of PTEN. In contrast, in the neighboring cell that does not express the G protein, PTEN still localizes in the nucleus (nucleus turns purple in the merge image). When cells were infected with a lentivirus engineered to deliver the G protein of RABV-vir lacking the PDZ-BS (RABV-vir delta) (Fig. 5B), nuclear exclusion was not observed any more. PTEN is therefore efficiently excluded from the nucleus by the sole expression of the G protein in a PDZ-BS dependent manner.

As a control, we checked whether a pulse with a peptide encoding the PTEN13-Cter, where the PDZ-BS of PTEN is located, could lead to similar results, PTEN nuclear exclusion was again observed in this case but the dominant feature was that overall amount of PTEN in the peptide loaded cells was reduced (fig. S6): injection of a peptide corresponding to the C-terminus of PTEN, and able to compete with endocellular PTEN at other PDZ domains has a drastic effect on the whole cellular content of PTEN and not only on its localization. For our purpose, the study of the role of nuclear PTEN in neuron homeostasis, the viral competitor appears to be a tool more finely tuned than a C-terminal PTEN peptide sequence.

Altogether, our results strongly support the hypothesis that RABV G protein and PTEN compete in cells for the MAST2-PDZ. Our approach specifically targets this unique interaction and leads to more clear-cut results than a competition of PTEN by its C-terminal homolog. We conclude that the MAST2-PTEN interaction in cells has a drastic impact on the compartmentalization of PTEN in neuronal cells.

Discussion

Several viral proteins contain short, generally disordered signaling regions that are able to rewire and to deregulate cellular pathways (35, 37). Interference with cellular homeostasis has been specifically documented with respect to C-terminal regions of viral proteins able to target PDZ domains, particularly in the case of HPV, HTLV-1, influenza virus, or RABV, through the cytoplasmic tail of its G protein (35, 38). Using viral proteins as interfering tools to characterize the pathways that they perturb requires that upon infection, they act as competitors endowed with great specificity and sufficient affinity in a vital

cellular process. Here, we provide the first structural and biological evidence that this is indeed the case for the perturbation exerted by the RABV G protein on the interaction linking the PDZ domain of MAST2 with the PDZ-BS of one of its endogenous ligands, PTEN.

We have analyzed the perturbation of host cellular processes that triggers survival of infected neuronal cells, a competition between the viral RABV G protein and PTEN for the PDZ domain of MAST2. Based on our NMR data, we have demonstrated that G protein and PTEN interact similarly with the PDZ target, in an original manner implying not only the final amino acids of canonical C-terminal regions, but also another anchoring region at the N-terminus of the assayed peptides. This distal anchoring binds an exposed hydrophobic patch present in the extended $\beta 2/\beta 3$ strands of MAST2-PDZ, a region previously shown to be involved in the auto-association of the MAST1-PDZ and MAST3-PDZ from the highly conserved MAST kinase family. In agreement with these observations, we have demonstrated that both endogenous and viral ligand binding lead to the complete monomerization of MAST2-PDZ.

We compared the affinity of the PDZ-MAST2/Cyto13-att association with a set of binary interactions quantified by fluorescence polarization and involving 217 peptides and 85 mouse PDZ domains (39). Our complex belongs to the rare class displaying the highest (i.e., sub-micromolar) affinity, 4% of the total. We discuss below the contribution of the N-terminal anchor to the complex's affinity, its specificity, and possibly to the regulation of the binding process. As documented in several studies, the final four C-terminal amino acids are sufficient to mediate a substantial interaction with PDZ domains. Here, the terminal residues of the two types of sequences contribute mainly to the strength of binding with MAST2-PDZ. However, as shown by the W(-11)A substitution and the N-terminal deletion in the viral peptide, the N-terminal anchoring increases the peptide's affinity for MAST2-PDZ. The presence of elongated $\beta 2$ and $\beta 3$ strands in the recipient domain of MAST2-PDZ is also shared by a few other PDZ domains, including PAR3-PDZ3 (2K20) and GRASP-PDZ (2PNT). Exhaustive studies on human PDZ domains and random peptides 10 amino acids long have shown that up to seven C-terminal residues of the ligand may be implicated in the interaction with PDZ domains (39, 40). Our results extend this range to 12 residues, and more importantly, they assess the reason for the extension of this network of interactions. The presence of an additional interaction implying a specific position of the peptide and an original feature of the PDZ domain clearly reinforces the specificity of an interaction in the C-terminal part of the sequences of both PTEN and G protein that otherwise appears to be relatively trivial. It was shown previously that the C-terminal sequence of the G protein of

virulent RABV has a single known cellular family of interactors upon infection: MAST2 and its isoform, MAST1 (35). This high specificity can now be explained by the structural particularities of the G protein's interaction with MAST-PDZ. The key residues of ligands involved in this supplementary set of interactions at position -11 (Phe for PTEN and Trp for the G protein) are conserved. Furthermore, to exclude other spurious interactions, the residue at position -3 should be unable to contract interactions with other PDZ domains, a feature leading to recruitment of proteins controlling adverse pathways (41). In the case of PTEN, the aromatic residue present at -11 is also conserved and preserves the recognition of MAST-PDZ. However PTEN must also recognize other motifs. Indeed, recognition of Par-3 also requires distal interactions, besides the very C-terminal sequence. These distal electrostatic contacts involve three acidic residues at positions -8, -9 and -10 of PTEN and, again, the extended $\beta 2/\beta 3$ strands of the Par-3 PDZ3 domain (42). This triplet of charges is absent at homologous positions of all presently known sequences of the G protein of different RABV isolates, suggesting that the virus, during adaptation to its hosts has increased its specificity towards a single PTEN interaction.

The peptide induced breakdown of a PDZ-PDZ interface is another similarity, worthy of consideration. The N-terminal anchoring interferes via steric interactions with the formation of MAST2-PDZ homodimers involving the extended $\beta 2/\beta 3$ strands. The global structure of this hydrophobic auto-association region is similar to that observed in the MAST1-PDZ and MAST3-PDZ, as well as the structures of other PDZ domains, including GRASP-PDZ (2EGK) and NHERF4-PDZ3 (2V90). Notably, the frequency of PDZ-PDZ interactions in eukaryotic proteins has been recently documented (43). Dimerization occurs *in vitro* in 30% of the 157 PDZ domains tested. Although several types of heterologous complexes involving MAST2 and SAST124, an isoform of MAST1 (31, 44), have been documented, auto-association of MAST2 has not been yet studied in cells. Neutralization of the dimeric interface of its PDZ domain upon peptide acceptance may provide an interesting clue for MAST2 regulation that could follow one of the allosteric mechanisms postulated for PDZ conformational changes (45).

Our work points out that the G protein appears to be a convenient tool to specifically disrupt the binary interaction between PTEN and MAST2 in cells. We have shown above how this competitor could be conveniently delivered via lentivirus vectors. We have documented a specific result emerging from this strategy, the partial exclusion of PTEN from the nucleus during infection by a virulent RABV strain. As MAST2 inactivation leads to a

phenotype similar to PTEN inactivation, we initially made the hypothesis that during RABV infection the total amount of PTEN would decrease, relieving a block against cellular proliferation; it turned out not to be so, the amount of PTEN in human neuroblastoma cells remaining roughly stable during infection. Rather, the viral G protein specifically alters the cellular localization of PTEN in neuroblastoma, decreasing the preferential localization of PTEN in the nucleus of NI cells. A lower concentration of nuclear PTEN in human neuroblastoma cells infected with a RABV strain triggering neurosurvival is consistent with the report of lower concentrations of nuclear PTEN observed in highly proliferating advanced tumors (46). The mechanisms by which the exit of PTEN from the nucleus controls survival and proliferation are currently unclear. This could be related to the tumor-suppressive function exerted by PTEN within the nucleus, recently documented by Song and coworkers and assign to its regulating role on the assembly and activity of APC-CDH1 (47).

When human neuroblastoma cells were exposed to hypoxia, the stress stimulus did not affect the total cellular pool of PTEN, as in our case, and also resulted in nuclear PTEN entry(17). While in these two studies, the neuronal survival is obtained with nuclear PTEN trafficking, hypoxia and infection result in trafficking in opposite directions. After ischemia, neuronal survival was concomitant of PTEN migration into the nucleus, whereas, in RABV infection the triggering of neuronal survival was accompanied with PTEN migration outside the nucleus. These differences seem to depend upon the basal localization of PTEN before application of the stress. Under normal homeostasis, PTEN is localized in the nucleus and in the cytoplasm of human neuroblastoma cells, mouse primary motor neurons (E13) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) as well (17, 48, 49), whereas PTEN is found predominantly in the cytoplasm of cortical neurons (17). The amount and the localization of endogenous PTEN are therefore highly cell and context specific. It is worth noting that in contrast to human neuroblastoma, murine cortical neurons express low amount of MAST2 (30), an observation suggesting a critical role for MAST2 in PTEN localization under homeostatic conditions. After a stress, cellular trafficking between the cytoplasm and the nucleus could be in reality a compensating mechanism, adjusting the PTEN concentration to similar values in the nuclear compartment of any cellular type, a level optimal for activation of signaling pathways commanding neurosurvival and neuroprotection.

Covalent modifications of the PTEN-Cter clearly affect its rate of nuclear import and its stability. Monoubiquitination operates faster on non-phosphorylatable forms of PTEN and favours nuclear entry (17). These non-phosphorylatable forms are also more susceptible to degradation (50). Hence response to an external stress can result from a shift in the dynamic

equilibrium existing between, phosphorylated and non-phosphorylated forms of PTEN and to a change in their cellular localization. Furthermore, these species bind differently to a tumor suppressor protein, PICT1 (51) and to Ndfip1, the latter being a crucial cofactor for rapid nuclear entry (17). Valiente and co-workers have already shown that binding of PTEN to MAST2-PDZ increases the rate of PTEN phosphorylation, most likely within the C-terminal stretch of Ser/Thr residues known to affect, once dephosphorylated, the overall protein stability (52-54). The catalytic domain of this AGC kinase is expected to display strong sequence specificity. We suggest that this pattern of post-translational modifications is modified, depending on the presence or absence of G protein interference, and that it drives the temporal re-distribution of PTEN upon viral infection.

The infection of neuronal cells with virulent RABV strains or with lentiviral constructs carrying the relevant C-terminal G sequences will now be used to investigate the mechanism by which the concomitant depletion of PTEN within the nucleus occurs, and whether this is the main road by which RABV regulates neuronal proliferation and survival.

Materials and Methods

Sample preparation for biophysical experiments

MAST2-PDZ, non-labeled and uniformly $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - or ^{15}N -labeled (1099–1193 renumbered 2-96), were expressed and purified as previously described (34). Peptides (Cyto13-att, Cyto13-vir, Cyto13-W(-11)A, Cyto13-ARL, Cyto13-IRL, Cyto4-att, Cyto9- Δ 4 and PTEN13-Cter) were synthesized in solid phase using an Fmoc strategy (Covalab) (see Table 1 for respective sequences).

NOE Assignments and Structure Calculations

Sequential assignment of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N signals was performed following standard procedures as previously described (34). All NMR experiments were carried out at 298 K on a Varian Inova 600MHz spectrometer equipped with a cryoprobe (2D ^1H - ^1H NOESY, 3D ^{13}C - and ^{15}N -edited NOESY-HSQC, 3D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -double filtered ^{13}C -edited NOESY to distinguish intra- and inter-molecular NOEs and 2D and 3D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -double filtered TOCSY for ^1H assignment of Cyto13-att and PTEN13-Cter). The mixing time was 120 ms for all NOESY spectra and 90 ms for the TOCSY spectrum. Proton $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ scalar couplings were determined from a 3D HNHA experiment. Coupling constants were transformed into dihedral angle constraints as follows: $\varphi = -120^\circ \pm 25^\circ$ for $^3J_{\text{HN-H}\alpha} \geq 8.0$ Hz, $\varphi = -65^\circ \pm 25^\circ$ for $^3J_{\text{HN-H}\alpha} \leq 5.5$ Hz.

Peaks in NOESY spectra were assigned with the program ARIA 2.2 (55) coupled to CNS 1.1 (56) following ARIA's standard protocols with spin diffusion correction. Chemical shift tolerances were set to 0.025 ppm for HN protons, and 0.05 ppm for protons in the indirect dimension of 3D experiments, 0.5 ppm for ^{13}C and for ^{15}N . To obtain the final structure ensemble, 100 structures were calculated with ARIA 2.2/CNS 1.1 and refined in explicit water using the PARALLHDG 5.3 force field. The 10 lowest total energy structures were selected and used as an input for the HADDOCK (high ambiguity driven docking) program 1.3 (57) to dock Cyto13-att or PTEN13-Cter onto the MAST2-PDZ. Initial Cyto13-att or PTEN13-Cter coordinates (unfolded peptides) were built with PyMOL (*available from <http://www.pymol.org>*). HADDOCK's parameters were left at their default values. The quality of the 10 best structures was analyzed with PROCHECK 3.5.4 (58) and

WHAT_CHECK (59). The statistics for the best 10 structures and of the experimental restraints are given in Supplementary Data Table S1.

Biophysical experiments

ITC. Measurements were made as previously described (34). In the case of an exclusive binding on the monomeric species, the $K_D(\text{app})$ (F) at any starting concentration of protein, $c(0)$ should be related to the true constant K_{D0} (F) by the equation: $K_{D0} = x \cdot K_D(\text{app})$, where x is the initial fraction of monomeric species at concentration $c(0)$, estimated from the equilibrium sedimentation data. Furthermore, all saturation curves should be devoid of any cooperativity, as was observed in the data given in Table 1, within experimental error.

Hydrodynamic characteristics. Samples of MAST2-PDZ and MAST2-PDZ complexes were centrifuged in a Beckman Coulter XL-I analytical ultracentrifuge at 25 °C in an AN60-Ti-equipped, four-hole rotor. Detection of the protein concentration as a function of radial position and time was performed by optical density measurements. For sedimentation velocity experiments, 300 μl of MAST2-PDZ (100 μM) or MAST2-PDZ (100 μM) in complex with Cyto4-att, Cyto9- $\Delta 4$, Cyto13-att, Cyto13-att-W(-11)A, and PTEN13-Cter (200 μM) was spun for 15 hours at a rotor speed of 60,000 rpm using 12-mm double-sector aluminum centerpieces. In sedimentation equilibrium experiments, 40 μl of MAST2-PDZ (30 μM , 45 μM , 180 μM , and 722 μM) was spun sequentially at rotor speeds of 26,000 rpm, 32,000 rpm, 38,000 rpm, 44,000 rpm, and 48,000 rpm using 12-mm 6-sector Epon centerpieces. The data were acquired after running times of 7 hours, 6 hours, 6 hours, 6 hours, and 2 hours for each speed, respectively.

The following parameters were calculated using Sednterp 1.09 and used for the experimental analysis: partial specific volume $\bar{v} = 0.746 \text{ ml g}^{-1}$, viscosity $\eta = 0.916 \text{ cP}$, and density $\rho = 1.00468 \text{ g ml}^{-1}$. Sedimentation velocity data analysis was performed by continuous size distribution analysis $c(S)$ using the program Sedfit 12.0 (available at <http://www.analyticalultracentrifugation.com>) (60). All $c(S)$ distributions were calculated with a fitted frictional ratio f/f_0 and a maximum entropy regularization procedure with a confidence level of 0.55. Sedimentation equilibrium radial distributions were analyzed by global fitting using the monomer–dimer model with Sedphat 8.2 software (available at <http://www.analyticalultracentrifugation.com>) (61). Monte Carlo analysis was performed on the fit to estimate measurement error.

Fluorescence Spectroscopy. The fluorescence spectra were recorded on a 1-ml sample using an LS-5B spectrofluorimeter (PerkinElmer Life Sciences). The excitation wavelength was set at 295 nm with an excitation bandwidth of 2 or 5 nm, and the fluorescence emission spectra were recorded from 300 to 450 nm (emission bandwidth of 5 nm) in the presence (ratio 1:1) or absence of peptide. The fluorescence emission spectrum of MAST2-PDZ was also recorded with addition of different peptide concentrations ranging from 1 to 130 μ M. After each dilution of MAST2-PDZ, a 5 min equilibrium period was allowed before recording the spectrum. The background fluorescence was recorded similarly in the absence of added proteins and subtracted from all spectra.

Note: All biophysics experiments were performed in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5 at 298 K.

Cells and virus. Recombinant RABV (rRABV) viruses expressing either a full-length G protein (RABV-vir) or a G protein lacking the PDZ-BS (RABV- Δ 4) were obtained as previously described (35). SK-N-SH (ECACC ref 86012802) or SH-SY-5Y (32) human-derived neuroblastoma cells were either non-infected or infected with each strain of rRABV at a multiplicity of infection of 3. Lentivirus vector coding for RABV-vir G protein or RABV-vir G protein Δ 4 were produced from the plasmid pRev-TRE-G-CVS (Gen Bank AF406694, Prehaud C. *et al.*, 2003). The G gene was isolated by high fidelity PCR and cloned in the lentivirus plasmid pLenti6.3/V5-TOPO® (In Vitrogen, France).

HIV vectors were prepared by co-transfecting HEK293 cells with a four-plasmid system including the above plasmids carrying the genes of interest, the pMDLg/pRRE and the pRSV-Rev packaging plasmids and the VSV-G protein expression plasmid (pMDG) (62). Supernatants were collected after 2 days. HIV Gag protein p24 measured in vector preparations by enzyme-linked immunosorbent assay (HIV p24 ELISA, Perkin Elmer, USA) was in the range of 70–100 ng of p24/ μ l. The infectivity of each stock was monitored on neuroscreen cells (Cellomics, USA) before use. SK-N-SH (6.0×10^4 cells) were infected for 48 hours with virus particles containing 30 ng of p24.

A FITC conjugated TAT-PTEN13-Cter peptide ($C_{21}H_{11}NO_5S$ -YGRKRRQRRR-PFDEDQHTQITKV) was synthesized. Cells were treated for 3 hours with 25 μ M of peptide in culture medium.

Western blotting. RABV- and non-infected cells were lysed 48 hours post-infection. Immunoblotting using rabbit polyclonal antibodies directed against the cytoplasmic tail of PTEN (138G6, ref 9559, Cell Signaling Technology) a rabbit monoclonal antibody directed against the cytoplasmic domain of RABV G protein (V9), or a mouse monoclonal antibody directed against alpha-tubulin (AB-1, ref CP06, Oncogene RP) was performed with cell lysates of NI cells or RABV-infected cells as previously described (63).

Immunocytochemistry. RABV-infected and NI SH-SY-5Y or SK-N-SH cells were double-stained 48 hours post-infection as previously described (35) using a mouse monoclonal antibody directed against the RABV G protein [mouse monoclonal antibody PVE-12, (64) or rabbit monoclonal antibody V9] and rabbit polyclonal antibodies directed against the C-terminus of PTEN (138G6, ref 9559, Cell Signaling Technology). Nuclei were stained with Hoechst 33342. Confocal microscopy images were acquired using a Zeiss LSM 510 META (version 3.2) on Axiovert 200M with a Plan Apochromat 63X and N.A. 1.4 objective, or with a Perkins Elmer Spinning disk. Confocal images were compiled using serial Z-stacks 0.3 μm apart and analyzed with Zeiss LSM Image browser.

Image analysis was performed with Neuro Image J. The amount of PTEN in the entire cell, in the nucleus, and in the cytoplasm were measured by quantification of PTEN antibody-associated pixels in the entire cell, in the nucleus as identified by Hoechst staining, or in the cytoplasm of RABV-infected cells as identified by anti-RABV G protein staining (number of cells per condition = 30 cells in at least 3 distinct fields). Results are presented as mean of pixels +/- SEM. Student's *t*-test was used for statistical analysis.

Supplementary Materials

- Table S1. Statistical analysis of MAST2-PDZ/PTEN13-Cter and MAST2-PDZ/Cyto13-att NMR structures.
- fig. S1. Intermolecular NOEs spectrum of MAST2-PDZ in complex with PTEN13-Cter.
- fig. S2. Cyto13-att removes the MAST2-PDZ/PTEN13-Cter complex in vitro.
- fig. S3. Differences in MAST2-PDZ amide proton chemical shifts between MAST2-PDZ/Cyto13-att and MAST2-PDZ/Cyto13-vir complexes.
- fig. S4. Intermolecular NOEs spectrum of MAST2-PDZ in complex with Cyto13-att.
- fig. S5. Constant dissociation of MAST2-PDZ dimer measured by analytical ultracentrifugation at various concentrations.
- fig. S6. PTEN localization in human neuronal cells after intracellular delivery of a FITC conjugated TAT PTEN13-Cter.

References

1. A. Ventruti, T. M. Kazdoba, S. Niu, G. D'Arcangelo, Reelin deficiency causes specific defects in the molecular composition of the synapses in the adult brain. *Neuroscience* **189**, 32-42 (2011).
2. B. D. Manning, L. C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274 (2007).
3. L. M. Chow, S. J. Baker, PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett* **241**, 184-196 (2006).
4. I. Sansal, W. R. Sellers, The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* **22**, 2954-2963 (2004).
5. L. Li, F. Liu, R. A. Salmonsens, T. K. Turner, N. S. Litofsky, A. Di Cristofano, P. P. Pandolfi, S. N. Jones, L. D. Recht, A. H. Ross, PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation. *Mol Cell Neurosci* **20**, 21-29 (2002).
6. M. Groszer, R. Erickson, D. D. Scripture-Adams, R. Lesche, A. Trumpp, J. A. Zack, H. I. Kornblum, X. Liu, H. Wu, Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* **294**, 2186-2189 (2001).
7. C. Perandones, R. V. Costanzo, V. Kowaljow, O. H. Pivetta, H. Carminatti, M. Radrizzani, Correlation between synaptogenesis and the PTEN phosphatase expression in dendrites during postnatal brain development. *Brain Res Mol Brain Res* **128**, 8-19 (2004).
8. K. K. Park, K. Liu, Y. Hu, P. D. Smith, C. Wang, B. Cai, B. Xu, L. Connolly, I. Kramvis, M. Sahin, Z. He, Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* **322**, 963-966 (2008).
9. L. Jia, S. Ji, J. C. Maillet, X. Zhang, PTEN suppression promotes neurite development exclusively in differentiating PC12 cells via PI3-kinase and MAP kinase signaling. *J Cell Biochem* **111**, 1390-1400 (2010).
10. J. Drinjakovic, H. Jung, D. S. Campbell, L. Strohlic, A. Dwivedy, C. E. Holt, E3 ligase Nedd4 promotes axon branching by downregulating PTEN. *Neuron* **65**, 341-357 (2010).

11. M. Higuchi, N. Masuyama, Y. Fukui, A. Suzuki, Y. Gotoh, Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells. *Curr Biol* **11**, 1958-1962 (2001).
12. F. Vazquez, P. Devreotes, Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. *Cell Cycle* **5**, 1523-1527 (2006).
13. M. S. Choy, B. H. Bay, H. C. Cheng, N. S. Cheung, PTEN is recruited to specific microdomains of the plasma membrane during lactacystin-induced neuronal apoptosis. *Neurosci Lett* **405**, 120-125 (2006).
14. S. M. Planchon, K. A. Waite, C. Eng, The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci* **121**, 249-253 (2008).
15. A. Gil, A. Andres-Pons, E. Fernandez, M. Valiente, J. Torres, J. Cervera, R. Pulido, Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: Involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Mol Biol Cell* **17**, 4002-4013 (2006).
16. L. Salmena, A. Carracedo, P. P. Pandolfi, Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* **133**, 403-414 (2008).
17. J. Howitt, J. Lackovic, L. H. Low, A. Naguib, A. Macintyre, C. P. Goh, J. K. Callaway, V. Hammond, T. Thomas, M. Dixon, U. Putz, J. Silke, P. Bartlett, B. Yang, S. Kumar, L. C. Trotman, S. S. Tan, Ndfip1 regulates nuclear Pten import in vivo to promote neuronal survival following cerebral ischemia. *J Cell Biol* **196**, 29-36 (2012).
18. L. C. Trotman, X. Wang, A. Alimonti, Z. Chen, J. Teruya-Feldstein, H. Yang, N. P. Pavletich, B. S. Carver, C. Cordon-Cardo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. G. Chi, H. J. Kim, T. Misteli, X. Jiang, P. P. Pandolfi, Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* **128**, 141-156 (2007).
19. C. J. Chang, D. J. Mulholland, B. Valamehr, S. Mosessian, W. R. Sellers, H. Wu, PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. *Mol Cell Biol* **28**, 3281-3289 (2008).
20. M. S. Song, A. Carracedo, L. Salmena, S. J. Song, A. Egia, M. Malumbres, P. P. Pandolfi, Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* **144**, 187-199.
21. A. Andres-Pons, A. Gil, M. D. Oliver, N. S. Sotelo, R. Pulido, Cytoplasmic p27Kip1 counteracts the pro-apoptotic function of the open conformation of PTEN by retention and destabilization of PTEN outside of the nucleus. *Cell Signal* **24**, 577-587 (2012).
22. N. R. Leslie, I. H. Batty, H. Maccario, L. Davidson, C. P. Downes, Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene* **27**, 5464-5476 (2008).
23. T. Tolkacheva, M. Boddapati, A. Sanfiz, K. Tsuchida, A. C. Kimmelman, A. M. Chan, Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383. *Cancer Res* **61**, 4985-4989 (2001).
24. Y. Takahashi, F. C. Morales, E. L. Kreimann, M. M. Georgescu, PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. *Embo J* **25**, 910-920 (2006).
25. W. von Stein, A. Ramrath, A. Grimm, M. Muller-Borg, A. Wodarz, Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* **132**, 1675-1686 (2005).
26. M. Valiente, A. Andres-Pons, B. Gomar, J. Torres, A. Gil, C. Tapparel, S. E. Antonarakis, R. Pulido, Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem* **280**, 28936-28943 (2005).

27. P. D. Walden, C. F. Millette, Increased activity associated with the MAST205 protein kinase complex during mammalian spermiogenesis. *Biol Reprod* **55**, 1039-1044 (1996).
28. P. D. Walden, N. J. Cowan, A novel 205-kilodalton testis-specific serine/threonine protein kinase associated with microtubules of the spermatid manchette. *Mol Cell Biol* **13**, 7625-7635 (1993).
29. T. Pawson, P. Nash, Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**, 445-452 (2003).
30. P. Garland, S. Quraisha, P. French, V. O'Connor, Expression of the MAST family of serine/threonine kinases. *Brain Res* **1195**, 12-19 (2008).
31. C. Lumeng, S. Phelps, G. E. Crawford, P. D. Walden, K. Barald, J. S. Chamberlain, Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* **2**, 611-617 (1999).
32. S. H. Loh, L. Francescut, P. Lingor, M. Bahr, P. Nicotera, Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen. *Cell Death Differ* **15**, 283-298 (2008).
33. K. J. Christie, C. A. Webber, J. A. Martinez, B. Singh, D. W. Zochodne, PTEN inhibition to facilitate intrinsic regenerative outgrowth of adult peripheral axons. *J Neurosci* **30**, 9306-9315 (2010).
34. E. Terrien, C. Simenel, C. Prehaud, H. Buc, M. Delepierre, M. Lafon, N. Wolff, 1H, 13C and 15N resonance assignments of the PDZ of microtubule-associated serine/threonine kinase 205 (MAST205) in complex with the C-terminal motif from the rabies virus glycoprotein. *Biomol NMR Assign* **3**, 45-48 (2009).
35. C. Prehaud, N. Wolff, E. Terrien, M. Lafage, F. Megret, N. Babault, F. Cordier, G. S. Tan, E. Maitrepierre, P. Menager, D. Choppy, S. Hoos, P. England, M. Delepierre, M. J. Schnell, H. Buc, M. Lafon, Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci Signal* **3**, ra5 (2010).
36. M. Lafon, Evasive strategies in rabies virus infection. *Adv Virus Res* **79**, 33-53 (2011).
37. N. E. Davey, G. Trave, T. J. Gibson, How viruses hijack cell regulation. *Trends Biochem Sci* **36**, 159-169 (2011).
38. R. T. Javier, A. P. Rice, Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J Virol* **85**, 11544-11556 (2011).
39. M. A. Stiffler, J. R. Chen, V. P. Grantcharova, Y. Lei, D. Fuchs, J. E. Allen, L. A. Zaslavskaja, G. MacBeath, PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science* **317**, 364-369 (2007).
40. R. Tonikian, Y. Zhang, S. L. Sazinsky, B. Currell, J. H. Yeh, B. Reva, H. A. Held, B. A. Appleton, M. Evangelista, Y. Wu, X. Xin, A. C. Chan, S. Seshagiri, L. A. Lasky, C. Sander, C. Boone, G. D. Bader, S. S. Sidhu, A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol* **6**, e239 (2008).
41. N. Babault, F. Cordier, M. Lafage, J. Cockburn, A. Haouz, C. Prehaud, F. A. Rey, M. Delepierre, H. Buc, M. Lafon, N. Wolff, Peptides Targeting the PDZ Domain of PTPN4 Are Efficient Inducers of Glioblastoma Cell Death. *Structure* **19**, 1518-1524 (2011).
42. W. Feng, H. Wu, L. N. Chan, M. Zhang, Par-3-mediated junctional localization of the lipid phosphatase PTEN is required for cell polarity establishment. *J Biol Chem* **283**, 23440-23449 (2008).
43. B. H. Chang, T. S. Gujral, E. S. Karp, R. Bukhalid, V. P. Grantcharova, G. Macbeath, A Systematic Family-wide Investigation Reveals that approximately 30% of

- Mammalian PDZ Domains Engage in PDZ-PDZ Interactions. *Chem Biol* **18**, 1143-1152 (2011).
44. R. Yano, C. C. Yap, Y. Yamazaki, Y. Muto, H. Kishida, D. Okada, T. Hashikawa, Sast124, a novel splice variant of syntrophin-associated serine/threonine kinase (SAST), is specifically localized in the restricted brain regions. *Neuroscience* **117**, 373-381 (2003).
 45. J. Lee, M. Natarajan, V. C. Nashine, M. Socolich, T. Vo, W. P. Russ, S. J. Benkovic, R. Ranganathan, Surface sites for engineering allosteric control in proteins. *Science* **322**, 438-442 (2008).
 46. O. Gimm, A. Perren, L. P. Weng, D. J. Marsh, J. J. Yeh, U. Ziebold, E. Gil, R. Hinze, L. Delbridge, J. A. Lees, G. L. Mutter, B. G. Robinson, P. Komminoth, H. Dralle, C. Eng, Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* **156**, 1693-1700 (2000).
 47. M. S. Song, A. Carracedo, L. Salmena, S. J. Song, A. Egia, M. Malumbres, P. P. Pandolfi, Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* **144**, 187-199 (2011).
 48. F. Fouladkou, T. Landry, H. Kawabe, A. Neeb, C. Lu, N. Brose, V. Stambolic, D. Rotin, The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8585-8590 (2008).
 49. K. Ning, C. Drepper, C. F. Valori, M. Ahsan, M. Wyles, A. Higginbottom, T. Herrmann, P. Shaw, M. Azzouz, M. Sendtner, PTEN depletion rescues axonal growth defect and improves survival in SMN-deficient motor neurons. *Hum Mol Genet* **19**, 3159-3168 (2010).
 50. X. Wang, Y. Shi, J. Wang, G. Huang, X. Jiang, Crucial role of the C-terminus of PTEN in antagonizing NEDD4-1-mediated PTEN ubiquitination and degradation. *Biochem J* **414**, 221-229 (2008).
 51. F. Okahara, H. Ikawa, Y. Kanaho, T. Maehama, Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. *J Biol Chem* **279**, 45300-45303 (2004).
 52. J. Torres, R. Pulido, The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* **276**, 993-998 (2001).
 53. F. Vazquez, S. Ramaswamy, N. Nakamura, W. R. Sellers, Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* **20**, 5010-5018 (2000).
 54. H. Maccario, N. M. Perera, L. Davidson, C. P. Downes, N. R. Leslie, PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *Biochem J* **405**, 439-444 (2007).
 55. W. Rieping, M. Habeck, B. Bardiaux, A. Bernard, T. E. Malliavin, M. Nilges, ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* **23**, 381-382 (2007).
 56. A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **54**, 905-921 (1998).
 57. C. Dominguez, R. Boelens, A. M. Bonvin, HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* **125**, 1731-1737 (2003).

58. R. A. Laskowski, D. S. Moss, J. M. Thornton, Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol* **231**, 1049-1067 (1993).
59. R. W. Hooft, G. Vriend, C. Sander, E. E. Abola, Errors in protein structures. *Nature* **381**, 272 (1996).
60. P. H. Brown, P. Schuck, Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Biophys J* **90**, 4651-4661 (2006).
61. J. Vistica, J. Dam, A. Balbo, E. Yikilmaz, R. A. Mariuzza, T. A. Rouault, P. Schuck, Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition. *Anal Biochem* **326**, 234-256 (2004).
62. R. Zufferey, D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naldini, D. Trono, Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**, 871-875 (1997).
63. D. Choppy, J. Pothlichet, M. Lafage, F. Megret, L. Fiette, M. Si-Tahar, M. Lafon, Ambivalent role of the innate immune response in rabies virus pathogenesis. *J Virol* **85**, 6657-6668 (2011).
64. G. Libeau, M. Lafon, Production of monoclonal antibodies against the Pasteur (P.V.) strain of rabies virus: problems and results. *Dev Biol Stand* **57**, 213-218 (1984).

Acknowledgements: This work was supported by grants from the Institut Pasteur, Agence Nationale pour la Recherche and Institut Carnot Pasteur Maladies Infectieuses. E.T. is a recipient of fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Fondation pour la Recherche Médicale. We are grateful to P. Roux (Imagopole, Institut Pasteur), P. England, B. Raynal, S. Hoos, E. Frachon, and V. Bondet (Proteopole, Institut Pasteur) for their skillful expertise. **Author contributions:** E.T., A.C., M.L., Z.K., C.P., C.S., M.Lafon, and N.W. designed and performed the experiments. E.T., A.C., C.P., F.C., H.B., M.Lafon and N.W. analysed the data. E.T., M.D., H.B., M.Lafon and N.W. wrote the paper. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Accession numbers:** Atomic coordinates and NMR constraints have been deposited with the Protein Data Bank, accession number 2KQF and 2KYL.

Table 1. Peptide sequences and their affinities for MAST2-PDZ

Sequence alignment of the PDZ-BS C-termini of 8 peptides, and their apparent dissociation constants ($K_D(\text{app})$) for MAST2-PDZ measured by fluorimetry and isothermal titration microcalorimetry experiments. PTEN13-Cter, the final C-terminal 13 aa of PTEN; Cyto13-vir, the final C-terminal 13 aa of G protein from the CVS-NIV RABV strain; Cyto13-att, the final C-terminal 13 aa of G protein from the ERA-NIV RABV strain; Cyto13-att-W(-11)A, a mutant of Cyto13-att that contains a W(-11)A substitution; Cyto4-att, the PDZ-BS of Cyto13-att; Cyto13-IRL, the final C-terminal 13 aa of G protein from the CVS-B2c RABV strain; Cyto13-ARL, the final C-terminal 13 aa of G protein from the vampire bat RABV strain; Cyto9-Δ4, a truncated Cyto13-att that lacks the PDZ-BS. $K_D(\text{app})$ and K_d were measured by isothermal titration microcalorimetry at 30 μM of MAST2-PDZ and by fluorimetry at 2 μM of MAST2-PDZ, respectively. Thermodynamic parameters are presented with ΔH and $T\Delta S$ corresponding to enthalpy and entropy of the system, respectively. Numbers in red represent the position of the aa.

Table 2. Peptide addition favors the monomeric form of MAST2-PDZ

Distribution of sedimentation coefficients (S_{20W}) of MAST2-PDZ in complex with PTEN13-Cter, Cyto13-att, Cyto13-att-W(-11)A, and Cyto4-att obtained by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation experiments.

Figures

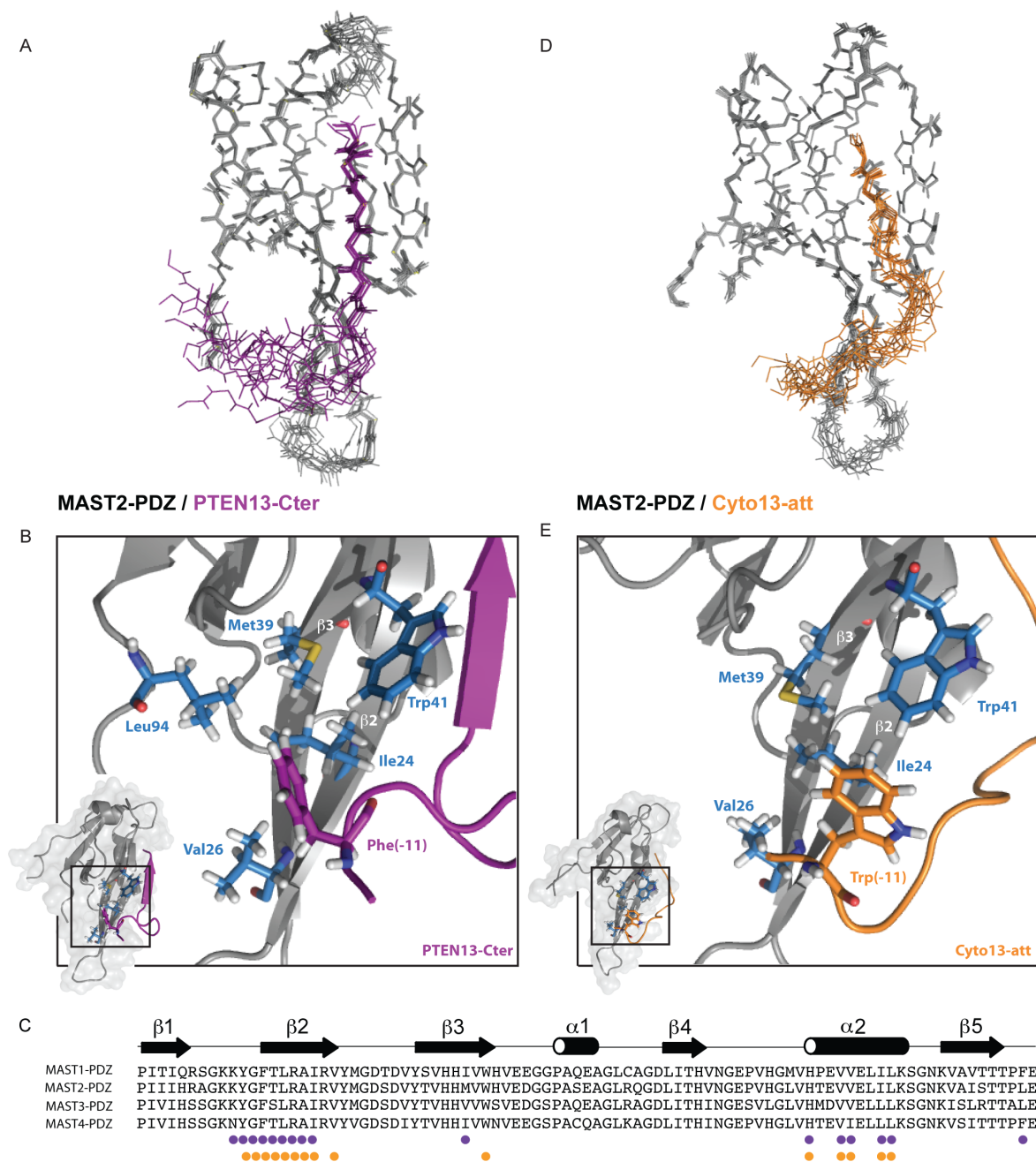


Fig. 1. NMR structures of MAST2-PDZ bound to Cyto13-att and PTEN13-Cter have similar and original surfaces of interaction. (A) Views of the backbone of ten structures of lowest energy of MAST2-PDZ (gray)/PTEN13-Cter (purple). (B) Close-up views depict the distal binding sites of MAST2-PDZ/PTEN13-Cter. (C) Sequence alignment of the MAST family PDZ motif. β -strands (black arrows), α -helices (black cylinders), and coil regions (black lines) are indicated above the sequences. Dots below the sequences indicate residues involved in PTEN13-Cter (purple) or Cyto13-att (orange) binding identified by intermolecular NMR experiments. (D) Views of the backbone of ten structures of lowest energy of MAST2-PDZ (gray)/Cyto13-att (orange). (E) Close-up views depict the distal binding sites of MAST2-PDZ/Cyto13-att. The insets illustrate the position of Phe⁽⁻¹¹⁾ and Trp⁽⁻¹¹⁾, and interacting residues of MAST2-PDZ are represented in red. Phe⁽⁻¹¹⁾ of PTEN13-Cter and Trp⁽⁻¹¹⁾ of Cyto13-att are shown in purple and orange, respectively. All of the structural models are generated with Pymol (Delano Scientific).

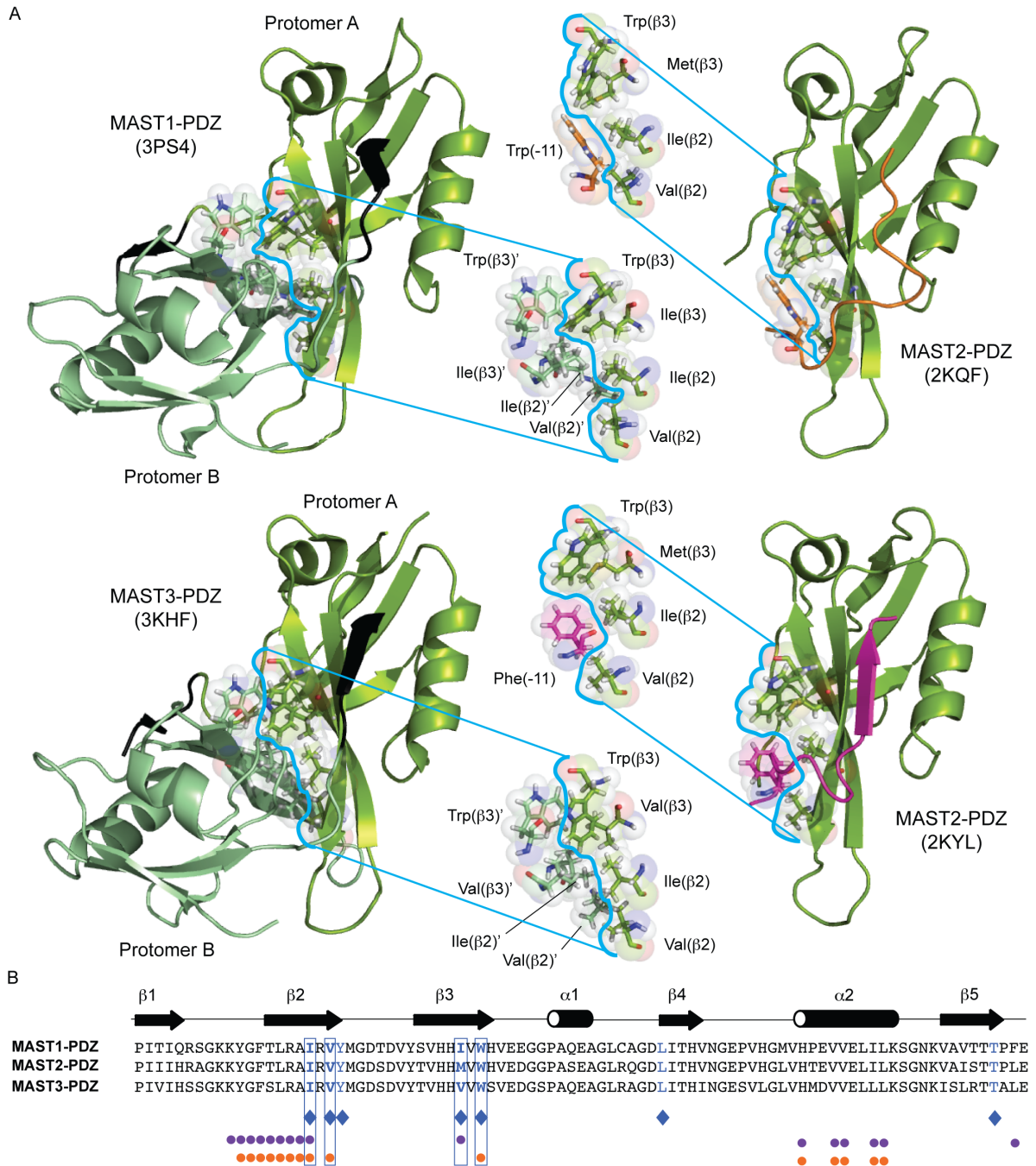


Fig. 2. The binding of PTEN13-Cter and Cyto13-att induce steric hindrance for MAST2-PDZ auto-association. (A) The structures of MAST1-PDZ (3PS4), MAST2-PDZ (2KQF, 2KYL), and MAST3-PDZ (3KHF). MAST isoform residues of $\beta 2/\beta 3$ strands involved in the dimerization or binding of position (-11) of PTEN13-Cter and Cyto13-att are shown. (B) Sequence alignment of the MAST1-, MAST2-, and MAST3-PDZ domains. β -strands (black arrows), α -helices (black cylinders), and coil regions (black lines) are indicated above the sequences. Dots below the sequences indicate residues involved in PTEN13-Cter (purple) or Cyto13-att (orange) binding identified by intermolecular NMR experiments. Blue diamonds are amino acids of the crystal structures of MAST1-PDZ (3PS4) and MAST3-PDZ (3KHF) involved in auto-association.

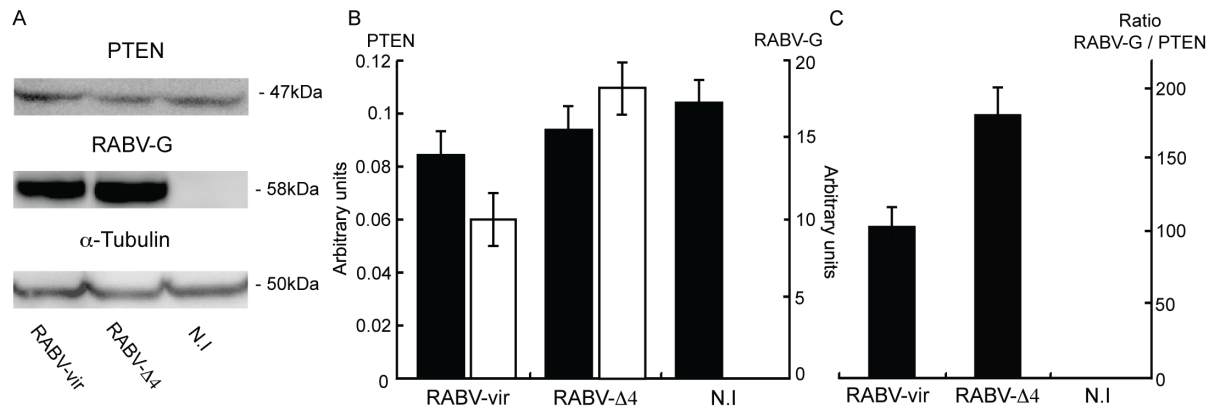


Fig. 3. RABV infection produces a large excess of G protein compared with PTEN, but does not modify PTEN amount compared to non infected condition. Human-derived neuroblastoma SH-SY-5Y cells were infected for 24 hours with recombinant RABV (RABV-vir), recombinant RABV-Δ4 (RABV-Δ4), or were non-infected (N.I). (A) Western blotting of PTEN and G protein 48 hours after RABV infection and NI cells by analysis. The α -Tubulin was used as a gel loading control. (B) Histograms depict quantification after spectrophotometer analysis for PTEN (black histogram) and RABV (white histogram). (C) The RABV-G/PTEN ratio was calculated from data obtained in B. Results are shown as arbitrary units. These results are representative of three independent experiments (SD are indicated).

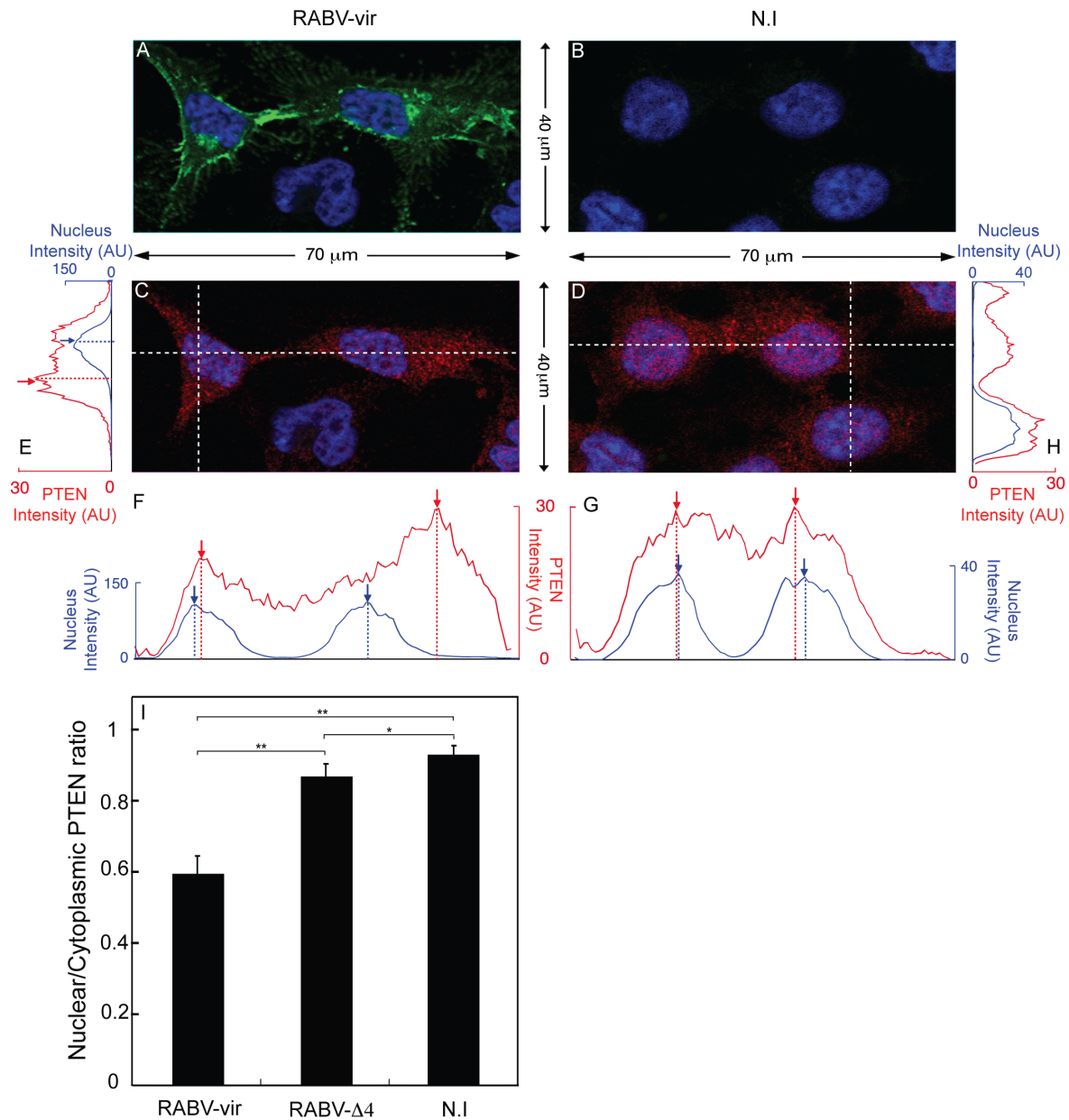


Fig. 4. RABV infection disturbs PTEN nuclear localization in a PDZ-BS-dependent manner. Upper panel (immunocytochemistry) Fluorescence confocal microscopy analysis of 48 hours recombinant RABV (RABV-vir)-infected and non-infected (N.I) human-derived SH-SY-5Y neuroblastoma cells. RABV-vir infected and N.I (A to D) cells were three colors-stained: G protein (green), PTEN (red) and nuclear (blue). In the upper panels (A and B), the red channel (PTEN) has been turned off, while in (C and D) the green channel (G protein) has been switched off. Fluorescence emission waves (red for PTEN and blue for nuclei) were recorded in C and D images on a 40 μm vertical axis (E and H) a 70 μm horizontal axis (F and G) to shown the presence or exclusion of PTEN from the nucleus. PTEN is excluded from the nucleus in RABV-vir-infected cells (E and F) because the peaks of blue and red waves are shifted, whereas PTEN remains in the nucleus of N.I cells (G and H), where the blue and red peaks coincide. Lower panel (histogram) (I) Calculation of the ratio of nuclear PTEN to cytoplasmic PTEN in SK-N-SH cells (48 hours post-infection) with Image J Neuro plugging. These experiments were reproduced at least three times. Student's *t*-test was used for statistical analysis. (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$).

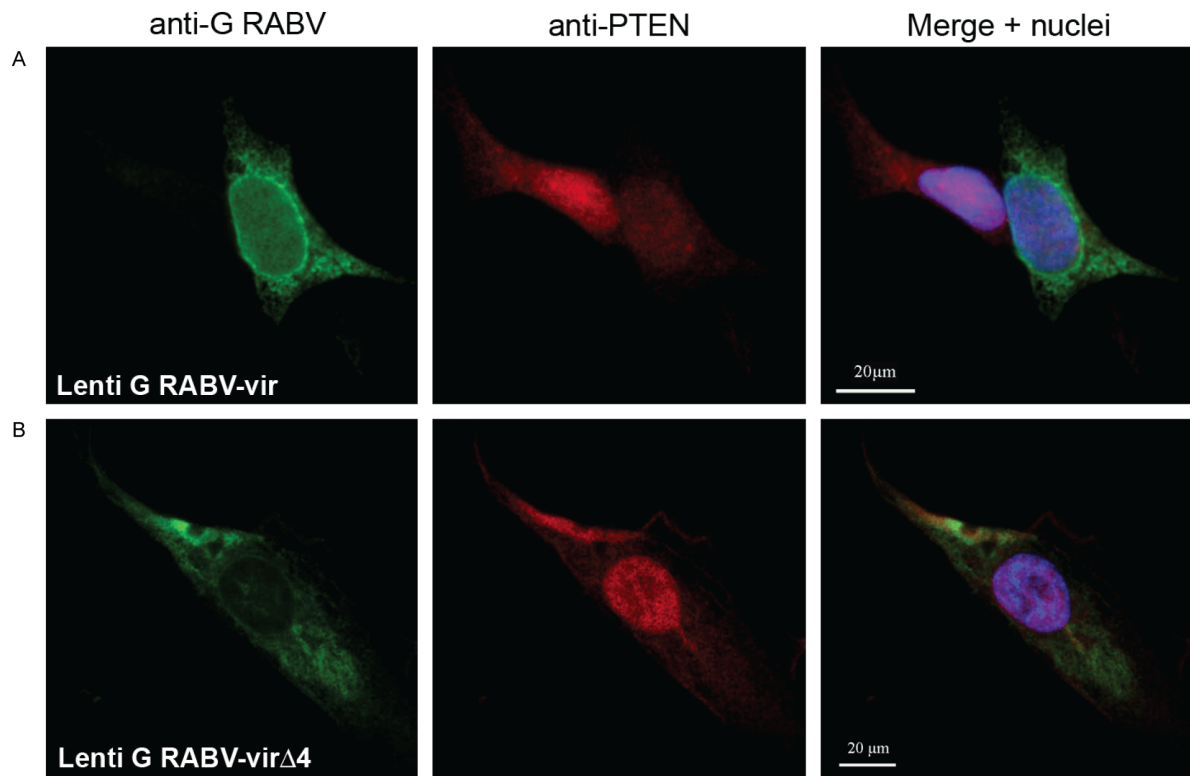


Fig. 5. Expression of G protein delivered by a lentivector excludes PTEN from the nucleus in a PDZ-BS dependent manner. (A) Human SK-N-SH neuronal cells were infected with a lentivirus expressing the G protein of RABV-Vir strain. Two cells are shown. Left panel: one cell expresses the G protein (green) and the neighbored cell does not. Middle panel: PTEN can be detected in both cells (red). Right panel: PTEN is excluded from the nucleus in the cell expressing G protein (nucleus is blue in merge image) whereas PTEN remains in the nucleus in the cell not expressing G protein (nucleus remains purple). (B) Human SK-NS-H neuronal cells were infected with a lentivirus expressing the G protein of RABV-Vir Δ 4 (green). PTEN is not excluded from the nucleus in the cell expressing G protein lacking the PDZ-BS (nucleus is purple in merge image). Bar is 20 μ m. These pictures are representative of three independent experiments.

SUPPLEMENTARY DATA

Interference of PTEN/MAST2 interaction by a viral protein leads to PTEN cellular relocalization.

Elouan Terrien^{1,2,3}, Alain Chaffotte^{1,2}, Mireille Lafage^{4,5}, Zakir Kahn^{4,5}, Christophe Prehaud^{4,5}, Florence Cordier^{1,2}, Catherine Simenel^{1,2}, Muriel Delepierre^{1,2}, Henri Buc⁶, Monique Lafon^{4,5*}, Nicolas Wolff^{1,2*}

1. Institut Pasteur, Unité de Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules, Département de Biologie Structurale et Chimie F-75015 Paris, France

2. CNRS, UMR3528 F-75015 Paris, France

3. Univ. Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

4. Institut Pasteur, Unité de Neuroimmunologie Virale, Département de Virologie F-75015 Paris, France

5. CNRS, URA3015 F-75015 Paris, France

6. Institut Pasteur F-75015 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed:

E-mail: monique.lafon@pasteur.fr tel : +33 (0)1 45 68 87 52; fax : +33 (0)1 40 61 33 12

E-mail: nicolas.wolff@pasteur.fr tel : +33 (0)1 45 68 88 72 ; fax : +33 (0)1 45 68 89 29

Table S1. Statistical analysis of MAST2-PDZ/PTEN13-Cter and MAST2-PDZ/Cyto13-att NMR structures¹⁾

	PTEN13-Cter	Cyto13-att
RMSDs from experimental distance constraints [Å]		
All unambiguous NOEs	(1317) 0,0524 +/- 0,0005	(1183) 0,0672 +/- 0,0030
Intermolecular NOEs	(78) 0,0377 +/- 0,0026	(77) 0,0296 +/- 0,0082
Protein intramolecular NOEs :		
All	(1239) 0,0532 +/- 0,0007	(1106) 0,0690 +/- 0,0031
Intraresidual	(570) 0,0515 +/- 0,0010	(480) 0,0769 +/- 0,0015
Sequential (i-j =1)	(244) 0,0643 +/- 0,0018	(264) 0,0596 +/- 0,0021
Short range (1< i-j <5)	(155) 0,0573 +/- 0,0023	(125) 0,0276 +/- 0,0047
long range (i-j >5)	(270) 0,0364 +/- 0,0021	(235) 0,0718 +/- 0,0101
Ambiguous Interaction Restraints (AIRs)	(27)	(27)
RMSDs from experimental dihedral constraints [°] ²⁾		
All ψ , ϕ	(135) 8,506 +/- 4.174	(118) 8,238 +/- 1,072
RMSDs From ³ JHNHA coupling constants [Hz]	–	1,152 +/- 0,048
Deviation from the idealized covalent geometry		
Bonds [Å]	0,00508 +/- 0,00008	0,00498 +/- 0,00008
Angles [°]	0,614 +/- 0,007	0,587 +/- 0,006
Impropers [°] ³⁾	0,535 +/- 0,005	0,569 +/- 0,014
Ecplx [kcal/mol]		
Total	(-) 3406.91 +/- 64.77	(-) 3338,31 +/- 48,97
Van der Waals	(-) 408,67 +/- 12.21	(-) 384,83 +/- 9,71
Einter [kcal/mol]		
Total	(-) 292.80 +/- 72.07	(-) 218,31 +/- 33,08
Van der Waals	(-) 67.40 +/- 6.35	(-) 70,14 +/- 5,85
BSA [Å ²]	1592.56 +/- 84.30	1600,39 +/- 51,73
Coordinate precision [Å] ⁴⁾		
Protein backbone ordered residues	0,3 +/- 0,15	0,53 +/- 0,15
Protein heavy atoms ordered residues	0,6 +/- 0,13	0,8 +/- 0,13
Protein backbone + Peptide Backbone (all)	0,9 +/- 0,2	0,89 +/- 0,2
Protein heavy atoms + Peptide heavy atoms (all)	1,3 +/- 0,18	1,3 +/- 0,18
% of non-Gly, non-Pro resi in Ramachandran regions (Protein+Peptide) ⁵⁾	Protein (all)	Protein (4-93)
Core	86,2	79,3
Allowed	12	20,1
Generous	0,4	0,5
Disallowed	1,4	0

¹⁾ The statistics were obtained from a subset of the 10 best energy water-refined structures following the protocol described in Materials and Methods. The number of the various constraints is given in parentheses.

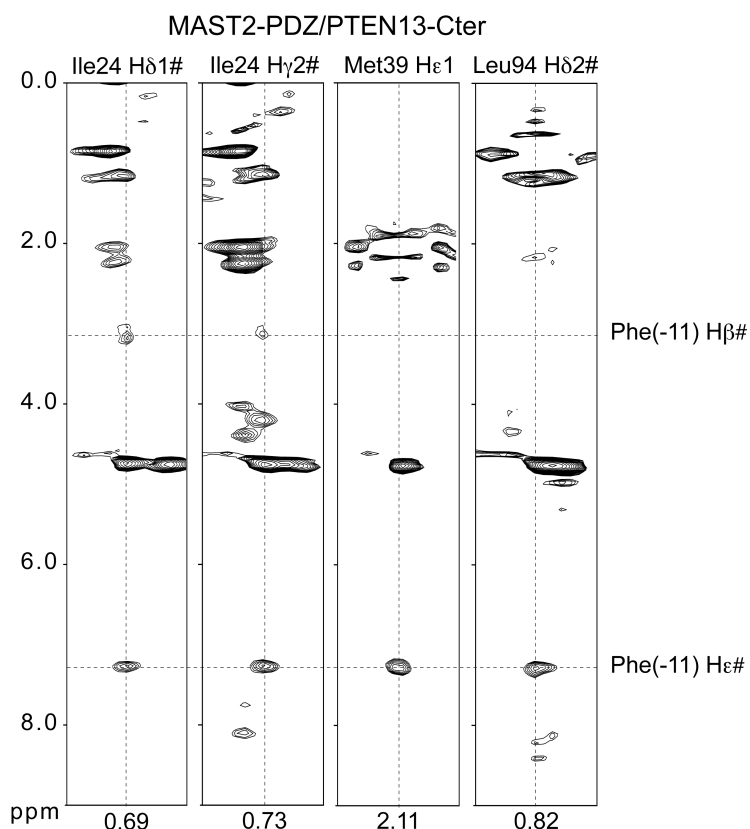
²⁾ Dihedral constraints were predicted from experimental data using Talos software.

³⁾ The improper torsion restraints serve to maintain planarity and chirality.

⁴⁾ The coordinate precision was defined as the ratio of the average RMSD to the mean coordinate structure.

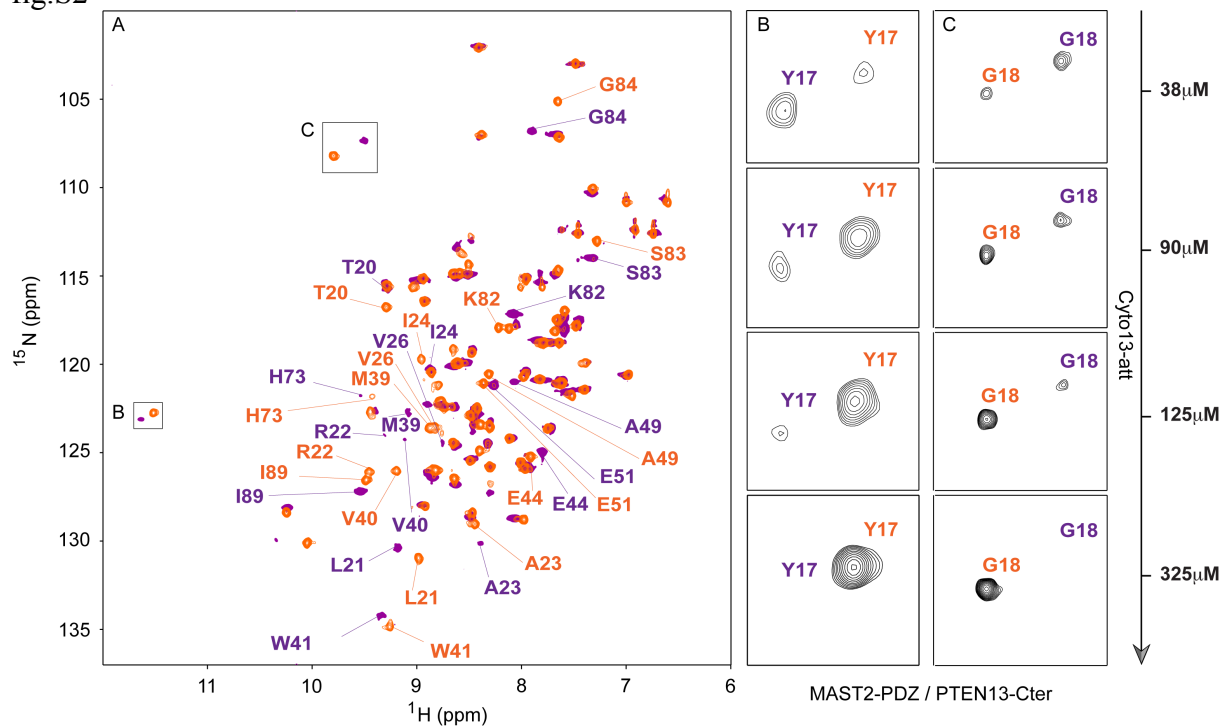
⁵⁾ These values were calculated using PROCHECK-NMR software and are reported for the non-flexible residues, MAST2-PDZ/PTEN13-Cter and MAST2-PDZ/Cyto13-att.

fig. S1



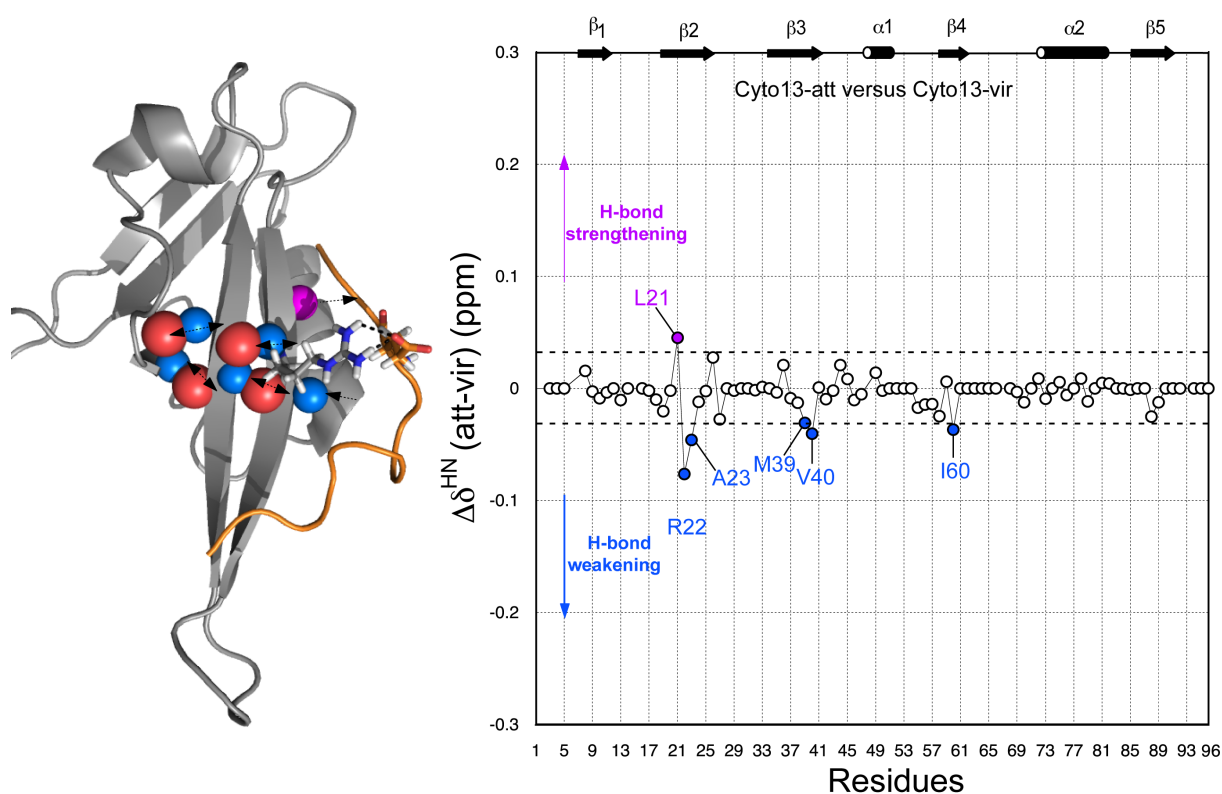
Intermolecular NOEs spectra of MAST2-PDZ in complex with PTEN13-Cter. Portion of intermolecular NOEs spectrum (mixing time 150 ms) of MAST2-PDZ residues (Ile²⁴, Met³⁹, and Ile⁹⁴) in complex with Phe⁽⁻¹¹⁾ of PTEN13-Cter at a protein/peptide molar ratio of 1:2 and 25 °C in Tris 50 mM / NaCl 150 mM, pH 7.5 buffer.

fig.S2



Cyto13-att removes the MAST2-PDZ/PTEN13-Cter complex in vitro. (A) ^1H - ^{15}N HSQC spectra of MAST2-PDZ (200 μM) incubated with PTEN13-Cter (375 μM) (in purple) and incubated both with PTEN13-Cter (375 μM) and Cyto13-att (325 μM) (in orange). MAST2-PDZ resonances of the spectrum, affected by Cyto13-att, are labeled with assignment information. (B and C) are representative correlation peaks of resonance (Tyr¹⁷ and Gly¹⁸) affected by successive addition of Cyto13-att (38 μM , 90 μM , 125 μM and 325 μM) in MAST2-PDZ/PTEN13-Cter solution.

fig. S3

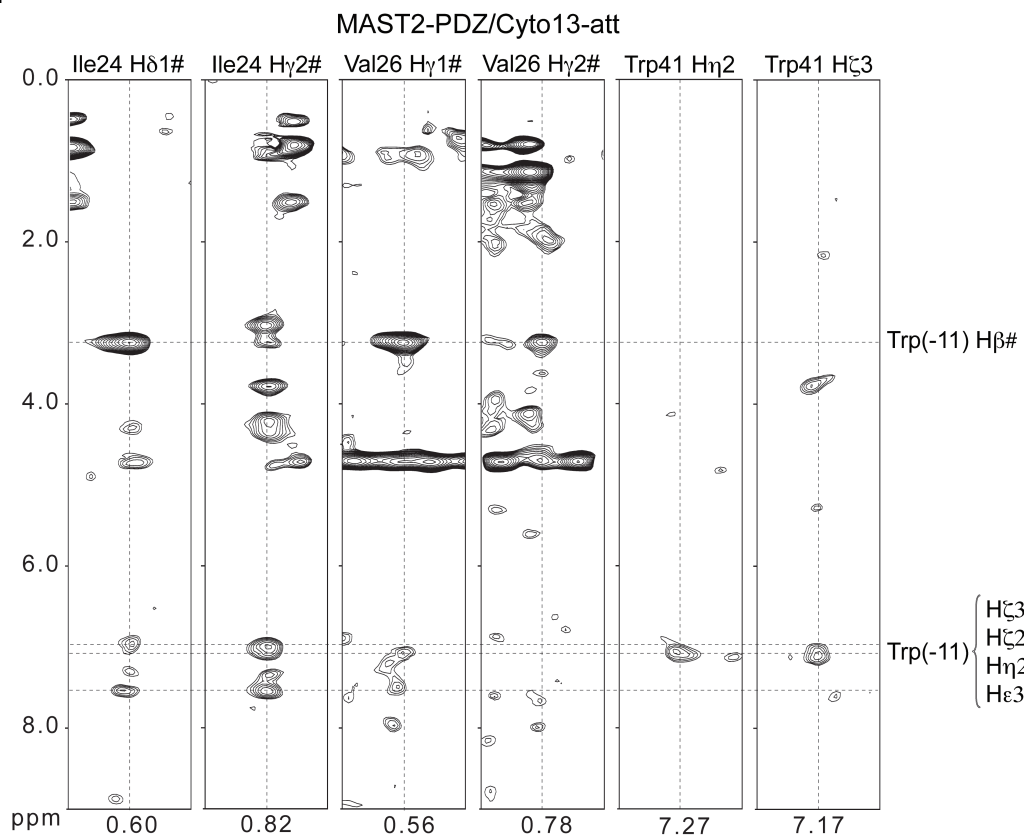


Differences in MAST2-PDZ amide proton chemical shifts between MAST2-PDZ/Cyto13-att and MAST2-PDZ/Cyto13-vir complexes, $\Delta\delta^{\text{HN}} = \delta^{\text{HN}}(\text{att}) - \delta^{\text{HN}}(\text{vir})$. The residues that were most upfield or downfield shifted in the MAST2-PDZ/Cyto13-att complex are labeled in blue or purple, and correspond to a weakening or strengthening of the corresponding H-bonds (threshold: 0.02 ppm). Upfield shifts of approximately 0.1 ppm correspond to H-bond lengthening of about 2-5 pm. Arg²², Met³⁹, Val⁴⁰, and Ile⁶⁰ are located in the β -sheet formed by strands β_2 , β_3 , β_4 , and Leu²¹ and Ala²³ are located on the face of the β_2 strand pointing towards the peptide. We examined the NMR chemical shifts of H-bonding amide protons (HN), to correlate their values with the strength of H-bonds (1). Surprisingly, this analysis reveals that the $\beta_2/\beta_3/\beta_4$ canonical H-bond network in close vicinity to the E/Q mutation is locally strengthened in the MAST2-PDZ/Cyto13-vir complex compared with the MAST2-PDZ/Cyto13-att complex. This fine-tuned structural rearrangement leads to a favorable energetic contribution, which partially balances the unfavorable replacement of the bifurcated and charged Arg²² guanidino group and O ϵ 2 atom of Glu⁽⁻³⁾ H-bonds by neutral group involving the isosteric residue Gln⁽⁻³⁾. Such a compensatory effect may explain the small variation in the binding free energies between the complex formation with Cyto13-vir *versus* Cyto13-att, $\Delta\Delta G_0 = RT \ln(\text{Kd}(\text{Cyto13-vir})/\text{Kd}(\text{Cyto13-att})) = 0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, corresponding to the 2-fold difference in affinity.

References

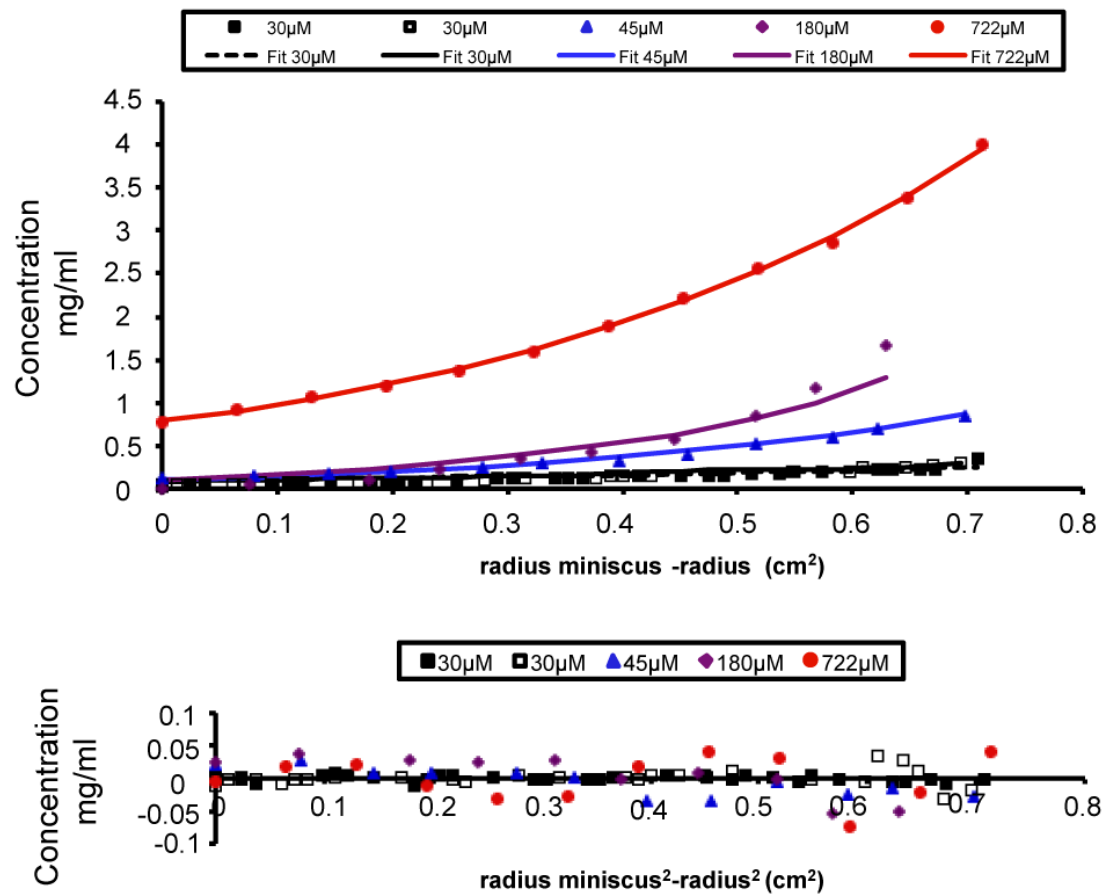
1. Wagner G, Pardi A, Wuthrich K, Hydrogen-Bond Length and H-1-NMR Chemical-Shifts in Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **105**:5948-5949 (1983)

fig. S4



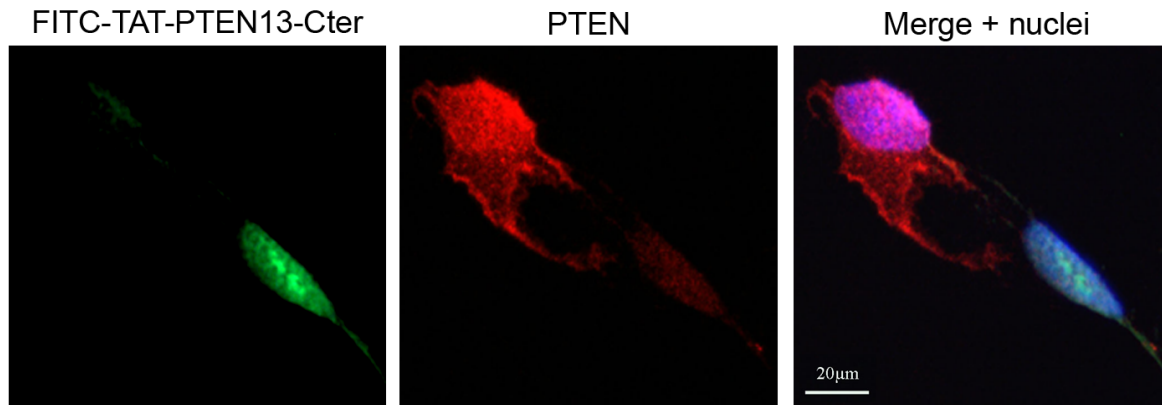
Intermolecular NOEs spectra of MAST2-PDZ in complex with Cyto13-att. Portion of intermolecular NOEs spectrum (mixing time 150 ms) of MAST2-PDZ residues (Ile²⁴, Val²⁶, Trp⁴¹) in complex with Trp⁽⁻¹¹⁾ of Cyto13-att at a protein/peptide molar ratio of 1:2, and 25 °C in Tris 50 mM / NaCl 150 mM, pH 7.5 buffer.

fig. S5



Dissociation constant of the MAST2-PDZ dimer measured by analytical ultracentrifugation at various protein concentrations. Experimental radial distributions of MAST2-PDZ during sedimentation equilibria performed at 30 μM (white and black squares), 45 μM (blue triangles), 180 μM (purple diamonds), and 722 μM (red circles); fitted curves (continuous lines) correspond to the monomer–dimer model.

fig. S6



PTEN expression in human neuronal cells after intracellular delivery of a FITC conjugated TAT PTEN13-Cter. Human SK-N-SH cells were treated for 3h with FITC conjugated TAT PTEN13-Cter. Two cells are shown. Left panel: one cell has been loaded with the peptide (green) the neighbored cell has not. Middle panel: PTEN (red) is expressed in both cells, especially in non-loaded cell. Right panel: PTEN is excluded from the nucleus in the cell loaded with PTEN peptide (nucleus is blue in merge image) whereas PTEN remains in the nucleus in the cell not expressing the PTEN peptide (nucleus is purple)

1.2. Commentaires

Cette publication s'inscrit dans la continuité du papier de Terrien *et al* (2009) (Annexe 1) et Préhaud *et al* (2010) (Annexe 2). Nous avons étudié dans un premier temps le domaine PDZ de MAST2 qui présentait un meilleur score en double hybride que MAST1. De plus, la fonction anti-survie de MAST2 a été clairement établie, contrairement à MAST1. En effet, l'extinction du gène de MAST2 induit la croissance des neurites, inhibe la rétractation et résiste au stress oxydatif (36). Enfin MAST2 interagit et phosphoryle PTEN (52). Le degré de phosphorylation de PTEN dépend de la fixation de MAST2-PDZ sur le PDZ-BS de PTEN (52). Cependant, nous ne connaissons pas les conséquences cellulaires lorsque MAST2-PDZ ne peut plus interagir avec PTEN. Dans cette publication, nous proposons un mécanisme pour le déclenchement de la survie d'un neurone infecté par le virus de la rage avec la glycoprotéine G qui cible *a priori* spécifiquement MAST2-PDZ.

Ce papier analyse depuis la cellule jusqu'aux détails à l'échelle atomique les interactions MAST2-PTEN. Volontairement, nous n'avons pas détaillé le mécanisme moléculaire de fixation exclusive des peptides avec le monomère MAST2-PDZ. Nous le ferons dans le chapitre 1.3. Ces résultats feront l'objet d'une publication plus spécialisée abordant la biophysique des domaines PDZ.

Un autre point du papier que je soulignerai ici, est la difficulté de transposer une observation *in vitro* à une observation *in cellulo*, a fortiori *in vivo*. Le phénotype que nous observons dans la cellule est dépendant de la fixation du PDZ-BS de la glycoprotéine G de RABV et nous observons une relocalisation de MAST2 avec la glycoprotéine G à la membrane (27). Les expériences de double hybride (dans la levure), sur une banque d'ADNc de cerveau humain, nous indiquent que la glycoprotéine G de RABV interagit avec MAST1 et MAST2. Sur cette base nous faisons l'hypothèse que la glycoprotéine G de RABV interagit préférentiellement avec ces kinases en écartant dans un premier temps d'autres partenaires potentiels *in cellulo*. C'est évidemment une des limites de la technique utilisée qui propose une liste non exhaustive de partenaires potentiels. Dans ce sens nous avons lancé un criblage à haut débit, pour compléter cette étude dans la levure. Nous avons utilisé une technique *in vitro* proposée par la société *Panomics* qui consiste à incuber le PDZ-BS biotinylé (ici : Cyto-G) avec des membranes de nitrocellulose sur lesquelles ont été greffés 123 domaines PDZ humains avec une révélation par ECL

(ElectroChimioLuminescence). Ces données sont cohérentes avec celles obtenues par double hybride. CytoG, issu de la souche virulente, interagit avec un faible nombre de partenaires. i) MAST2 interagit avec Cyto-G ; ii) trois interactions supplémentaires sont détectées (Shank1, Dig-D1, NHERF1-D1). Cyto-G possède ainsi une spécificité pour les kinases MAST1 et MAST2. Une collaboration avec Renaud Vincetelli a été engagée pour compléter ces données, en utilisant CytoG comme appât sur une banque complète de PDZ humain (260 PDZ).

Le troisième point que j'aborderai ici est le modèle de compétition entre PTEN et la glycoprotéine G pour MAST2. Nous avons construit notre argumentation sur les affinités apparentes *in vitro* des complexes avec MAST2-PDZ, les localisations et les concentrations relatives de PTEN et la glycoprotéine G *in cellulo*. Nous avons en effet utilisé des anticorps produits à façon qui ciblent spécifiquement la glycoprotéine G ou PTEN. Nous avons estimé par Western Blot, les quantités de ces deux protéines présentes dans les extraits cellulaires. Nous avons observé au moins 100 fois plus de glycoprotéine G que de PTEN *in cellulo*. Ces données ne sont cependant pas précises. D'autres expériences, telles que les ELISA, seront nécessaires pour affiner ce résultat.

Nos résultats démontrent par ailleurs que la glycoprotéine G module la localisation cellulaire de PTEN et nous supposons que cela se fasse par l'intermédiaire de MAST2, elle-même relocalisée par la protéine virale. Nous avons en effet montré que le PDZ-BS de la glycoprotéine G, qui module la localisation cellulaire de PTEN, est spécifique des isoformes MAST1 et MAST2. De nombreuses études ont montré que la localisation cellulaire de PTEN est corrélée avec la survie de la cellule. Cette survie des neurones est prérequis pour la dissémination du virus de la rage à travers le système nerveux. Des expériences supplémentaires sont programmées pour soutenir les hypothèses que nous avançons dans ce papier, notamment le rôle de la phosphorylation de PTEN par MAST2-PDZ que nous aborderons dans le chapitre 2.2.

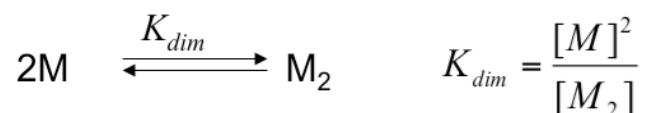
1.3. Résultats complémentaires/Perspectives : mécanisme moléculaire de MAST2-PDZ

Nous avons été confrontés dès le début de nos expériences avec MAST2-PDZ à la formation, au cours du temps, d'un précipité dans nos échantillons. Ce processus d'agrégation n'apparaissait plus dès lors que l'on rajoutait le partenaire de MAST2-PDZ dans la solution. La comparaison des expériences d'ultracentrifugation de MAST2-PDZ seul ou en complexe, avec son ligand, nous a permis de mettre en évidence que la fixation du ligand déplaçait une forme oligomérique instable, qui au cours du temps s'agrégeait, vers une forme de faible masse moléculaire, stable et soluble. En faisant une approximation sur le rayon de Stokes de la protéine, nous en avons déduit que MAST2-PDZ seul en solution était en équilibre monomère/dimère et que cet équilibre était déplacé vers une espèce monomérique lors de l'ajout de son partenaire (Cyto13-G ou PTEN13-Cter). Le temps de corrélation, calculé par RMN, (6,3 ns) de MAST2-PDZ complexé avec Cyto13-att est en accord avec les données d'ultracentrifugation (236).

Ces résultats préliminaires présentés ici sont une première étape pour décrire le mécanisme moléculaire de l'interaction de MAST2-PDZ avec ses partenaires. Le but de cette approche est d'appréhender les mécanismes potentiels de régulation de l'activité de MAST2 par ses partenaires.

1.3.1. Déduction des constantes « vraies » de dissociation des complexes MAST2-PDZ/peptides

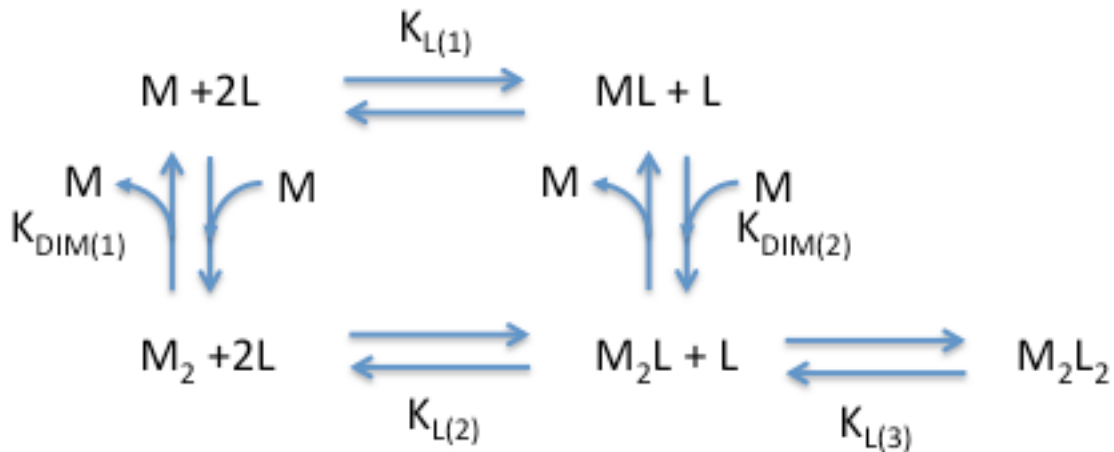
En solution, la constante de dissociation du dimère de MAST2-PDZ, mesurée par ultracentrifugation analytique à l'équilibre, est de 29 μ M (+/-3).



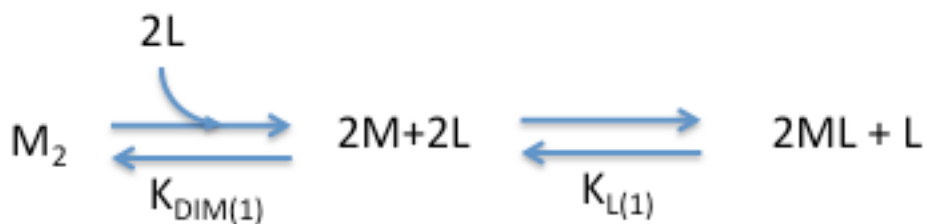
Nous avons, pour l'article Terrien *et al*, proposé que les peptides (quels qu'ils soient) se fixent préférentiellement sur le monomère de MAST2-PDZ. Nous nous sommes limités à ne rapporter que les concentrations de demi-saturation du peptide

sur le monomère de MAST2-PDZ à 2 μ M et 30 μ M de MAST2-PDZ, sans détailler le mécanisme d'association du peptide et de dissociation du dimère de MAST2-PDZ.

Lorsque l'on ajoute le ligand à une solution de MAST2-PDZ en équilibre monomère/dimère, et que l'on considère que le peptide se fixe sur un seul site du protomère de MAST2-PDZ, voici le schéma réactionnel qu'il est possible de présenter :



Cependant, selon le modèle décrit dans Terrien *et al* (2012), proposé à partir de nos données expérimentales (236), le ligand se fixe exclusivement sur le monomère de MAST2-PDZ, simplifiant donc le modèle de fixation du ligand comme suit :



En effet, d'après nos expériences de sédimentation (Table 2, Terrien *et al* 2012), l'ajout de ligands déplace totalement l'équilibre multimérique vers le monomère. Les expériences ont été faites en saturant les sites de MAST2-PDZ avec un très large excès de ligand.

Ainsi, pour une approche préliminaire, un modèle simplifié est proposé en développant un formalisme qui permet de simuler la fixation exclusive du ligand sur le monomère de MAST2-PDZ²⁰. Ce modèle se fonde sur les hypothèses suivantes :

- Le site de fixation du peptide sur MAST2-PDZ sous forme dimérique est non accessible ;
- Et/ou un changement conformationnel locale module l'affinité du peptide pour MAST2-PDZ selon son degré d'oligomérisation ;
- Et/ou il existe une compétition entre le site de dimérisation du domaine PDZ de MAST2 et le site de fixation du ligand.

De ce fait, pour une fixation exclusive du ligand L sur le monomère, à toute concentration de [L] libre, la constante locale de dissociation est égale à :

$$(1) K_{(L)} = K_0/x$$

« x » représente la fraction de protéine ($[M]/[M_T]$) présente sous la forme de monomère à une concentration [L] de ligand.

En absence de ligand, la constante d'association de MAST2-PDZ s'écrit :

$$(2) a = \frac{[M_2]}{[M]^2}$$

$$(3) [M_T] = [M] + 2[M_2] \rightleftharpoons [M_2] = \frac{[M_T] - [M]}{2}$$

$$(3) \text{ dans (2) } a = \frac{[M_T] - [M]}{2 \cdot [M]^2}$$

$$(4) a = \frac{1 - [M]/[M_T]}{2 \cdot [M_T] \cdot [M]^2/[M_T]^2} \rightleftharpoons a \cdot [M_T] = \frac{1 - x}{2 \cdot x^2}$$

²⁰ Il est tout de même important de moduler nos propos, en ajoutant que la fixation du ligand sur le monomère et sur le dimère n'est pas incompatible avec nos données d'ultracentrifugation. En effet, dans le cas particulier où le ligand se fixe sur le dimère mais avec une affinité inférieure à celle du monomère, la saturation de site de MAST2-PDZ par le ligand favorise, de fait, la formation du complexe monomérique au détriment du dimère. Cependant, la solution mathématique reste extrêmement compliquée. Pour une première approche, nous avons sélectionné un modèle de fixation exclusive du ligand sur le monomère.

La concentration de MAST2-PDZ totale $[M_T]$ est donc diminuée par la disparition des espèces liées qui sont uniquement des monomères :

$$(5) [M_T] = [M_T] \cdot (1-\bar{Y})$$

Y représente la fraction de monomère lié ($[ML]/[M_T]$). Ceci est la seule cause du déplacement de l'équilibre vers le monomère et donc du changement de la constante $K_{(L)}$ lors de la fixation (elle tend vers K_0 car $x \rightarrow 1$ avec la disparition progressive des espèces PDZ non liantes, à partir d'une valeur locale supérieure K_0/x . À toute concentration initiale de domaine PDZ, on peut calculer la fraction de monomère libre restant (x), pour une valeur de Y donnée par l'équation :

$$2a. [M_T] = \frac{1-x}{x^2}$$

$$2a. [M_T] = 2a. [M_T] \cdot (1-\bar{Y})$$

On pose : $\lambda_{(L)} = 2a. [M_T] \cdot (1-\bar{Y}) = \frac{1-x}{x^2}$

D'où : $\lambda_{(L)} \cdot x^2 + x - 1 = 0$

$$(6) \quad x = \frac{-1 + \sqrt{1 + 4\lambda_{(L)}}}{2\lambda_{(L)}}$$

Avec (1) $K_{(L)} = K_0/x \iff x = K_{(L)}/K_0$

La perte d'affinité pour L est donnée par « x », lui-même déterminé à toute concentration initiale de MAST2-PDZ par la valeur 1-Y.

Dans le modèle de fixation exclusive sur le monomère, le gain progressif d'affinité lors du titrage ne dépend pas de l'affinité intrinsèque K_0 mais du rapport L/K_0 (voir équation 7). La fixation exclusive du ligand sur le monomère déplace l'équilibre multimérique vers le monomère qui, de ce fait, augmente le nombre de site disponible de MAST2-PDZ. La forme des courbes de saturation est donc la même pour un ligand de faible ou de forte affinité pour MAST2-PDZ une fois la concentration initiale $[M_T]$ fixée.

$$\begin{aligned}
K_{(L)} &= \frac{[M].[L]}{[ML]} \\
K_{(L)} &= \frac{[M_0] - [ML].[L]}{[ML]} \\
&\quad \div [M_0] \\
K_{(L)} &= \frac{1 - [ML]/[M_0] \cdot [L]}{[ML]/[M_0]} \\
K_{(L)} &= \frac{1 - \bar{Y}}{\bar{Y}} \cdot [L] \quad \longleftrightarrow \quad \frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \frac{[L]}{K_{(L)}} \quad \div x \\
(1) \quad K_{(L)} &= K_0/x \quad (7) \quad \frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} \frac{1}{x} = \frac{[L]}{x \cdot K_{(L)}} = \frac{[L]}{K_0}
\end{aligned}$$

Ainsi, en partant de la valeur connue de « a » (constante d'équilibre d'association du dimère estimée en ultracentrifugation à l'équilibre) et de $[M_T]$, il est possible de faire une simulation en faisant varier les valeurs de Y. Pour chacune de ces valeurs, $\lambda_{(L)}$ est fixée. On en déduit « x » et de ce fait la constante locale d'affinité relative à K_0 : $K_{(L)}/K_0$.

Connaissant Y et $K_{(L)}/K_0$, on en déduit la valeur de L/K_0 en ce point. Il est alors possible de simuler la courbe théorique attendue en reportant Y ou « x » en fonction de L/K_0 et de comparer cette courbe qui reflète le système de fixation exclusive sur le monomère à partir de nos valeurs expérimentales.

À $2\mu\text{M}$ de MAST2-PDZ (soit $\approx 90\%$ de monomère), nous considérons que la constante de dissociation apparente mesurée est une bonne approximation de la constante de dissociation « vraie » K_0 du peptide sur le monomère de MAST2-PDZ. L'équation de Hill qui reflète, dans notre cas, les propriétés de fixation du peptide sur la protéine, est donc réduite à une fixation simple où le n_H est proche de 1. La figure 59 montre une simulation avec le pourcentage de site saturé de MAST2-PDZ pour un modèle de fixation simple du ligand sur un seul site en vert et le modèle de fixation exclusive sur le monomère en bleu en fonction de la concentration de ligand. La courbe rouge représente le pourcentage de monomère. Les deux courbes (verte

et bleue) se superposent quasiment parfaitement. La valeur de l'indice de Hill n_H est égale à 1,025 qui indique une très faible coopérativité.

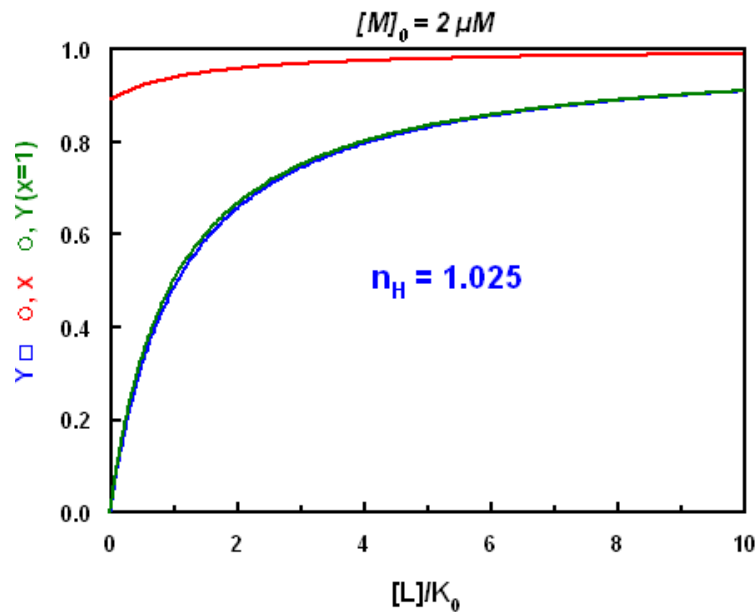


Figure 59 : Comparaison des simulations d'un modèle de fixation exclusive sur le monomère de MAST2-PDZ en équilibre monomère/dimère à $2\mu\text{M}$ avec un modèle de fixation simple. (En rouge) % de monomère non lié en fonction de la concentration totale de ligand. (En bleu) % de M saturé avec le ligand L en fonction de la concentration totale de ligand L pour un modèle en équilibre monomère/dimère avec fixation exclusive sur le monomère. (En vert) % de M saturé avec le ligand en fonction de la concentration totale de ligand L pour un modèle avec fixation simple du ligand sur le monomère.

À $30\mu\text{M}$ de MAST2-PDZ, il y a environ 50% de monomères. Si nous prenons en compte notre modèle, la fixation du ligand sur le monomère induit un déplacement de l'équilibre multimérique vers le monomère qui génère un nombre de sites disponibles légèrement supérieur à 1 et qui, de ce fait, se définit par un effet coopératif. Comme précédemment, nous avons comparé les deux simulations (fixation simple *versus* modèle de fixation exclusive sur un monomère en équilibre monomère/dimère). Nous constatons que la courbe bleue est décalée vers la droite qui est la conséquence d'un effet coopératif avec n_H égal à 1,133.

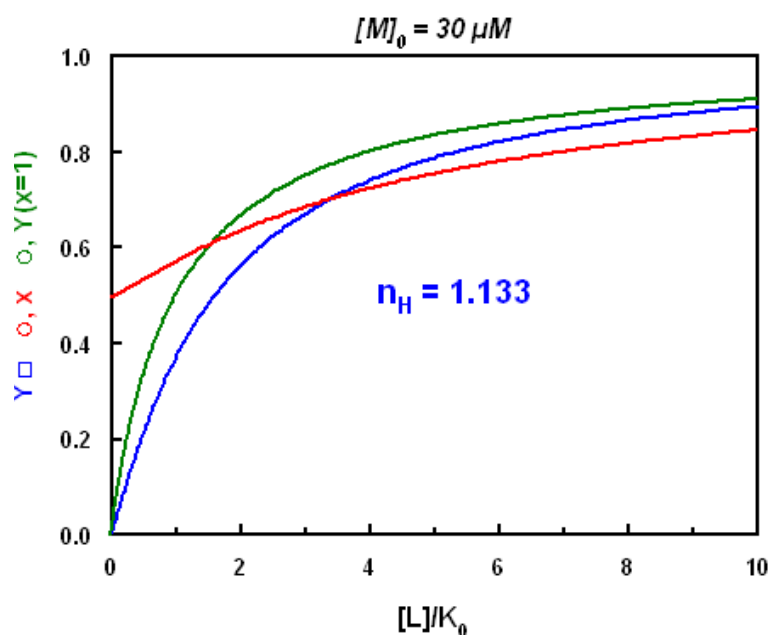


Figure 60 : Comparaison des simulations d'un modèle de fixation exclusive sur le monomère de MAST2-PDZ en équilibre monomère/dimère à $30\mu\text{M}$ avec un modèle de fixation simple. (En rouge) % de monomère non lié en fonction de la concentration totale de ligand. (En bleu) % de M saturé avec le ligand en fonction de la concentration totale de ligand L pour un modèle en équilibre monomère/dimère avec fixation exclusive sur le monomère. (En vert) % de M saturé avec le ligand en fonction de la concentration totale de ligand L pour un modèle avec fixation simple du ligand sur le monomère.

Si l'on compare sur la figure 60 la simulation et nos données expérimentales décrites dans le tableau 2, ces dernières sont parfaitement en accord avec une fixation exclusive du ligand sur le monomère de MAST2-PDZ. Le nombre de Hill est en effet, pour tous les complexes proches de 1, parfaitement représentatif d'une fixation simple sur le monomère lorsque $[\text{MAST2-PDZ}] = 2\mu\text{M}$ et nous observons bien une faible coopérativité lorsque $[\text{MAST2-PDZ}] = 30\mu\text{M}$. Toutes ces expériences et calculs sont détaillés dans la partie « Matériels et méthodes ». À partir de l'ajustement des données expérimentales, le logiciel BIOEQS, que nous avons utilisé, génère un fichier avec la quantité de l'espèce M2 (dimère nu), de l'espèce ML (saturation du monomère), de M (monomère nu), et du ligand libre en fonction de la concentration totale de ligand [L].

Tableau 2 : Constantes de dissociation et indices de coopérativité des complexes MAST2-PDZ calculés à partir du modèle de fixation exclusive du ligand sur le monomère.

FLUORIMETRY EXPERIMENTS			
Peptide	MAST2-PDZ	Kd₍₁₎ (μM)	Kd₍₂₎ (μM)*
Cyto13-att	2 μM	1.8	6.04
	30 μM	1.13	47
	Global fitting	0.78	63.7
	Cooperativity 2 μM	n _H = 1.04	
	Cooperativity 30 μM	n _H = 1.158	
Cyto4-att	2 μM	6.8	
	30 μM	8.9	
	Global fitting	7.9	
	Cooperativity 2 μM	n _H = 1.022	
	Cooperativity 30 μM	n _H = 1.132	
Cyto13-att-W(-11)A	2 μM	1.59	
	30 μM	3.26	
	Global fitting	2.3	
	Cooperativity 2 μM	n _H = 1.04	
	Cooperativity 30 μM	n _H = 1.128	
Cyto13-vir	2 μM	1,46	
	30 μM	ND	
	Global fitting	ND	
	Cooperativity 2 μM	ND	
	Cooperativity 30 μM	ND	
PTEN13-Cter	2 μM	1.95	
	30 μM	0.85	
	Global fitting	1.7	
	Cooperativity 2 μM	n _H = 1.022	
	Cooperativity 30 μM	n _H = 1.126	

* Nous avons introduit pour le peptide cyto13-att un second site de fixation, non équivalent et indépendant du premier site de fixation, de très faible affinité nécessaire pour être en accord avec nos données expérimentales.

En prenant l'exemple de MAST2-PDZ en complexe avec le ligand PTEN13-Cter (représentatif des autres expériences), la figure 61 illustre le phénomène de coopérativité de MAST2-PDZ à 30 μ M (courbe bleue), par rapport à MAST2-PDZ à 2 μ M (courbe verte) avec l'ajout de ligand.

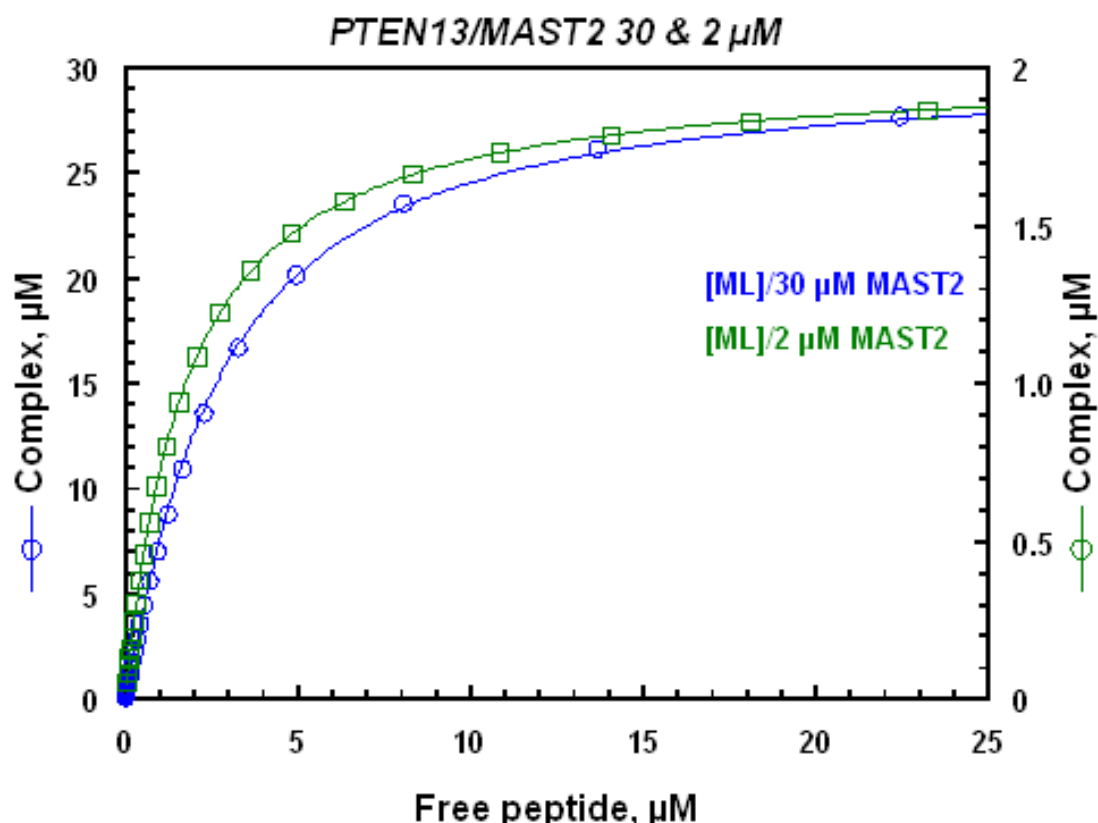


Figure 61 : Simulation de la concentration en sites MAST2-PDZ à 2 et 30 μ M saturé avec le ligand PTEN13-Cter en fonction de la concentration de ligand libre PTEN13-Cter.

Nos données sont donc compatibles avec la fixation exclusive du ligand sur le monomère. Tous les complexes, à 30 μ M de MAST2-PDZ, possèdent un faible indice de coopérativité équivalent à la valeur simulée ($n_H = 1,13$) d'après le modèle de fixation exclusive.

Nous avons décrit un mécanisme d'interaction général avec MAST2-PDZ pour tous les peptides. Or nous avons vu que le peptide possède 2 sites d'ancrages, l'un en N- et l'autre en C-terminal. L'ancrage N-terminal représente l'originalité d'interaction du ligand avec un domaine PDZ. Il est conservé dans le ligand endogène et les ligands viraux qui interagissent avec les brins $\beta_2\beta_3$ de MAST2-PDZ. Pour affiner notre analyse et proposer un mécanisme de fixation du peptide, des

expériences de cinétique de variation de fluorescence, à l'aide d'un Stopped-flow, sont envisagées pour suivre la formation des complexes au cours du temps.

La séquence N-terminale pourrait ainsi avoir une double fonction, d'une part elle module l'affinité/spécificité pour le domaine PDZ, d'autre part elle occupe le site probable de dimérisation de MAST2-PDZ empêchant ainsi la dimérisation du domaine PDZ de MAST2.

1.3.2. Discussion sur le mécanisme moléculaire qui induit la dissociation du dimère de MAST2-PDZ

Les structures des deux isoformes MAST1-PDZ et MAST3-PDZ en dimère et la structure des complexes de MAST2-PDZ partagent des caractéristiques structurales en faveur du modèle que nous venons de décrire. Nous postulons que la fixation du ligand induit une gêne stérique empêchant la dimérisation de MAST2-PDZ. En effet, les résidus impliqués dans la dimérisation de MAST1,3-PDZ sont majoritairement conservés chez MAST2-PDZ (Cf. figure 2, article Terrien *et al*, 2012, p140). Cependant, lorsque nous ajoutons le tétrapeptide (Cyto4-att), qui ne contient que l'ancrage C-terminal, avec MAST2-PDZ (donc absence de gêne stérique avec le site de dimérisation), nos données de centrifugation concordent avec le modèle de fixation préférentiel sur le monomère : l'équilibre monomère/dimère est également déplacé vers le monomère avec l'ajout de Cyto4-att. Cependant, nous ne pouvons écarter l'hypothèse d'une meilleure affinité de Cyto4-att pour le monomère qui, de ce fait, nous amènerait à la même conclusion. Nous ne pouvons pas exclure non plus un changement de conformation locale qui pourrait également diminuer drastiquement la constante d'association du dimère de MAST2-PDZ. En effet, d'après la structure et les variations des déplacements chimiques des complexes de MAST2-PDZ observés par RMN, nous constatons que l'interaction de l'Arg22 avec le résidu en position -3 du peptide induit un réarrangement structural local sur les brins β 3 et β 4 qui pourrait être une explication supplémentaire sur la disparition de l'espèce dimérique en solution lorsque l'on ajoute Cyto4-att.

Premièrement, ces résultats appellent quelques remarques : il est possible que Cyto4-att déplace l'équilibre monomère/dimère de manière beaucoup moins efficace qu'un peptide avec l'ancrage N-terminal. Dans ce sens, nous avons suivi en

ultracentrifugation à l'équilibre le déplacement de l'équilibre oligomérique de MAST2-PDZ à 30 μ M en faisant varier les concentrations totales de peptides. Cependant, la différence de masse entre l'état complexé avec le peptide et le dimère est faible. Il n'est donc pas possible de mesurer le pourcentage de sites saturés de monomères et de fait, de calculer le pourcentage de monomère et de dimère en solution.

Deuxièmement, la largeur de pic à mi-hauteur des expériences de sédimentation est plus large avec le complexe MAST2-PDZ/Cyto4-att que pour les autres complexes (Cf. figure 2, Terrien *et al*, 2012, p.140). Cette observation qui n'est pas discutée dans le papier, nous intéresse particulièrement. Un élargissement du pic peut refléter une hétérogénéité de forme du complexe MAST2-PDZ/Cyto4-att. La sédimentation est, en partie, dépendante de la géométrie des macromolécules. Une question qui est toujours restée en suspens depuis le début du sujet est : quelle est la conformation de la longue boucle β 2/ β 3 du monomère en absence de ligand ? Il n'a pas été possible d'exploiter les spectres RMN hétéronucléaires de MAST2-PDZ sous forme apo, en raison d'un élargissement des raies et de l'agrégation de l'échantillon au cours du temps.

Troisièmement, l'ancrage N-terminal du peptide augmente son affinité d'un facteur 11 pour MAST2-PDZ. Nous pouvons ajouter à ce gain d'affinité, un gain de spécificité. Ce gain peut être nécessaire *in vivo* pour induire un phénotype cellulaire. Il est envisagé de produire des virus recombinants qui expriment une glycoprotéine G avec une affinité plus faible (mutation de l'ancrage N-terminal par exemple) pour le domaine de MAST2-PDZ et d'observer s'il existe une corrélation entre l'affinité de la glycoprotéine G pour MAST2-PDZ et le déclenchement de la survie neuronale. Il sera indispensable de vérifier que la spécificité n'est pas affectée. En effet, le risque de modifier la séquence est de créer de nouvelles interactions impliquant la glycoprotéine G.

Les résultats obtenus avec MAST2-PDZ/Cyto4-att ouvrent une nouvelle perspective qui consiste à déterminer la conformation et à mesurer la dynamique des brins β 2/ β 3 de MAST2-PDZ/Cyto4-att par RMN et de les comparer avec les conformation/dynamique du complexe MAST2-PDZ/Cyto13-att. Si notre hypothèse est correcte, nous devrions avoir une dynamique des brins β 2/ β 3 de MAST2-PDZ/Cyto4-att plus importante que MAST2-PDZ/Cyto13-att. En effet, l'hypothèse que nous formulons est que le bas de la boucle β 2/ β 3 est en échange entre deux

états conformationnels, en absence de ligand ou en présence de Cyto4-att, pouvant affecter la géométrie de MAST2-PDZ. La conformation de $\beta 2/\beta 3$ stabilisée par l'interaction avec le PDZ-BS serait alors défavorable pour l'auto-association de MAST2.

1.3.3. Comportement thermodynamique des complexes

Nous avons mesuré les contributions enthalpiques de MAST2-PDZ à $30\mu\text{M}$ ($\approx 50\%$ de monomères) en complexe avec différents ligands par microcalorimétrie isothermale (ITC). À partir de ces valeurs, nous en avons déduit une constante d'affinité apparente liée à l'interaction du peptide en utilisant un modèle de fixation simple sur le monomère. Contrairement aux expériences de fluorimétrie décrites ci-dessus, le modèle ne prend pas en compte la contribution énergétique due à la dissociation du dimère (Fig. 62).

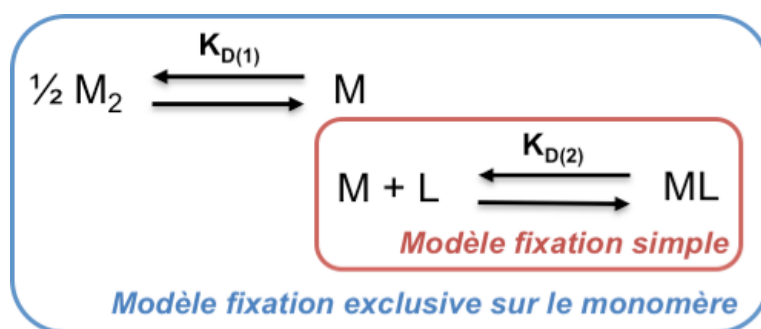


Figure 62 : Modèle de fixation simple ou exclusive du ligand sur le monomère MAST2-PDZ.

Pour comparer les constantes apparentes ($K_{D(\text{APP})}$) des différents complexes, mesurées par fluorimétrie ou ITC, nous avons traité les données de la même manière avec un modèle de fixation simple du ligand sur le monomère. Les résultats sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

Premièrement, les constantes d'affinité apparentes à 2 et $30\mu\text{M}$ mesurées en fluorimétrie sont différentes (tableau 3). À $2\mu\text{M}$, $K_{D(\text{APP})} \approx K_0$ et à $30\mu\text{M}$ $K_{D(\text{APP})} > K_0$. Ces résultats sont en accord avec un modèle plus complexe que la fixation simple du ligand sur le monomère de MAST2-PDZ que nous avons évoqué plus haut.

Tableau 3 : Constantes de dissociation apparente des complexes de MAST2-PDZ mesurées par fluorimétrie

Peptide	FLUORIMETRIE			
	MAST2-PDZ (2 μ M)		MAST2-PDZ (30 μ M)	
	Kd (μ M)	erreur +/-	Kd (μ M)	erreur +/-
Cyto13-att	0,48	0,11	16,9	1,8
Cyto13-vir	1,46	0,16	2,94	1,47
Cyto13-ETRM				
PTEN13-Cter (PF)	2,06	0,11	1,28	0,40
Cyto4-att	6,39	0,64	14,93	3,37
Cyto13-att-A(-11)W	1,46	0,07	4,37	0,48
Cyto13-DARL				
Cyto13-EIRL				

De façon surprenante, les constantes de dissociation mesurées par ITC à 30 μ M de MAST2-PDZ sont égales aux constantes de dissociation à 2 μ M en fluorimétrie. Selon notre modèle, la contribution énergétique due à la dissociation du dimère à 2 μ M de MAST2-PDZ est négligeable, contrairement à 30 μ M où la part énergétique de la dissociation du dimère de MAST2-PDZ ne peut plus être négligée. De ce fait, nous nous attendions à avoir une constante de dissociation, mesurée par ITC, à 30 μ M différente de celle mesurée à 2 μ M en fluorimétrie en utilisant un modèle de fixation simple.

En ITC, nous mesurons la chaleur dégagée par la perturbation du système, c'est-à-dire la contribution enthalpique ΔH . L'affinité est reliée à la somme des contributions enthalpiques et entropiques. Les contributions entropiques ne sont pas directement mesurables par ITC. Ils sont déduits à partir du K_D et du ΔH d'après la relation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ avec $\Delta G = -RT \ln(K_D)$.

Quand bien même la dissociation du complexe du dimère MAST2-PDZ soit purement entropique et que l'enthalpie mesurée corresponde à l'association du ligand, comment est-il possible que le K_D ne soit identique aux K_D mesurés à 2 μ M de MAST2-PDZ en fluorimétrie ? Nos données ont été exploitées à partir du logiciel Origin 7 et son module microcalorimétrie avec un modèle de fixation simple. Il est envisageable que l'ajustement généré par le logiciel sous-estime la contribution de la part énergétique de la dissociation du dimère par rapport à la fixation du ligand. Il est prévu de repartir de nos données brutes mesurées en ITC pour retraiter les données avec un modèle qui soit plus adapté à nos observations, c'est-à-dire, celui que nous avons présenté plus haut pour s'affranchir de ce biais.

Tableau 4 : Constantes de dissociation apparentes et paramètres thermodynamiques des complexes de MAST2-PDZ mesurées par Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Peptide	Isothermal Titration Calorimetry							
	MAST2-PDZ (30 μM)*							
	Kd (μM)	erreur +/-	ΔH (cal/mol)	erreur +/-	TΔS (cal/mol)	erreur +/-	n	erreur +/-
Cyto13-att	0,57	0,052	-9860	113,24	-1338,02	164,86	0,97	0,01
Cyto13-vir	1,26	0,11	-9929	142,77	-1878,39	192,97	1,00	0,02
Cyto13-ETRM	0,49	0,03	-10360	128,11	-1743,3		1,08	0,02
PTEN13-Cter (PF)	1,99	0,05	-6323	36,53	1451,558		1,19	0,01
Cyto4-att	6,37	0,01	-8237	108,2	-1148,194		1,10	0,01
Cyto13-att-A(-11)W	1,64	0,03	-7547	47,28	346,276		1,14	0,01
Cyto13-DARL	4,47	0,01	-4724	42,39	2572,336		1,15	0,01
Cyto13-EIRL	14,47	0,1	-4237	189,4	2363,736		1,13	0,02

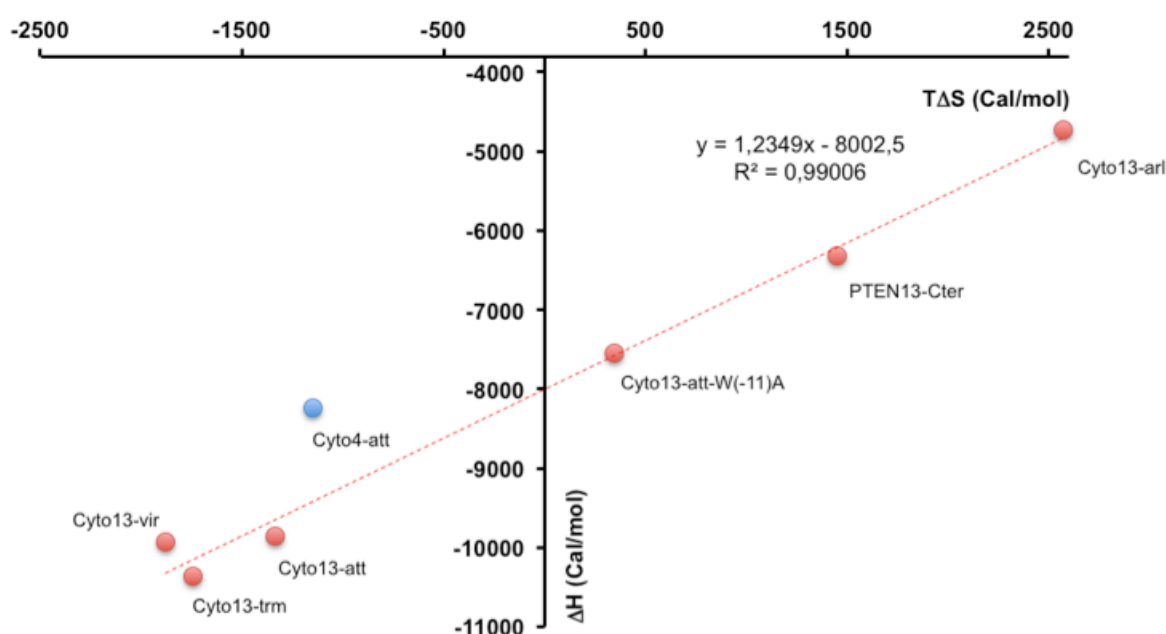


Figure 63 : Représentation des paramètres thermodynamiques des complexes de MAST2-PDZ (ΔH versus $T\Delta S$). Les points rouges correspondent à MAST2-PDZ en complexe avec Cyto13-vir, Cyto13-att, Cyto13-att-W(-11)A, Cyto13-TRM, Cyto13-ARL et PTEN13-Cter. La droite en pointillés rouges représente la régression linéaire obtenue à partir des valeurs en rouge. Le point bleu représente le complexe MAST2-PDZ/Cyto4-att.

Nous avons dans un deuxième temps analysé le comportement thermodynamique des différents complexes. Deux résultats intéressants sont illustrés par la figure 63. Premièrement, les paramètres thermodynamiques des interactions entre MAST2-PDZ et tous les peptides de 13 acides aminés suivent une relation $\Delta H = 1,23 \cdot T\Delta S + A$, bien que la séquence en acides aminés de certains peptides soit très différente. Si l'on compare MAST2-PDZ en complexe avec Cyto13-att ou Cyto13-att-W(-11)A, la perte du groupement aromatique en position -11

provoque des interactions déstabilisantes ou une solvatation dont les pertes correspondantes sont plus importantes ($\approx 2,4$ kcal/mol) que les gains entropiques (≈ 1 kcal/mol) dûs, en partie, à la flexibilité du complexe MAST2-PDZ/Cyto13-att-W(-11)A dont l'ancrage N-terminal est altéré.

Il est plus difficile de discuter du comportement thermodynamique des autres peptides en prenant comme référence Cyto13-att sachant qu'ils diffèrent de plus d'un acide aminé. D'après les structures des complexes MAST2-PDZ/PTEN13-Cter et MAST2-PDZ/Cyto13-att, une liaison hydrogène canonique est établie entre l'oxygène de la chaîne latérale de la thréonine de Cyto13-att en position -2 avec la chaîne latérale de l'histidine 73 de MAST2-PDZ. Or, pour le complexe MAST2-PDZ/Cyto13-ARL, la chaîne latérale du résidu alanine en position -2 du ligand Cyto13-ARL, ne peut apporter ce gain enthalpique. Nous constatons alors une forte perte enthalpique d'environ 5 kcal/mol qui n'est pas entièrement compensée par un gain entropique de $\approx +3,8$ kcal/mol, ce qui se traduit par une perte d'affinité d'un facteur 9.

Le complexe MAST2-PDZ/Cyto4-att est intéressant. Les caractéristiques thermodynamiques d'interaction de ce complexe ne suivent pas la droite de compensation enthalpie-entropie des autres peptides. Les peptides Cyto4-att et Cyto13-att ont la même séquence C-terminale. D'après la structure du complexe MAST2-PDZ/Cyto13-att, les 4 derniers acides aminés du peptide interagissent tous avec la poche de fixation de MAST2-PDZ qui contraint les angles φ et ϕ du site d'ancrage C-terminal en formant un brin intermoléculaire. Le reste des acides aminés de la séquence de Cyto13-att contribue aussi à l'énergie libre du complexe. Les mécanismes de compensation enthalpie/entropie sont beaucoup plus restreints pour le complexe MAST2-PDZ/Cyto4-att. Il n'est donc pas étonnant que Cyto4-att ne suit pas la même relation que les peptides longs de 13 acides aminés. Les mesures de paramètres dynamiques par RMN sur les complexes MAST2-PDZ/Cyto4-att et MAST2-PDZ/Cyto13-att-W(-11)A, discutées plus haut, seront utiles afin de discuter les résultats de thermodynamique de manière plus pertinente.

1.3.4. Protocoles expérimentaux

Mesures des caractéristiques des interactions :

MAST2-PDZ a été obtenu comme décrit dans la publication Terrien *et al.* Tous les peptides ont été synthétisés comme il est décrit dans la référence (27).

Les mesures ITC et de fluorimétrie ont été effectuées comme décrit dans les données supplémentaires de l'article Terrien *et al* (2012).

Simulation :

Les données d'interactions ont été analysées en utilisant le programme BIOEQS. Ce programme a été développé par C. Royer (237). Le modèle présenté ici, qui correspond à la fixation exclusive du ligand sur le monomère de MAST2-PDZ, a été utilisé dans le logiciel BIOEQS pour ajuster nos données expérimentales. Nous avons déclaré quatre espèces : le monomère et le dimère de MAST2-PDZ, le monomère lié au ligand et le ligand libre.

Nous avons utilisé l'interface du logiciel BIOEQS pour entrer les paramètres nécessaires à la réalisation de l'ajustement de nos données. La première énergie libre utilisée pour notre modèle, $\Delta G^\circ_{(DIM)}$, correspond à la dissociation du dimère de MAST2-PDZ. La deuxième énergie libre $\Delta G^\circ_{(ML)}$ correspond à la fixation du ligand sur le monomère. Une troisième énergie libre a été introduite pour le complexe MAST2-PDZ/Cyto13-att et qui représente la fixation aspécifique d'un deuxième ligand sur le monomère de MAST2-PDZ.

La valeur de fluorescence à saturation de MAST2-PDZ seule a été fixée pour chaque expérience. La variation de fluorescence a été mesurée au point isobestique à 354nm où la fluorescence de M est égale à la fluorescence de M₂. Cela nous permet de nous affranchir des variations de fluorescence dues à la dissociation du dimère. $\Delta G^\circ_{(DIM)}$ a été fixée à partir du K_D déduit à partir des expériences d'ultracentrifugation. La fluorescence des peptides Cyto4-att, Cyto13-att-W(-11)A et PTEN13-Cter, qui ne contiennent aucun tryptophane, a été fixée à 0. La fluorescence de Cyto13-att seule a été déduite des expériences de titrage de MAST2-PDZ avec Cyto13-att. Nous faisons donc une approximation en considérant que la fluorescence de peptide n'est pas modifiée lorsqu'il est lié à MAST2-PDZ. Le $\Delta G^\circ_{(ML)}$ est calculé à partir des K_D des complexes de MAST2-PDZ à 2μM mesuré en fluorimétrie avec un modèle de fixation simple et est utilisé comme estimé provisoire.

Le fichier de sortie contient les valeurs des concentrations de toutes les espèces générées du modèle par simulation (à partir des données d'ajustement). Ces valeurs sont disposées en une seule colonne, bloc par bloc. Chaque bloc comporte 40 valeurs qui correspondent aux 40 valeurs de la concentration totale de

ligand de la simulation ($[L]_{\text{tot}}$ de 0.1 à 1000). L'ordre des blocs est celui du modèle. Le 1^{er} bloc correspond aux valeurs de la simulation de l'espèce ML_2 (40 valeurs), le 2^e à l'espèce M2 (dimère libre), le 3^e à ML (saturation du 1^{er} site), le 4^e à M (monomère libre) et le 5^e à L (le ligand libre). Ces concentrations sont exprimées en mol/L. Grâce à ces données, nous pouvons reconstituer la saturation de chacun des sites (données non incluses).

Résultats 2

« Les études cinétiques sur la phosphorylation de la queue C-terminale de PTEN révèlent deux cascades indépendantes qui suivent un ordre séquentiel selon un mécanisme distributif. »

Résumé

L'activité enzymatique ainsi que la sublocalisation cellulaire de PTEN est, en partie, régulée par l'ajout ou la suppression de groupement phosphate sur des sérines et thréonines de PTEN-Cter. Cet équilibre dynamique, qui fait intervenir des kinases et phosphatases, est déterminant pour le maintien de l'homéostasie. Nous montrons dans cette étude que la RMN est un outil approprié pour analyser l'ordre et la cinétique de phosphorylations des sites multiples de PTEN-Cter. Ainsi, nous avons identifié, sans ambiguïté, les sept sites phosphorylés connus de PTEN-Cter par CK2 (S370, S380, T382, T383 et S385) et par GSK3- β (S362 et T366) *in vitro*. Nous avons également identifié deux nouveaux sites de phosphorylation (Ser361 et Thr363). De plus, en suivant l'apparition transitoire des états intermédiaires phosphorylés, nous avons montré qu'il est possible de déterminer la séquence des réactions et de calculer les constantes de vitesse apparentes pour chaque étape. Ces résultats montrent que deux cascades de phosphorylation qui regroupent S380-S385 et S361-S370 se produisent indépendamment l'une de l'autre et que, dans chaque cascade, les évènements suivent un ordre séquentiel ($S385^P \rightarrow S380^P \rightarrow T383^P \rightarrow T382^P$ et $S370^P \rightarrow T366^P \rightarrow S362^P \rightarrow S361^P \rightarrow T363^P$) selon un mécanisme distributif (dissociation de la kinase entre chaque étape).

Dans un deuxième temps, nous avons comparé le profil de PTEN-Cter phosphorylé par des kinases endogènes issues des extraits cellulaires de neuroblastomes humains avec celui obtenu *in vitro*. Nos données indiquent que les kinases endogènes présentes dans les extraits cellulaires de neuroblastomes sont capables de phosphoryler PTEN-Cter, que les cascades de phosphorylations par CK2 et GSK3- β sont aussi contrôlées selon le même mécanisme distributif établi *in vitro* et qu'au moins une kinase supplémentaire, présente dans les extraits cellulaires, phosphoryle PTEN-Cter indépendamment de CK2 et de GSK3- β et probablement sur Thr383.

2.1. Article Cordier et al. (soumis)

Distributive mechanism of ordered phosphorylations in two independent cascades of the PTEN C-tail revealed by NMR

Florence Cordier^{1,2*}, Alain Chaffotte^{1,2}, Elouan Terrien^{1,2,3}, Christophe Préhaud^{4,5}, François-Xavier Theillet^{1,2,†}, Muriel Delepierre^{1,2}, Monique Lafon^{4,5}, Henri Buc⁶ & Nicolas Wolff^{1,2}

¹ Institut Pasteur, Unité de Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules, Département de Biologie Structurale et Chimie, F-75015 Paris, France

² CNRS, UMR3528, F-75015 Paris, France

³ Univ. Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

⁴ Institut Pasteur, Unité de Neuroimmunologie Virale, Département de Virologie, F-75015 Paris, France

⁵ CNRS, URA3015, F-75015 Paris, France

⁶ Institut Pasteur, F-75015 Paris, France

KEYWORDS: *Multi-site phosphorylations; ordered phosphorylations; distributive kinetics; high-resolution NMR spectroscopy; PTEN*

Supporting Information Placeholder

ABSTRACT: PTEN phosphatase is a tumor suppressor controlling notably cell growth, proliferation and survival. The multi-site phosphorylations of PTEN C-terminal tail regulate its activity and its intracellular trafficking. The dynamical nature of such regulatory events represents a crucial dimension for timing cellular decisions. Here we show that NMR spectroscopy allows reporting on the order and kinetics of clustered multi-site phosphorylations. We first unambiguously identify *in vitro* seven *bona fide* sites modified by CK2 and GSK3 β kinases and two new phospho-sites on PTEN C-terminal tail. Then, following the formation of transient intermediate phosphorylated states, we determine the sequence of these reactions and calculate their apparent rate constants. Finally, we assess the dynamic formation of these phosphorylation events induced by endogenous kinases directly in extracts of human neuroblastoma cells. Altogether, our data indicate that two cascades of events controlled by CK2 and GSK3 β occur independently on two clusters of sites (S380-S385 and S361-S370) and that in each cluster the reactions follow an ordered model with a distributive kinetic mechanism. Besides emphasizing the ability of NMR to quantitatively and dynamically follow post-translational modifications, these results bring a temporal dimension on the establishment of PTEN phosphorylation cascades.

INTRODUCTION

The dual lipid and protein phosphatase PTEN, is a tumor suppressor playing a pivotal role notably in controlling cell growth, proliferation and neuro-survival^{1,2}. PTEN consists of four major domains, a PIP2-binding module participating in membrane association, a phosphatase domain required for its enzymatic activity, a C2 domain involved in membrane phosphatidylserine binding and a long flexible and unfolded C-terminal tail (PTEN-Ctail, residues 351-403, see sequence on Figure 5). The phosphorylation at several Ser/Thr residues of PTEN-Ctail constitutes an essential regulatory mechanism controlling PTEN activity, stability, cellular localization and interaction with scaffold proteins. PTEN-Ctail phosphorylation has been extensively studied *in vitro* and in various cell lines, using classical techniques (see^{3,4} for review). However, these techniques bear weaknesses in discerning phosphorylations occurring in close vicinity in the sequence. Therefore, depending on the technique used and

experimental conditions, different subsets of sites are detected, making comparative analyses and functional interpretations difficult. From compiling these studies, seven sites have been found modified to various extents, S370, S380, T382, T383 and S385 by casein kinase 2 (CK2)⁵⁻¹¹ and S362, T366 by glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β)^{9,12}. Polo-like kinase 3 (Plk3) was recently reported to phosphorylate PTEN both at T366 and S370¹³. Other Ser/Thr kinases, such as the microtubule associated serine/threonine (MAST) family¹⁴, serine/threonine kinase 11 (STK11 also named LKB1)¹⁵ and casein kinase 1 (CK1)¹² have been shown to be implicated but on unidentified sites. Several mutant-based studies reported that phosphorylation within the entire S380-S385 cluster is crucial to stabilize PTEN, to prevent its interaction with binding partners and to reduce its membrane localization and catalytic activity^{5-8,10,11}. However, the function of T366 and S370 is less clear. Phosphorylation on T366 by GSK3 β led to destabilization of PTEN¹⁶ and may provide

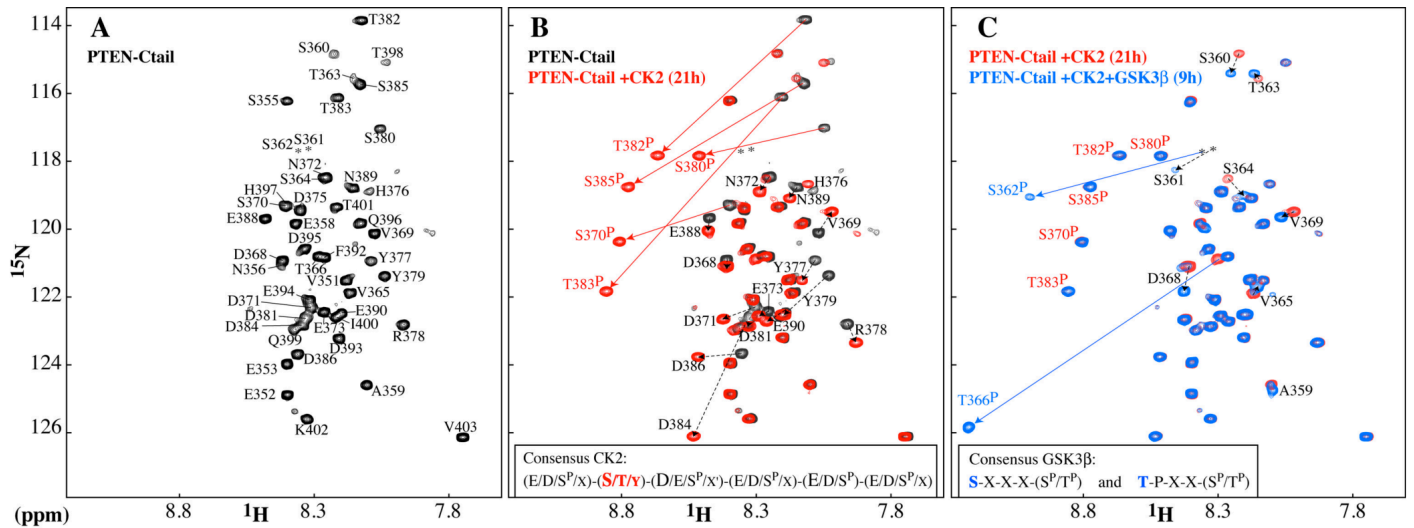


Figure 1. Unambiguous identification of PTEN-Ctail phosphorylation sites *in vitro* by NMR chemical shift perturbations. (A) Assigned ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled unphosphorylated PTEN-Ctail (black, 120 μM , pH 6.7, 25°C). Amide resonances appearing below the threshold level of the plot are indicated by a star (*). (B) In red, spectrum recorded 21 hours after addition of CK2 kinase to the PTEN-Ctail sample (black). Resonances of phosphorylated Ser/Thr residues by CK2 are labeled in red and slightly shifted neighboring resonances in black. *Inset*: consensus phosphorylation sequence of CK2, where X is any residue except basic residues and X' is any residue except basic or proline residues; the size of the letters is roughly proportional to the frequency of a given residue at that position²³. (C) In blue, spectrum recorded 9 hours after addition of GSK3 β kinase to the CK2-phosphorylated PTEN-Ctail sample (red). Resonances of phosphorylated Ser/Thr residues by GSK3 β are labeled in blue and slightly shifted neighboring resonances in black. *Inset*: consensus phosphorylation sequence of GSK3 β ^{24,25}.

negative feedback regulation of PTEN¹². Controversially, phosphorylation of S370 and T366 by Plk3 was shown recently to stabilize PTEN and increase its activity¹³.

Multi-phosphorylation events provide a reversible molecular mechanism to time cellular events. Crucial cellular decisions such as the trigger of cellular survival are probably governed by such finely tuned regulatory events. The system involving kinases, phosphatases and substrate is likely maintained far from equilibrium *in vivo*, so that tiny changes in their local concentration lead to drastic changes in cell fate. To better understand the biological relevance of PTEN modifications in a particular cell type and to bring a temporal dimension to these events, a complete and dynamical description in term of phosphorylation order and kinetics is needed. Mass spectrometry-based phosphoproteomics now allows tracking the global phosphorylation state of many proteins in cells over time and are promising for quantifying the dynamical behavior of signaling networks in response to stimulation^{17,18}. However, the extent of phosphorylation at a given site or in relation to other sites within the same substrate is equally critical for the functional interpretation but remains challenging to evaluate, especially when clustered sites are concerned. High-resolution NMR spectroscopy has recently demonstrated its suitability to monitor post-translational events in a time-dependent manner on entire peptides or proteins¹⁹⁻²² and to report on stepwise modifications at the residue level. Furthermore, phosphorylation events can be detected by NMR *in vitro*, in cellular extracts and even in intact oocytes cells²⁰.

In this paper, we show that NMR further allows reporting on the dynamic nature of clustered multi-site phosphorylations *in vitro* and in extracts of human neuroblastoma cells. By following the formation of transient intermediate phosphorylated states in the NMR spectra, we show that two cascades of phosphorylation events occur independently and that, in each cascade, the reaction proceeds in a defined order

via a distributive mechanism. These results shed new lights on the dynamical process of PTEN multi-site phosphorylations.

RESULTS

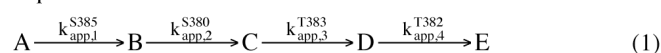
Unambiguous identification of seven *bona fide* CK2 and GSK3 β phosphorylation sites on PTEN-Ctail *in vitro* by NMR. To identify PTEN-Ctail phosphorylation sites by NMR, recombinant U- $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled PTEN-Ctail (residues V351-V403 of human PTEN, see sequence in Figure 5) was produced in *E. coli*. The NMR ^1H - ^{15}N heteronuclear single quantum correlation (HSQC) spectrum recorded on PTEN-Ctail showed very limited dispersion of amide resonances (Figure 1A), characteristic of an unfolded peptide. To monitor by NMR the phosphorylation of PTEN-Ctail by CK2 kinase *in vitro*, experimental conditions leading to a detectable amount of phosphorylation were initially set up by mass spectrometry. Thus, an adjusted amount of recombinant CK2 was added to the PTEN-Ctail NMR sample as described in Materials and Methods. ^1H - ^{15}N HSQC spectra were regularly recorded in the time course of the reaction and showed the appearance of new resonance signals and the disappearance of others (Figure 1B), in agreement with the high sensitivity of ^1H and ^{15}N chemical shifts towards phosphorylation-induced changes in the neighborhood of a phosphorylated residue. After 21 hours of reaction, when no more spectral changes were visible, assignment of the phosphorylated form of PTEN-Ctail allowed an unambiguous identification of the most downfield shifted resonances as a first set of CK2-phosphorylated residues S370^P, S380^P, T382^P, T383^P and S385^P (see sequence in Figure 5). Each of these five sites lies within a CK2 consensus motif²³, where an acidic or phosphorylated residue is invariably found at position either n+1 or n+3 of the CK2 site (Figure 1B, *Inset*). Other slightly shifted resonances were assigned to neighbors of these phosphorylated Ser/Thr residues (see also Supporting Figure S1).

Phosphorylation of PTEN-Ctail by GSK3 β kinase was similarly assessed by mass spectrometry. No phosphorylation

could be detected by GSK3 β unless CK2 was simultaneously added in the sample. Indeed, GSK3 β usually requires an initial priming phosphorylation, optimally located four residues downstream, by another kinase (Figure 1C, *Inset*)^{24,25}. Thus, phosphorylation of PTEN-Ctail by GSK3 β was followed by NMR by adding an adjusted amount of recombinant GSK3 β to the CK2-phosphorylated PTEN-Ctail sample (see Materials and Methods). Again, a series of ¹H-¹⁵N HSQC spectra was acquired in the time course of the reaction. After 9 hours, two resonances were drastically downfield shifted and were unambiguously assigned to the phosphorylated residues S362^P and T366^P (Figure 1C). As anticipated from the GSK3 β consensus site, these results suggest that priming phosphorylation by CK2 at S370 allows GSK3 β to first modify T366 and then S362 (see sequence in Figure 5). The few slightly shifted resonances correspond to neighboring residues A359-V369. By simultaneously adding CK2 and GSK3 β , the same NMR spectra were obtained at the end of the reaction (see Supporting Figure S1).

Thus, our data allow unambiguous identification of seven *bona fide* phosphorylation sites in PTEN-Ctail *in vitro*, by CK2 at S370, S380, T382, T383 and S385 and by GSK3 β at S362 and T366.

Evidence of a distributive ordered phosphorylation mechanism in the S380-S385 cluster of PTEN-Ctail and apparent rate constants of the reactions. In the series of HSQC spectra acquired during the CK2 reaction (Figure 2B), we observed the progressive disappearance of the resonances of the unphosphorylated PTEN-Ctail species (denoted A) and the appearance of the resonances of the fully phosphorylated species within the S380-S385 cluster (denoted E) and, meanwhile, the appearance and subsequent disappearance of resonances of three intermediate phosphorylated species (denoted B, C and D). The species A to E correspond to unphosphorylated (A), mono- S385^P (B), bi- S385^P-S380^P (C), tri- S385^P-S380^P-T383^P (D) and fully-phosphorylated S385^P-S380^P-T383^P-T382^P species (E), as described in Figure 2A. Our data indicate that the phosphorylation events within this cluster proceed in a precise order, at sites S385, S380, T383 and T382, *via* the transient accumulation of 3 unique intermediate phosphorylated states according to the following sequential reaction model:



We unambiguously came to this conclusion for the following reasons: In the series of HSQC spectra, we observed that, (i) upon phosphorylation of S385 (species A to B), the decay in amplitude of S385^U(A) (the unphosphorylated S385 resonance peak in species A) was concomitant with a transient increase in amplitude of phosphorylated S385^P(B). Due to the influence of phosphorylation of a residue on its neighbors (up to n \pm 5), the phosphorylation of S385 led to the slight synchronous resonance shift of unphosphorylated S380^U, T382^U and T383^U, which disappeared from species A to concomitantly reappear as species B. Then, (ii) phosphorylation of S380 gave rise to a transient accumulation of phosphorylated S380^P(C) and a concomitant disappearance of S380^U(B), accompanied by a small shift of the neighboring T382^U, T383^U and S385^P resonances, which disappeared from species B to reappear as species C. According to a similar “transient/concomitant” process, (iii) phosphorylation of T383

led to an accumulation of T383^P(D), a disappearance of T383^U(C) and a slight shift of its neighbors S380^P, T382^U and S385^P, which disappeared from species C to reappear as species D. Finally, (iv) phosphorylation of T382 led to an increase in intensity of T382^P(E) up to a stable plateau, a disappearance of T382^U(D) and a slight shift of S380^P, T383^P and S385^P, which disappeared from species D to reappear, also up to a plateau, as species E. This succession of time-coupled events demonstrates that the phosphorylation of the S380-S385 cluster obeys the following ordered process: \rightarrow S385^{P} \rightarrow S380^{P} \rightarrow T383^{P} \rightarrow T382^P. Neither other branched phosphorylation model nor random mechanism could explain our data: In summary, as schematized on Figure 2A, a unique resonance signal is observed in the overlay of HSQC for S385^U (species A) and four resonances are observed for S385^P (B, C, D and E). Similarly, two signals are observed for S380^U (A, B) and three signals are observed for S380^P (C, D, E). Three signals are observed for T383^U (A, B, C) and two signals are observed for T383^P (D, E). Finally, four signals are observed for T382^U (A, B, C, D) and a single signal is observed for T382^P (E). Thus, the kinetic decay of A can be deduced not only from the resonance amplitude of S385^U but also from that of neighboring residues whose chemical shifts are influenced by the phosphorylation at the 385 position. The same situation applies for B to E species. Assignment of these intermediate resonances could be unambiguously established based on the fact that (i) chemical shift changes of a residue from a species to the next one are generally decreasing with increasing distance to the phosphorylated site (see Supporting Figure S1) and (ii) the time course of disappearance/appearance of each species as “seen” from different residues follows the same kinetics (see below).}}}

The observation of these intermediate species on the NMR spectra indicates that the substrate must be released from the CK2 kinase active site between each phosphorylation step. In addition, the sum of the resonance amplitudes *A*, *B*, *C*, *D* and *E* for each residue is practically constant over the time of reaction. Therefore, our data clearly show that the reaction predominantly obeys a distributive ordered mechanism, in which each of the four phosphorylation steps requires a separate binding event between the kinase and the substrate (in contrast to a processive mechanism without substrate release).

In order to appreciate the relative rates of transfer associated to the successive phosphorylation events, we approximate each elementary step of the linear 5-state model mentioned above to a spontaneous (irreversible) first order reaction. According to this approximation, the time course of the disappearance/appearance of the resonance amplitude *A*, *B*, *C*, *D* and *E* of residues in each species is given by a sum of exponential functions (as given by equations (1a) to (1e) of the Supporting Information) that depend on *A*₀, the initial amplitude of species A (with *A*₀ = *A*+*B*+*C*+*D*+*E*), and on *k*_{app,1}, *k*_{app,2}, *k*_{app,3} and *k*_{app,4}, the apparent rate constants (or transfer rate constants) of the S385, S380, T383 and T382 phosphorylation events, respectively. Each apparent rate constant depends on the rates for reversible enzyme binding and for catalysis at a given concentration of substrate and kinase. The amplitudes were measured and normalized so that *A*+*B*+*C*+*D*+*E*=1 for each residue, using a residue-specific *A*₀ constant. The variation in time of the average amplitude of each species shows the transient

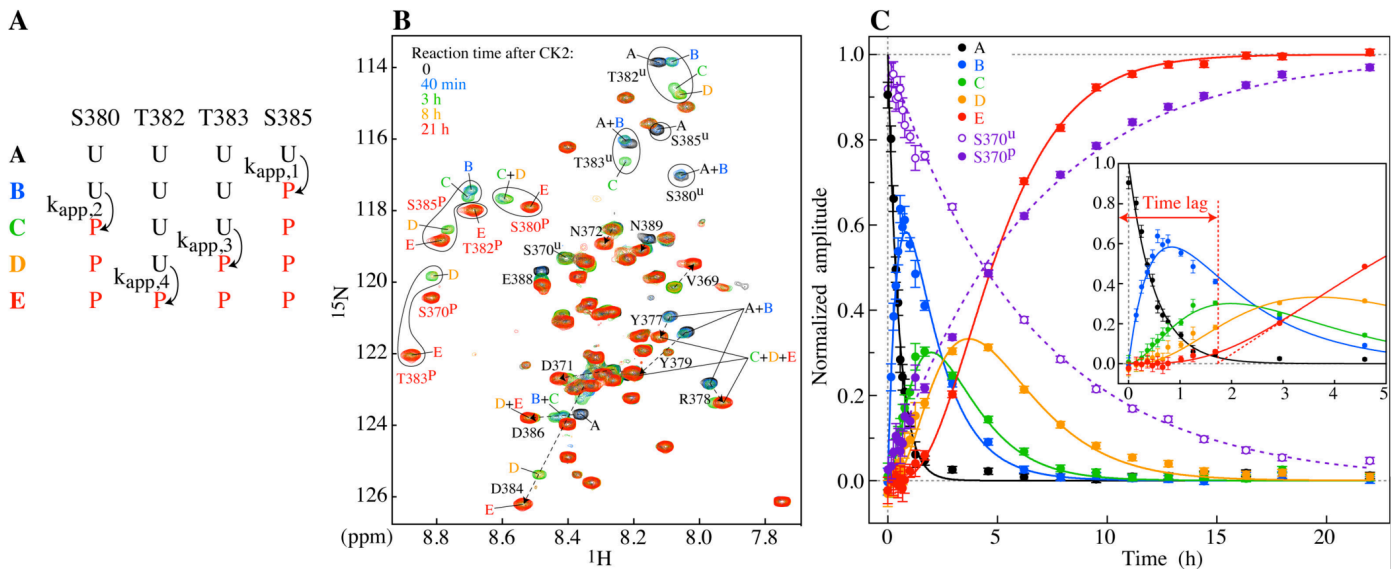


Figure 2. Kinetics of the multi-site phosphorylations in the S380-S385 cluster of PTEN-Ctail by CK2 *in vitro*. (A) Definition of the phosphorylated species within the S380-S385 cluster as they appear in the sequential reaction model. U or P denote unphosphorylated or phosphorylated by CK2. (B) Overlay of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled PTEN-Ctail recorded in the time course of the CK2 reaction from 0 to 21 hours. Resonance assignment is indicated for the Ser/Thr residues and their neighbors in each phosphorylated species A to E (see text). (C) Amplitudes of the averaged normalized resonance signals for each species A to E are plotted as a function of the CK2 reaction time. Error bars correspond to the rms of the noise in the corresponding spectrum. The curves (solid lines) are the result of a global non-linear least square fitting of the amplitudes A to E to equations (1a) to (1e) given in Supporting Information. The time lags introduced by such an ordered process can be appreciated in the *Inset*. The time course of the normalized amplitude of S370^{U} and S370^{P} resonances (open and close violet circles) was fitted to single exponential functions (dashed lines).

nature of the three intermediate phosphorylation species B, C and D and the time lag in the appearance of the C, D and E species (Figures 2C and *Inset*). Individual non-linear least square fitting of amplitudes A, B, C, D and E to their corresponding equation, using a simplex or Levenberg-Marquardt algorithm, allowed extracting $k_{\text{app},1}$, $k_{\text{app},2}$, $k_{\text{app},3}$ and $k_{\text{app},4}$ values of 1.93 ± 0.29 , 0.65 ± 0.01 , 0.82 ± 0.05 and $0.50 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$, respectively, in our conditions (Table 1). These values are very similar to the ones extracted from a global fit of the average A to E data (Supporting Table S1). A detailed description of the fitting procedure is given in Materials and Methods.

A simpler analysis was required to evaluate the kinetics of phosphorylation of S370. As seen on Figures 2B and 2C, S370^{U} resonance disappears *via* a single exponential decay ($U = U_0 \exp^{-k_{\text{app}} t}$), while S370^{P} resonance synchronously appears *via* an exponential function ($P = U_0(1 - \exp^{-k_{\text{app}} t})$), with the same apparent rate constant k_{app} and with $U_0 = U + P$ (U and P the resonance amplitudes of unphosphorylated and phosphorylated species). No initial lag phase is detectable in the accumulation of S370^{P} . Phosphorylation of this residue likely occurs as an event independent of the phosphorylation pattern developing in the S380-S385 cluster. Upon S370 phosphorylation, the neighboring peaks V369 and N372 disappear and reappear with slightly shifted resonance frequencies and with amplitudes fitting to the same equations with the same apparent rate constant as S370^{U} and S370^{P} . Thus, the apparent rate constant $k_{\text{app}}^{\text{S370}}$ was extracted from individual non-linear least square fitting of the normalized amplitudes of the representative species S370^{U} and S370^{P} to the single exponential functions given above, respectively, giving an average value of $0.15 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ in our conditions (Table 1).

In conclusion, by a thorough analysis of the series of HSQC spectra, we show that the CK2 phosphorylation sites are processed in a defined order in the S380-S385 cluster ($\text{S385} \rightarrow \text{S380} \rightarrow \text{T383} \rightarrow \text{T382}$) by a distributive kinetic mechanism and randomly on S370 (Figure 5). Our data further allow deriving the five apparent rate constants of each of these CK2 phosphorylation events (at a given concentration of substrate and kinase).

Modifications of PTEN-Ctail by GSK3 β and identification of additional late phosphorylation sites.

While no detectable phosphorylation takes place after addition of GSK3 β alone (see above), the GSK3 β reaction was followed on CK2-phosphorylated PTEN-Ctail. In the series of HSQC spectra recorded while the GSK3 β reaction proceeds, T366^{U} resonance disappears *via* a single exponential decay, while T366^{P} resonance concomitantly appears *via* an exponential function with the same apparent rate constant (Figure 3B and *Inset*). The neighboring resonances (D368 and V369) disappear and reappear nearby with the same kinetics as T366^{U} and T366^{P} . No time lag is observed in the appearance of the phosphorylated species T366^{P} , a feature attributed to the full phosphorylation of a priming residue, S370, in this sample. Extracting the apparent rate constant $k_{\text{app}}^{\text{T366}}$ by fitting the normalized amplitudes of the representative species T366^{U} and T366^{P} to single exponential functions (as described above for S370) gives an average and standard deviation of $0.43 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ in our conditions (see Table 1). Note that the apparent rate constants for the GSK3 β reaction are not directly comparable to the ones obtained for the CK2 reaction, due to the arbitrary concentration of kinases used in the *in vitro* experiment (8 and 39 nM for CK2 and GSK3 β , respectively).

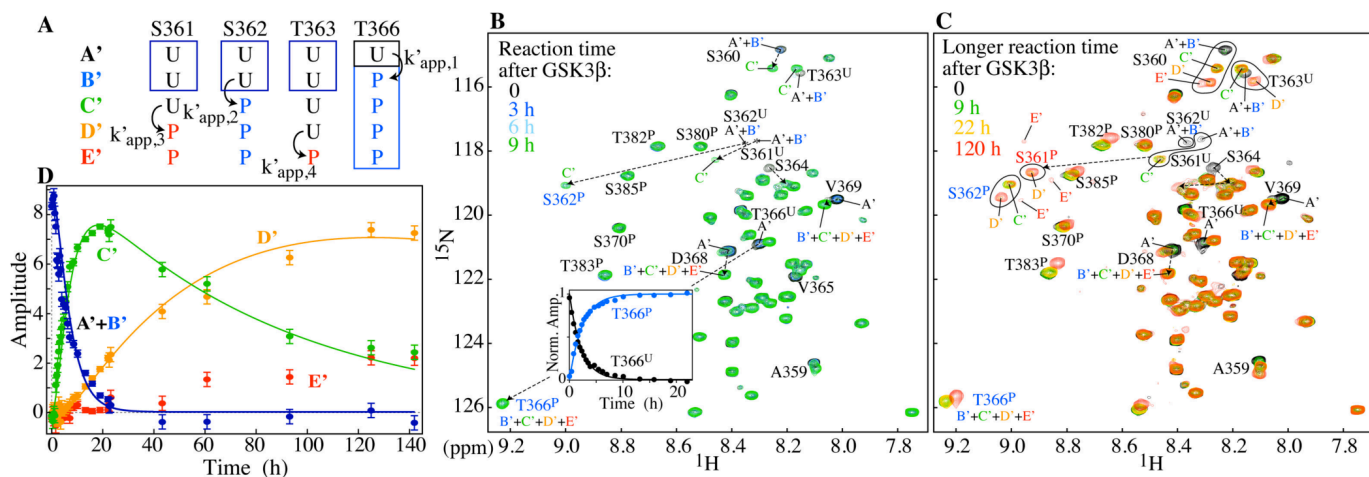
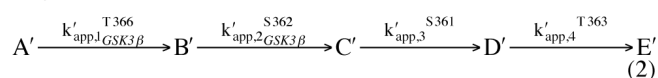


Figure 3. Kinetics of PTEN-Ctail phosphorylation reactions by GSK3 β kinase *in vitro* and evidence of late CK2 modifications at two new sites. (A) Definition of the phosphorylated species within the S361-T366 cluster as they appear in the sequential reaction model. U and P (blue and red) denote unphosphorylated and phosphorylated (by GSK3 β and possibly by CK2, see text). In the absence of chemical shift changes upon phosphorylation of S361-T363 on T366 and reciprocally of T366 on S361-T363, T366^P in species B' to E' (blue box) are overlapped in the spectra as well as species A' and B' of each S361, S362 and T363 (dark blue boxes). (B) Overlay of ¹H-¹⁵N HSQC spectra recorded on the CK2-phosphorylated PTEN-Ctail sample in the time course of the GSK3 β reaction from 0 to 9 hours. Resonance assignment of the various phosphorylated species is indicated. *Inset*: the time courses of the normalized amplitudes of T366^U (species A') and T366^P (species B'+C'+D'+E' = 1 - A') resonances were fitted to single exponential functions (solid lines). (C) Overlay of HSQC spectra as in (B) but recorded for longer reaction times, 22 and 120 hours. From 120 hours onwards, resonance shifts were observed, due to slight pH change likely induced by ATP hydrolysis. (D) Amplitudes (not normalized) of the average resonance signals for each species A'+B', C', D' and E' are plotted as a function of the GSK3 β reaction time. Error bars correspond to the rms of the noise in the corresponding spectrum. The curves (solid lines) are the result of individual non-linear least square fitting of the amplitudes A'+B', C' and D' to their corresponding equations (1a)+(1b), (1c) and (1d) given in Supporting Information. The apparent rate constants are given in Table 1 (note the poor accuracy on k'_{app,4} determination).

Surprisingly, the second GSK3 β phosphorylated resonance peak S362^P (mentioned above) starts disappearing after about 20 h with the concomitant appearance of a new set of signals. From time 0 to longer reaction times (Figure 3C), we observed the ordered apparition of species A' to E' corresponding to unphosphorylated (A'), mono- T366^P (B'), bi- T366^P-S362^P (C'), tri- T366^P-S362^P-S361^P (D') and tetra-phosphorylated species T366^P-S362^P-S361^P-T363^P (E'), as defined in Figure 3A. Kinetics are consistent with the following sequential enzymatic reaction model:



We came to this conclusion for the following reasons: (i) phosphorylation of S361, S362 and T363 does not induce chemical shift changes on T366^P, so that a single resonance peak is observed for T366^P, whatever the phosphorylation states of S361 to T363 residues. So, its kinetics is described (see above) by a single exponential function defined by equation 1-(a) of the Supporting Information, corresponding to the sum of species B'+C'+D'+E' = 1 - A'. (ii) Similarly, phosphorylation of T366 does not induce chemical shift changes on S361, S362 and T363, so that species A' and B' overlap for the latter residues. Therefore, as schematized on Figure 3A, we can “visualize” in the overlay of HSQC spectra (Figure 3C) species A'+B' *via* three resonance signals corresponding to unphosphorylated residues S361^U, S362^U and T363^U, species C' *via* two unphosphorylated residues S361^U and T363^U and one phosphorylated residue S362^P, species D' *via* one unphosphorylated residue T363^U and two phosphorylated residues S361^P and S362^P and species E' *via* three unassigned small resonance signals that likely correspond to phosphorylated residues S361^P, S362^P and

T363^P. The cascade of events is also clearly visible on the neighboring S360 resonance, which is slightly shifted upon each phosphorylation step, except upon the first one at T366. Interestingly, prior preliminary mass spectrometry experiments revealed the incorporation of a total of nine phosphoryl groups in PTEN-Ctail (Supporting Figure S2), in agreement with the NMR observation of the late phosphorylations at S361 and T363 that are more probably phosphorylated by CK2 than GSK3 β . We are therefore tempted to ascribe S361 and T363 to CK2-phosphorylation sites but further experiments are required to validate this hypothesis. Similarly, prior modification at S361 and/or T363 could in turn induce modification at S360, possibly by CK2. However, resonance signals of such a penta-phosphorylated species were not observed. Although the reaction is not complete, the apparent rate constants k'_{app,2} to k'_{app,4} are extracted from individual non-linear least square fitting of non-normalized amplitudes A'+B', C' and D' to their corresponding equation ((1a)+(b), (1c) and (1d) of Supporting Information) by fitting an additional parameter A₀' for each species (see Figure 3D and Materials and Methods). This leads to k'_{app,2}^{S362}_{GSK3 β} = 0.193 ± 0.010 h⁻¹, k'_{app,3}^{S361} = 0.012 ± 0.001 h⁻¹ and an upper limit of k'_{app,4}^{T363} < 0.006 h⁻¹, in our conditions and with different relative timescales for GSK3 β and CK2 reactions (Table 1).

In conclusion, our *in vitro* data show that prior phosphorylation by CK2 at S370 allows phosphorylation by

GSK3 β at T366 and in turn at S362, which promotes, later in time, further ordered modifications at S361^P and T363^P (possibly by CK2) *via* a distributive kinetic mechanism \rightarrow S370^P \rightarrow T366^P \rightarrow S362^P \rightarrow S361^P \rightarrow T363^P (Figure 5).

Table 1. Apparent rate constants (h⁻¹) of each event within the two cascades for the *in vitro* experiment ^a.

Cluster 1	S385 ^b 1.93±0.29	S380 ^b 0.65±0.01	T383 ^b 0.82±0.05	T382 ^b 0.50±0.04	
Cluster 2	S370 ^b 0.15±0.01	T366 ^c 0.43±0.03	S362 ^c 0.19±0.01	S361 ^d 0.012±0.001	T363 ^{d,e} <0.006±0.001

^a Values of the apparent rate constants (in h⁻¹) depend on the concentration of kinases and substrate. Details on the fitting procedure are given in Materials and Methods and in the Supporting Information.

^b CK2 phosphorylations.

^c GSK3 β phosphorylations in italic, occurring on a different time scale than the CK2 ones.

^d Phosphorylations possibly controlled by CK2.

^e Poor accuracy on this apparent rate constant, since the decay of species D' is not sampled.

Observation of the dynamic process of PTEN-Ctail multi-site phosphorylations in neuroblastoma cell extracts.

Finally, we intended to assess if the multi-site phosphorylation events also take place in cellular extracts of human neuroblastoma, if they follow a similar ordered process and if this pattern could be accounted by the likely and sole presence of CK2 and GSK3 β kinases in these extracts. Human neuroblastoma cells were chosen because they express the kinases CK2 and GSK3 β (Supporting Figure S3) and they constitute a suitable model for studying the role of PTEN in neuritogenesis (²⁶ and Terrien *et al.*, submitted). Human neuroblastoma SH-SY5Y cell extracts ²⁷ were prepared as described in Materials and Methods. From 10⁸ differentiated cells, a total protein concentration of 12 to 15 mg/ml was quantified in the extracts. The NMR sample was prepared by adding U-¹⁵N/¹³C-labeled PTEN-Ctail (50 μ M, final concentration) to the neuroblastoma cell extracts (see Materials and Methods). ¹H-¹⁵N HSQC spectra were rapidly recorded after PTEN-Ctail was added to the extracts. The spectra display rather narrow ¹H and ¹⁵N line-widths despite the higher viscosity of this cellular medium. After 30 hours, no more changes were observed in the spectra.

Compared to the spectrum of unphosphorylated PTEN-Ctail *in vitro*, we observed the appearance of many new resonance peaks (Figure 4A). Most of them formed a “pattern” globally similar to the one observed in the overlay of HSQC recorded *in vitro* during the CK2 and GSK3 β reactions (Figures 2B and 3C). By analogy, we assigned resonances of species A to E (as defined in Figure 2A), corresponding to phosphorylations within the S380-S385 cluster. We also assigned resonances of species A' to D' (as defined in Figure 3A), corresponding to phosphorylations of T366, S362 and S361. Species E' was barely detected by a fourth S360 resonance (star below threshold on Figure 4A), suggesting that T363 is likely phosphorylated to a low level. Despite all the conditions tested (large excess of ATP, phosphatase inhibitors, changes in the solvent or in the reaction temperature), higher phosphorylation levels could never be reached. The overall similarity with the pattern of resonances observed *in vitro* indicates that, in these cellular extracts, the phosphorylation process is essentially

sequential, involving the same intermediate phosphorylation species, \rightarrow S385^P \rightarrow S380^P \rightarrow T383^P \rightarrow T382^P and \rightarrow S370^P \rightarrow T366 \rightarrow S362 \rightarrow S361^P \rightarrow T363^P. It is most probably controlled by endogenous CK2 and GSK3 β kinases present in the extracts (Figure 5).

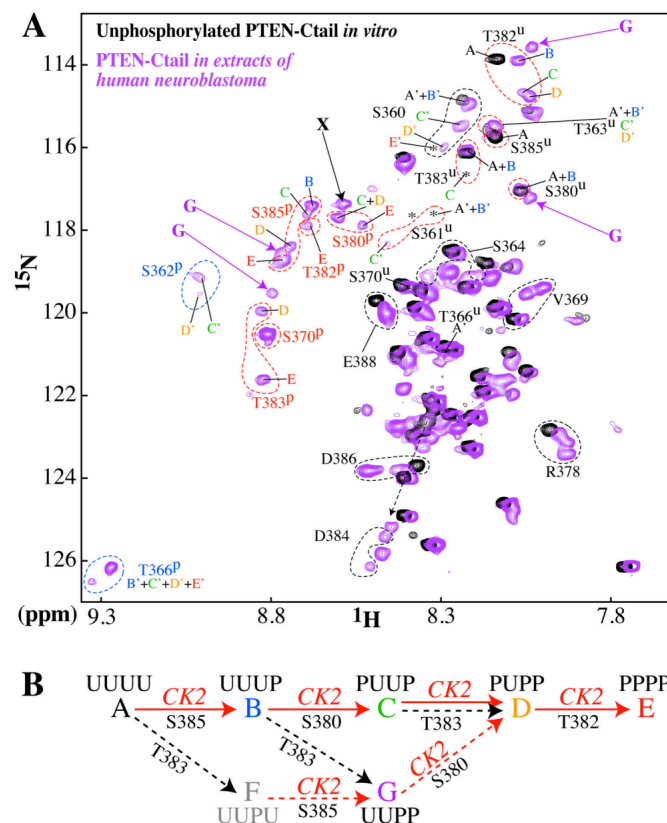


Figure 4. Detection of PTEN-Ctail phosphorylations in neuroblastoma cell extracts. (A) Superposition of ¹H-¹⁵N HSQC spectra of PTEN-Ctail recorded in neuroblastoma cell extracts after 30 hours of phosphorylation by endogenous kinases (magenta, pH 7.5) and *in vitro* on its unphosphorylated state (black, pH 6.7). Slight differences in amide chemical shifts compared to the *in vitro* spectra are likely due to the pH difference. Resonances appearing below the threshold level of the plot are indicated by a star (*). Assignment of the intermediate phosphorylated states corresponding to species A, B, C, D, E for the S380-S385 cluster and to species A', B', C', D', E' for the S361-T366 cluster is indicated with the color-coding of Figures 2B and 3C. Set of resonances corresponding to phosphorylated residues by CK2 and GSK3 β in cell extracts are surrounded in red and blue, respectively. The five new Ser/Thr resonance peaks are indicated by a magenta G or a black X (see text). (B) Proposed branched model in the S380-S385 cluster to account for the new species G. Black dotted arrows denote the alternative pathway possibly controlled by another kinase than CK2 and GSK3 β . The putative species F in grey is not detected. In each species, U or P indicates the phosphorylation state of S380, T382, T383 and S385.

However, some differences are observed with the *in vitro* experiments, such as the detection of five new Ser/Thr resonance peaks (Figure 4A). Four of them (labeled with magenta G in Figure 4A) are in the vicinity of S380^U, T382^U, T383^P and S385^P resonances. They most likely correspond to the doubly phosphorylated species S380^U-T382^U-T383^P-S385^P (called species G). As a qualitative argument for its identification, the changes in chemical shifts of each of S380^U, T382^U, T383^P and S385^P in

the new species G with respect to their chemical shifts in species A to E agree well to what would be expected in relation to the distance to a phosphorylated residue. The new species G lays off-pathway from the linear chain reaction controlled *in vitro* by CK2 and GSK3 β only. This suggests a more complex branched mechanism, following the model described in Figure 4B. The species G could arise either from species B or from species A through the transient intermediate species S380^U-T382^U-T383^P-S385^U (called species F). The latter is not detected in our experiment, possibly because of its too short lifetime, due to the fast S385^U/S385^P conversion by CK2 (in the same manner as species A has disappeared at this time of the reaction). As compared to the linear model, this branched mechanism would imply a change in the relative time course of species A to E and, intuitively, a shunt in the accumulation of species C. This is indeed the case: as seen on Figure 4A, the amplitudes of the resonance peaks of species C are significantly smaller than that measured for species B and D, a situation never observed along the time course of the *in vitro* reaction (see Figure 2C). Therefore, in the cell extracts, the kinetics in the S380-S385 cluster must change beyond a simple scaling factor of the apparent rate constants determined *in vitro*. Note that, by simulating the enzymatic chain reaction (see Supporting Information and Figure S4), we show that, under the conditions prevailing in our *in vitro* experiments, changing the initial substrate or kinase concentration should change only the global rate of the reaction but should not affect the apparent rate constants relative to each other. The absence of this alternative pathway *in vitro* further suggests the contribution of a kinase other than CK2 and GSK3 β present in the cell extracts, acting on T383. Finally, a fifth new peak appears also in the region of the phosphorylated Ser/Thr (black X in Figure 4A). This single peak indicates that an isolated site of PTEN-Ctail is likely phosphorylated by a kinase specifically different from CK2 and GSK3 β as well. Further experiments are in progress to test these hypotheses.

In conclusion, our data indicate (i) that endogenous kinases present in the neuroblastoma cell extracts are able to phosphorylate PTEN-Ctail, (ii) that the phosphorylation cascade controlled by CK2 and GSK3 β proceeds according to the distributive ordered process established *in vitro*, (iii) that at least one additional kinase present in the cellular extracts phosphorylates PTEN-Ctail independently of CK2 and GSK3 β , very likely on T383 and on another unidentified site and, consequently, (iv) that the relative apparent rate constants within the S380-S385 cluster must change beyond a simple scaling factor of the $k_{app,1}$ to $k_{app,4}$ values established *in vitro*.

DISCUSSION

Summary. Using NMR spectroscopy, we have deciphered the multi-site phosphorylation pattern of PTEN-Ctail by CK2 and GSK3 β . We unambiguously identified, both *in vitro* and in human neuroblastoma cell extracts, nine phosphorylation sites, in agreement with the incorporation of nine phosphoryl groups that we preliminarily detected by mass spectrometry. Following by NMR the formation of intermediate phosphorylated species *in vitro*, we derived apparent rate constants (specific for our conditions) for each phosphorylation step and showed that two cascades of events occur independently. The first one is controlled by CK2 and corresponds to the path S385 \rightarrow S380 \rightarrow T383 \rightarrow T382. The second is slower and occurs in the order S370 \rightarrow T366 \rightarrow S362 \rightarrow S361 \rightarrow T363 through the action of

CK2, GSK3 β (*italic*) and possibly CK2 again (Figure 5). The latter appears as slower since the apparent rate constant of its first event on S370 is more than 10-fold smaller than that of S385 by the same kinase. In the cellular extracts, the two cascades follow the same ordered and distributive process as observed *in vitro* and are most likely controlled by endogenous CK2 and GSK3 β , the dominant kinases phosphorylating PTEN. However, the detection of a new off-pathway phosphorylated species, suggests the phosphorylation of T383 *via* an alternative pathway controlled by another kinase in the cellular extracts.

Comparison with literature. Seven of these sites (S370, S380, T382, T383 and S385 by CK2 and S362 and T366 by GSK3 β) were previously reported using traditional techniques. However, they were only detected as various subsets and to various extents, even *in vitro*. For instance, S370 and S385 were identified as major phospho-sites *in vitro* and *in vivo*^{6,9,12}. Astonishingly Al-Khoury *et al.* did not detect phosphorylation at S380 *in vitro* by phosphoamino acid analysis, mass spectrometry and autoradiography experiments¹². Maccario *et al.*, using phospho-specific antibodies against S362, failed to detect phosphorylation at S362 either in cells or *in vitro*¹⁶. These apparent contradictions with our NMR data are rather the consequences of technical limitations than of an actual absence of modification. This clearly emphasizes the advantage of NMR upon other techniques to unambiguously identify the whole pattern of modifications. To our knowledge, the two phospho-sites S361 and T363, which we observed both *in vitro* and in neuroblastoma cell extracts, had never been reported yet, probably because of an apparent low population due to their slow kinetics. Functional experiments (beyond the scope of this paper) are nevertheless required to assess the biological relevance of those late occurring phosphorylations as well as experiments to confirm that they are controlled by CK2.

Consensus & predictions. These nine phosphorylation sites lie within a CK2 or GSK3 β consensus motif^{23-25,28} and could have been somehow predicted. For S361 and T363 sites possibly controlled by CK2, the acidic charges (represented by phosphorylated Ser/Thr) are less abundant between positions n-1 to n+4, which could justify their slower kinetics. However, in all cases, precise information on the phosphorylation kinetics was missing and convincing biochemical pathways could not be established. Our results illustrate for example a counterintuitive experimental fact: S380, with an unphosphorylated T at the crucial n+3 position, is processed *in vitro* at a 4-fold faster apparent rate constant than S370 that possesses a more favorable residue, E, at the same relative position. Although the definition of consensus sequences from systematic studies can greatly facilitate the prediction of potential sites, unambiguous identification of phospho-sites as well as determination of phosphorylation efficiency cannot rely on such predictions without experimental evidences. PTEN-Ctail can be taken as an example where other determinants within the sequence modulate phosphorylation efficiency. Furthermore, in this case, the presence of strictly ordered phosphorylation pathways has another consequence for biological studies: Any point mutation of Ser/Thr residues differentially affects the cascade of phosphorylation events in the downstream pathway, so that the local modification is not necessarily responsible for the observed functional outcome.

Multi-site phosphorylations and distributive mechanism. The observation by NMR of each intermediate

phosphorylation species of PTEN-Ctail is clearly characteristic of a distributive mechanism. Although such a mechanism is less energetically favorable than a processive mechanism²⁹, it can exert critical regulatory functions in cellular signaling. Distributive multi-site phosphorylation process introduces a dependence on enzyme concentration such that a small change in kinase (or phosphatase) concentration leads to a large change in the proportion of phosphorylated substrate. It was proposed that this ultrasensitive behavior produces a switch-like response, the regulatory outcome being an all-or-none cell decision^{30,31}. More recently, a new notion has been introduced³². Above a certain threshold in the kinase to phosphatase ratio, the amount of fully-phosphorylated species increases so that the response may increase in a gradual manner, in contrast to the situation generated by a switch³³. In this perspective, phosphorylations at S361 and T363 might have a biological relevance during certain cell regulation processes. It was also shown that an ordered phosphorylation affecting many sites in theory leads to steeper response curves than random phosphorylation³⁴. This is indeed observed here for PTEN CK2-sites S380-S385 compared to S370.

Functional role of each cluster. So far, phosphorylation within the S380-S385 cluster was shown to stabilize PTEN and to reduce its catalytic activity^{5,6}. On the contrary, the function of phosphorylation of S370 and T366 is still unclear. T366 was found phosphorylated *in vivo* but to a lower extent than S370 and S385⁹. On one hand, phosphorylation of T366 by GSK3 β was reported to lead to PTEN destabilization¹⁶, to promote its tumor suppressor function and to reduce its activity in 293T cells¹². On the other hand, Xu *et al.* have shown more recently that another kinase, Plk3, phosphorylates both S370 and T366 *in vitro* and in murine embryonic fibroblasts and that Plk3-mediated phosphorylation is associated with PTEN stabilization and increase of PTEN activity¹³. Very recently, Tibarewal *et al.* showed that PTEN dephosphorylates its C-terminal tail at T366, and that this auto-phosphatase activity increases its lipid phosphatase activity sufficiently to inhibit cell invasion in glioblastoma cell lines³⁵. Taken together, these functional studies highlight distinct functional roles for the phosphorylation events within the two clusters that might be cell-/stimulus-dependent (Figure 5). Our findings of two cascades occurring independently, on different timescales and triggered by modifications of S385 and S370 respectively suggest that these events may function as two delay timers activating different (or time-delayed) regulatory responses.

Additional kinases. Due to their position upstream of the cascade, S370 and S385 appear as “major” phosphorylation sites, as suggested previously *in vitro* and *in vivo*^{6,9,36}. It was even proposed that S370 and S385 are constitutively phosphorylated and may serve as priming additional phosphorylation events, whereas S380, T382 and T383 may be regulated by a balance between kinases and phosphatases, thereby controlling PTEN stability and activity^{5,7,36}. CK2 and GSK3 β were initially reported as the dominant kinases phosphorylating PTEN, but other kinases are also implicated, such as MAST family¹⁴, LKB1¹⁵, CK1¹² and Plk3¹³. Our observation of new phosphorylated species in the cellular extracts as compared to *in vitro* suggests indeed the contribution of at least one additional kinase acting in particular on T383. The functional importance of this residue has been highlighted in several studies. The phosphorylation state of T383 was shown to control the activity of PTEN in a

manner independent of its lipid phosphatase activity³⁷: PTEN was suggested to dephosphorylate itself on T383³⁷ and LKB1 to be a kinase able to phosphorylate T383 *in vitro*¹⁵.

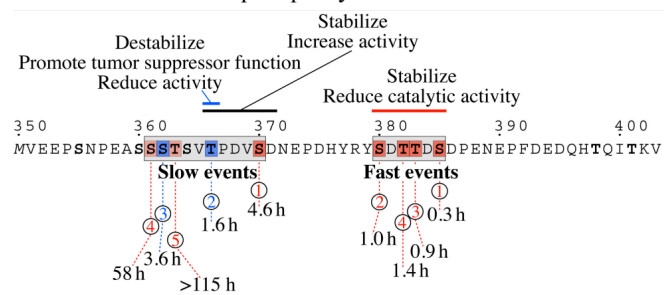


Figure 5. Two independent cascades of ordered phosphorylations at the PTEN-Ctail. All Ser and Thr residues are shown in bold. The phosphorylated Ser/Thr (detected in this study *in vitro* or in cell extracts) are boxed and ordered according to their order of apparition within each cluster (CK2 in red, potentially CK2 in light red and GSK3 β in blue). The half-life time (\log_2/k_{app}) of each event inferred from the *in vitro* experiments is indicated. Grey boxes underline the two independent cascades. The functional role of certain phosphorylation is indicated at the top (see text).

Advantages of high-resolution NMR spectroscopy. An increasing number of essential proteins appears to display disordered regulatory sequences encompassing stretches of potentially phosphorylated residues, such as PTEN. NMR appears then as a technique of choice to study such complex multi-site phosphorylation patterns. Besides its advantages for the unambiguous detection of phosphorylated residues, we show here that NMR further allows deciphering in a time-dependent manner the mechanism of multi-site protein phosphorylation, even for adjacent or closely spaced substrate residues. The property and sensitivity of the NMR resonance signal allows (i) detecting the kinase-released intermediate species in a distributive mechanism, (ii) following their transient formation in the time course of the reaction and (iii) extracting an apparent rate constant for each step. In the light of the numerous analytical studies on phosphorylation mechanisms^{33,38,39}, such an experimental approach appears promising to explore the highly dynamical nature of phosphorylation processes in more physiological conditions. In spite of being a biased *ex-cellulo* system, NMR experiments performed in cell extracts (combined with *in vitro* experiments) constitute a first step towards investigating the cooperative role of kinases and phosphatases in intact cellular systems by in-cell NMR using cell-penetrating substrate derivative constructs. Finally, these results bring an unprecedented temporal dimension on the analysis of PTEN phosphorylation cascade. It will certainly shed new light on its role in finely timing cellular events.

MATERIALS and METHODS

PTEN-Ctail expression and purification. Recombinant U-¹⁵N/¹³C-labeled PTEN-Ctail (encompassing residues V351-V403 of human PTEN) was produced in *E. coli* as described in the Supporting Information.

Mass spectrometry. SELDI-TOF-MS was performed as described in the Supporting Information.

***In vitro* CK2- and GSK3 β -phosphorylation assays by NMR.** A NMR sample containing 250 μ l of U-¹⁵N/¹³C-labeled PTEN-Ctail was prepared at 120 μ M and the pH was adjusted

to 6.7. All the NMR experiments were carried out at 25°C on a Varian Inova 600-MHz spectrometer equipped with a cryoprobe. Standard 3D triple resonance NMR experiments were recorded for backbone resonance assignment of the unphosphorylated form. Phosphorylation of PTEN-Ctail by CK2 kinase was monitored by adding to the PTEN-Ctail sample 1 µl of 0.1 mg/ml (8 nM) unlabeled CK2 kinase, 2 mM ATP and 10 mM MgCl₂-containing kinase buffer. A series of ¹H-¹⁵N HSQC was regularly recorded until the CK2 reaction stopped (after 21 hours) and a set of 3D experiments was recorded for resonance assignment of the CK2-phosphorylated PTEN-Ctail. Phosphorylation by GSK3β was assayed by adding to the previous sample 5 µl of 0.1 mg/ml (39 nM) unlabeled GSK3β kinase and a series of ¹H-¹⁵N HSQC was again regularly recorded while the GSK3β reaction proceeded. After 9 hours, a set of 3D experiments was recorded for resonance assignment of the CK2- and GSK3β-phosphorylated PTEN-Ctail. In between each 3D experiments, ¹H-¹⁵N HSQC were continuously recorded until 140 hours. Finally, reaction by CK2 and GSK3β was similarly monitored on a comparable sample but after simultaneous addition of 8 nM of CK2 and 39 nM of GSK3β. Data processing and analysis was carried out using NMRPipe⁴⁰ and NMRView⁴¹.

Fitting procedure. From the series of HSQC, the resonance amplitudes (volumes) were measured for each residue in each phosphorylated species as a function of time. For each residue, amplitude normalization was achieved using a residue-specific normalization constant A_0 , so that the sum of the amplitudes of the different phosphorylated states of this residue equals 1 (for instance, for residue n of the S380-S385 cluster, so that $(A_n+B_n+C_n+D_n+E_n) = A_{0,n} = 1$). First, for each peak representative of species A, an apparent rate constant $k_{app,1}$ was extracted by non-linear least square fitting of its amplitudes A (weighted by the rms of the noise in the corresponding spectrum) to equation (1a) of Supporting Information, using a simplex or Levenberg-Marquardt algorithm. Value of $k_{app,1}$ was derived from the average and standard deviation from these individual fits. Second, fixing $k_{app,1}$ to this value, $k_{app,2}$ was similarly extracted from the average and standard deviation over individual fits of each series of amplitudes B to equation (1b). A two-floating parameter fit of both $k_{app,1}$ and $k_{app,2}$ led to very similar results. Third, fixing $k_{app,1}$ and $k_{app,2}$ to the preceding values, $k_{app,3}$ was extracted from the average and standard deviation over individual fits of each series of amplitudes C to equation (1c), also leading to similar values as extracted from a three-floating parameter fit of $k_{app,1}$, $k_{app,2}$ and $k_{app,3}$. Fourth, fixing $k_{app,1}$, $k_{app,2}$ and $k_{app,3}$ to the preceding values, $k_{app,4}$ was extracted from the average and standard deviation over individual fits of each series of amplitudes D to equation (1d) and, fifth, of each series of amplitudes E to equation (1e). In the HSQC spectra, when resonances belonging to a same residue were entirely or partially overlapped in several species (e.g., T383^U(A+B) or R378(C+D+E)), the global volume was considered and the fit was performed to the corresponding sum of equations ((1a)+(1b) or (1c)+(1d)+(1e), respectively). Being aware that some combinations such as (1c)+(1d)+(1e) = 1-(1a)-(1b) are dependent on $k_{app,1}$ and $k_{app,2}$ only, fitting such overlapped resonances led to very similar apparent rate constants for these two parameters. Such considerations can be helpful for proteins concerned by severe spectral overlapping. Finally, $k_{app,1}$, $k_{app,2}$, $k_{app,3}$ and $k_{app,4}$ were extracted from a global fit of the average amplitudes A to E to equations (1a) to (1e), and standard errors were estimated from Monte Carlo

simulations, leading to very similar values as the independent fit of each species. All the values of the apparent rate constants are given in Supporting Table S1 for the cluster S380-S385. For the cluster S361-T366, a similar procedure was performed, except that $k'_{app,1}$ (for T366) was first extracted from a fit to single exponential functions (see text). Then, for $k'_{app,2}$, $k'_{app,3}$ and $k'_{app,4}$, although the reaction is not complete, the average amplitudes $A'+B'$, C' and D' were fitted independently to their corresponding equations (1a)+(1b), (1c) and (1d), respectively, with a floating normalization parameter A_0 for each species (see Supporting Table S3).

Phosphorylation assays in neuroblastoma cell extracts by NMR. Extracts of human neuroblastoma SH-SY5Y cells²⁷ were prepared as described in the Supporting Information. From 10⁸ differentiated cells, a total protein concentration of 12 to 15 mg/ml was quantified in the cell extracts. A NMR sample of PTEN-Ctail in neuroblastoma cell extracts was prepared by adding 25 µl of U-¹⁵N/¹³C-labeled PTEN-Ctail stock solution, 10% D₂O, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂-containing kinase buffer and 15 mM ATP to 170 µl of cell extracts. The total volume was 300 µl, leading to a final PTEN-Ctail concentration of 50 µM. The pH was kept at 7.5, close to physiological conditions. The extract sample was rapidly transferred into a Shigemi NMR microtube for NMR measurements at 25°C. A series of ¹H-¹⁵N HSQC (3 to 6 h acquisition time) was regularly recorded until no more modifications could be observed in the spectra (30 hours).

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information.

Details on PTEN-Ctail expression and purification, SELDI-TOF-MS experiments, *in vitro* phosphorylation assay by NMR, preparation of neuroblastoma cell extracts and on numerical simulations of the sequential enzymatic chain reaction; Equations of the linear 5-state model; Figures of chemical shift differences between unphosphorylated and phosphorylated PTEN-Ctail, Mass spectrometry profiles, Immunoblots and numerical simulations; Detailed tables of the apparent rate constants. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Contact information for the author to whom correspondence should be addressed: florence.cordier@pasteur.fr

Present Addresses

†Present address: Department of NMR assisted (FMP Berlin), 13125 Berlin, Germany.

Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CNRS and grants from the Institut Pasteur, Agence Nationale pour la Recherche (PATHO-PDZ) and Institut Carnot Pasteur Maladies Infectieuses (NeuroVita). E.T. is a recipient of fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Fondation pour la Recherche Médicale. We thank N. Kellersohn

for valuable discussions and J. D'Alayer for help with mass spectrometry experiments.

ABBREVIATIONS

PTEN, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; CK2, casein kinase 2; GSK3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; HSQC, heteronuclear single quantum correlation;

REFERENCES

- (1) Salmena, L.; Carracedo, A.; Pandolfi, P. P. *Cell* 2008, 133, 403-14.
- (2) Park, K. K.; Liu, K.; Hu, Y.; Smith, P. D.; Wang, C.; Cai, B.; Xu, B.; Connolly, L.; Kramvis, I.; Sahin, M.; He, Z. *Science* 2008, 322, 963-6.
- (3) Gericke, A.; Munson, M.; Ross, A. H. *Gene* 2006, 374, 1-9.
- (4) Leslie, N. R.; Batty, I. H.; Maccario, H.; Davidson, L.; Downes, C. P. *Oncogene* 2008, 27, 5464-76.
- (5) Vazquez, F.; Ramaswamy, S.; Nakamura, N.; Sellers, W. R. *Mol Cell Biol* 2000, 20, 5010-8.
- (6) Torres, J.; Pulido, R. *J Biol Chem* 2001, 276, 993-8.
- (7) Tolkacheva, T.; Boddapati, M.; Sanfiz, A.; Tsuchida, K.; Kimmelman, A. C.; Chan, A. M. *Cancer Res* 2001, 61, 4985-9.
- (8) Vazquez, F.; Grossman, S. R.; Takahashi, Y.; Rokas, M. V.; Nakamura, N.; Sellers, W. R. *J Biol Chem* 2001, 276, 48627-30.
- (9) Miller, S. J.; Lou, D. Y.; Seldin, D. C.; Lane, W. S.; Neel, B. G. *FEBS Lett* 2002, 528, 145-53.
- (10) Das, S.; Dixon, J. E.; Cho, W. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 7491-6.
- (11) Vazquez, F.; Matsuoka, S.; Sellers, W. R.; Yanagida, T.; Ueda, M.; Devreotes, P. N. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 3633-8.
- (12) Al-Khouri, A. M.; Ma, Y.; Togo, S. H.; Williams, S.; Mustelin, T. *J Biol Chem* 2005, 280, 35195-202.
- (13) Xu, D.; Yao, Y.; Jiang, X.; Lu, L.; Dai, W. *J Biol Chem* 2010, 285, 39935-42.
- (14) Valiente, M.; Andres-Pons, A.; Gomar, B.; Torres, J.; Gil, A.; Tapparel, C.; Antonarakis, S. E.; Pulido, R. *J Biol Chem* 2005, 280, 28936-43.
- (15) Mehenni, H.; Lin-Marq, N.; Buchet-Poyau, K.; Reymond, A.; Collart, M. A.; Picard, D.; Antonarakis, S. E. *Hum Mol Genet* 2005, 14, 2209-19.
- (16) Maccario, H.; Perera, N. M.; Davidson, L.; Downes, C. P.; Leslie, N. R. *Biochem J* 2007, 405, 439-44.
- (17) Salih, E. *Mass Spectrom Rev* 2005, 24, 828-46.
- (18) Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnäd, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P.; Mann, M. *Cell* 2006, 127, 635-48.
- (19) Landrieu, I.; Lacosse, L.; Leroy, A.; Wieruszski, J. M.; Trivelli, X.; Sillen, A.; Sibille, N.; Schwalbe, H.; Saxena, K.; Langer, T.; Lippens, G. *J Am Chem Soc* 2006, 128, 3575-83.
- (20) Selenko, P.; Frueh, D. P.; Elsaesser, S. J.; Haas, W.; Gygi, S. P.; Wagner, G. *Nat Struct Mol Biol* 2008, 15, 321-9.
- (21) Leroy, A.; Landrieu, I.; Huvent, I.; Legrand, D.; Codeville, B.; Wieruszski, J. M.; Lippens, G. *J Biol Chem* 2010, 285, 33435-44.
- (22) Liokatis, S.; Dose, A.; Schwarzer, D.; Selenko, P. *J Am Chem Soc* 2010, 132, 14704-5.
- (23) Pinna, L. A. *J Cell Sci* 2002, 115, 3873-8.
- (24) Frame, S.; Cohen, P. *Biochem J* 2001, 359, 1-16.
- (25) Frame, S.; Cohen, P.; Biondi, R. M. *Mol Cell* 2001, 7, 1321-7.
- (26) Prehaud, C.; Wolff, N.; Terrien, E.; Lafage, M.; Megret, F.; Babault, N.; Cordier, F.; Tan, G. S.; Maitrepierre, E.; Menager, P.; Chopy, D.; Hoos, S.; England, P.; Delepierre, M.; Schnell, M. J.; Buc, H.; Lafon, M. *Sci Signal* 2010, 3, ra5.
- (27) Loh, S. H. Y.; Francescut, L.; Lingor, P.; Bahr, M.; Nicotera, P. *Cell Death and Differentiation* 2008, 15, 283-298.
- (28) Sarno, S.; Vaglio, P.; Cesaro, L.; Marin, O.; Pinna, L. A. *Mol Cell Biochem* 1999, 191, 13-9.
- (29) Patwardhan, P.; Miller, W. T. *Cell Signal* 2007, 19, 2218-26.
- (30) Ferrell, J. E., Jr. *Trends Biochem Sci* 1996, 21, 460-6.
- (31) Ferrell, J. E., Jr.; Machleder, E. M. *Science* 1998, 280, 895-8.
- (32) Nash, P.; Tang, X.; Orlicky, S.; Chen, Q.; Gertler, F. B.; Mendenhall, M. D.; Sicheri, F.; Pawson, T.; Tyers, M. *Nature* 2001, 414, 514-21.
- (33) Gunawardena, J. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102, 14617-22.
- (34) Salazar, C.; Hofer, T. *FEBS J* 2007, 274, 1046-61.
- (35) Tibarewal, P.; Zilidis, G.; Spinelli, L.; Schurch, N.; Maccario, H.; Gray, A.; Perera, N. M.; Davidson, L.; Barton, G. J.; Leslie, N. R. *Sci Signal* 2012, 5, ra18.
- (36) Odriozola, L.; Singh, G.; Hoang, T.; Chan, A. M. *J Biol Chem* 2007, 282, 23306-15.
- (37) Raftopoulou, M.; Etienne-Manneville, S.; Self, A.; Nicholls, S.; Hall, A. *Science* 2004, 303, 1179-81.
- (38) Salazar, C.; Hofer, T. *FEBS J* 2009, 276, 3177-98.
- (39) Salazar, C.; Brummer, A.; Alberghina, L.; Hofer, T. *Trends Cell Biol* 2010, 20, 634-41.
- (40) Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. *J Biomol Nmr* 1995, 6, 277-93.
- (41) Johnson, B. a.; Blevins, R. a. *J Biomol Nmr* 1994, 4, 603-614.

Distributive mechanism of ordered phosphorylations in two independent cascades of the PTEN C-tail revealed by NMR

Florence Cordier^{1,2,*}, Alain Chaffotte^{1,2}, Elouan Terrien^{1,2,3}, Christophe Préhaud^{4,5}, François-Xavier Theillet^{1,2,†}, Muriel Delepierre^{1,2}, Monique Lafon^{4,5}, Henri Buc⁶ & Nicolas Wolff^{1,2}

¹ Institut Pasteur, Unité de Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules, Département de Biologie Structurale et Chimie, F-75015 Paris, France

² CNRS, UMR3528, F-75015 Paris, France

³ Univ. Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

⁴ Institut Pasteur, Unité de Neuroimmunologie Virale, Département de Virologie, F-75015 Paris, France

⁵ CNRS, URA3015, F-75015 Paris, France

⁶ Institut Pasteur, F-75015 Paris, France

Supporting Information

Materials and Methods

PTEN-Ctail expression and purification.

Recombinant unlabeled and U-¹⁵N/¹³C-labeled C-terminal tail of PTEN (PTEN-Ctail, 54 residues including residues V351-V403 of human PTEN and a N-terminus non-native Met resulting from cloning) were produced as follow (1): PTEN-Ctail was encoded as a N-terminal Glutathione S-Transferase (GST) tagged protein in a pDEST15 expression plasmid (Gateway System, Invitrogen). The vector was used to transform *Escherichia coli* BL21 (DE3) star (Invitrogen). Cells were grown in a 2.5 l bioreactor of LB medium for unlabeled PTEN-Ctail and of stable-isotopically labeled M9 minimal medium containing 1.0 g/l ¹⁵NH₄Cl and 2.0 g/l ¹³C-glucose as the sole nitrogen and carbon sources for U-¹⁵N/¹³C-labeled PTEN-Ctail. Protein expression was induced at OD_{600nm} 0.8 – 1.0 with 1.0 mM IPTG at 30°C for 3 h. Harvested cells were resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, 150 mM

NaCl, pH 7.5) with 2 mM β -mercaptoethanol and a protease inhibitor cocktail (Roche) and then disrupted in a French press. Clarified cell lysate was then loaded on a GST column (GSTrap HP, GE) equilibrated with buffer A. The tag-GST was cleaved by the TEV protease (1% M/M) directly injected on the column overnight at 4°C. The samples containing the PTEN-Ctail were pooled and concentrated to 1.0 ml and loaded onto a size exclusion column (Sephacryl S-100 HP 16/60, GE) equilibrated with buffer A. All purification steps were performed at +4°C and in presence of a protease inhibitor cocktail (Roche). Size, purity and sequence of the PTEN-Ctail samples were checked by SDS-Page, mass spectroscopy and microsequencing using Edman degradation. U-¹⁵N/¹³C-labeled PTEN-Ctail was concentrated with a Vivaspin 6 centrifugal filter device (3 000 MWCO, Sartorius). Protein concentration was estimated from its absorbance at 280 nm assuming a calculated ϵ_{280} of 2980 M⁻¹.cm⁻¹.

For the NMR experiment, a stock solution of U-¹⁵N/¹³C-labeled PTEN-Ctail was prepared at a concentration of 600 μ M, in a solution containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 90% H₂O and 10% D₂O.

SELDI-TOF-MS experiments.

PTEN-Ctail (unlabeled) was incubated with CK2 kinase, 2 mM ATP and 10 mM MgCl₂-containing kinase buffer. The CK2 kinase reaction was stopped at 100°C for 10 min and the samples were analyzed using the SELDI-TOF-MS technology. Several concentrations of PTEN-Ctail (from 10 to 30 μ M) and CK2 kinase (from 3 to 20 nM) as well as times of phosphorylation reaction (from 5 min to 4 hours) were tested at 30°C and 37°C in order to set up the phosphorylation conditions for the NMR experiments. 5 μ l of Gallium nitrate (50 mM) were applied twice on each spot of the immobilized metal affinity chromatography 30 (Imac 30) chemical surface (BIO-RAD) under shaking, wet air and at room temperature. Then, 5 μ l

of binding buffer were added on each spot for 1 hour under the same conditions. PTEN-Ctail sample was diluted in binding buffer and 1200 fmoles of peptides were spotted on each spot from Imac 30. Samples were incubated for 60 min at room temperature under shaking. Then, the chip was washed: three times with the binding buffer, and four times in water. The samples were air-dried. 0.7 μ l of α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) saturated was diluted in 50% acetonitrile – 0.5% trifluoroacetic acid and was applied twice on each spot and the spots were air-dried. Spectra were generated with 7 shots at an intensity of 1600 nJ and a focus mass at 6500 Da (SELDI-TOF pcs4000 model). External mass calibration curve was performed on one spot of each array by using Human ACTH (1-24), Bovine Insulin B-chain, Human Insulin and recombinant Hirudin. Raw spectra were processed and analyzed with the Ciphergen Express data manager software version 3.0 (CE; Ciphergen Biosystems). Spectra were externally calibrated with Human ACTH (2933.5 + 1H), Bovine Insulin B-chain (3495.9 + 1H), Human Insuline (5807.7 + 1H) and recombinant Hirudin (6963.5 + 1H). The baseline was established using default parameters and spectral intensities were normalized by total ion current (TIC).

In vitro CK2- and GSK3 β -phosphorylation assays by NMR spectroscopy.

For the *in vitro* experiment, the pH of the NMR sample (Shigemi NMR microtubes) of U-¹⁵N/¹³C-labeled PTEN-Ctail was adjusted to 6.7, since resonance intensities of Ser and Thr residues of interest were severely weakened at pH above 6.7, due to extensive amide proton exchange with solvent.

The commercially available unlabeled CK2 kinase was purchased from Merck Millipore (Casein kinase 2 α , active; MW 48.7 kDa, purity > 95%, Catalog #14-445) with a given specific activity of 1310 pmol/min/ μ g on a model substrate peptide. The commercially

available unlabeled GSK3 β kinase was purchased from Merck Millipore (GSK3 β , active; MW 51 kDa, purity 97%, Catalog #14-306) with a given specific activity of 881 pmol/min/ μ g on a model substrate peptide. The MgCl₂-containing kinase buffer was purchased from Cell Signaling Technology (Catalog #9802) and contained 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM β -glycerophosphate, 2 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 10 mM MgCl₂.

The series of ¹H-¹⁵N HSQC recorded in the time course of the CK2 or GSK3 β reaction were acquired for acquisition times increasing from 6 min (at the beginning of the reaction) to 90 min (at the end). After about 120 hours of GSK3 β reaction, the pH of the sample started to decrease, likely due to ATP hydrolysis, inducing overall resonance shifts in the HSQC spectra.

Preparation of human neuroblastoma cell extracts for NMR experiments.

SH-SY5Y human neuroblastoma cells were grown as described in (2). Cells were differentiated with 10 mM db-cAMP as described by (3). Cellular extracts were made 48 hours post drug treatment. Briefly, 10⁸ cells were harvested and rinsed with PBS (Life Technologies, U.K.). The cell pellet was resuspended in 0.4 ml of lysis buffer [Complete lysis buffer (pH 7.5, Cell signaling, #9803), 2X complete Roche anti-proteases (#11697498001), 2X Roche phostop (#4906845001)], kept on ice for 15 min with gentle shaking every 2 min, then centrifuged at 13 000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was treated with benzonase and incubated further at 4°C for 15 min. The cell lysate was centrifuged at 13 000g for 10 min at 4°C. The supernatant was aliquoted in 50 μ l fractions and deep frozen in liquid nitrogen. Protein concentration (12 to 15 mg/ml) was determined by micro BCA (Pierce, USA).

Western blotting.

Cell extracts from SH-SY5Y human neuroblastoma was subjected to electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to a PVDF membrane, and immunoblotted with CK2 α Rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling, #2656) and GSK3 β rabbit monoclonal antibody (Cell signaling, #9315) using Rabbit TrueBlot®: Anti-Rabbit IgG HRP (eBioscience, #18-8816). Blots were prepared using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Exposure time was 5 minutes. Primary and secondary antibodies were diluted (1:1000 and 1:3000, respectively) in PBS (Phosphate Buffered Saline) buffer containing 2% BSA and 0.1% Tween 20.

Numerical simulation of the dynamic process of phosphorylation in the S380-S385 cluster.

In order to evaluate the dependence of the $k_{app,i}$ on the initial concentrations of substrate and enzyme, we generated simulations of the time distribution of the concentration of all species, based on the more realistic reaction scheme shown in panel A of Figure S4. According to this still simplified enzymatic mechanism, the enzyme CK2 is assumed to process each phosphorylation step through a standard minimum enzymatic reaction, that is, the reversible formation of the enzyme/substrate complex, governed by the intrinsic rate constant k_i and k_{-i} , followed by an irreversible dissociation of this complex towards the product of the reaction depending on the catalytic rate constant $k_{cat,i}$. Due to the large excess of ATP (2 mM) and its moderate consumption, the binding of this second substrate as well as the release of ADP are omitted in this scheme. According to the simple 2-step enzyme substrate reaction, the Michaelis-Menten approximation predicts a steady state for the enzyme-substrate intermediate, that is a 0 order reaction (linear time-decay of the substrate

concentration) as long as the dissociation of the intermediate complex towards the product is the rate limiting step of the reaction. As the substrate is consumed, the steady state tends to end up for the benefit of a continuous succession of pseudo-first order reactions, with a minor time-dependence of the instantaneous rate constant. The duration of the steady state along the time course of the reaction depends on the value of $k_{\text{cat},i}$ relative to the product of k_i by the substrate concentration. In the case of the reaction of PTEN-Ctail with CK2, the time distribution of our experimental data could be satisfactorily fitted to multiexponential equations for any step, which indicates a short-term steady state situation.

The commercial program VisSim 3.0 (Visual Solutions, Westford, MA) was used to simulate the time course of the concentrations of substrate and product of each reaction, S to P4, by numerical integration of the differential equations describing the kinetic mechanism, using the 5th order Runge-Kutta method ($1.08 \cdot 10^6$ steps; step size 0.05). Starting from our experimental conditions (initial substrate concentration $[S]_0$ of 120 μM and total enzyme concentration $[E]_0$ of 8 nM), the 12 parameters k_i , k_{-i} and $k_{\text{cat},i}$ were manually optimized to reproduce at best the variation upon time of species A to E measured experimentally. With the rate constants k_{-i} arbitrary set to 1 s^{-1} , the following set of constants was retained (see Figure S4, panel B):

$$\begin{array}{lll}
 k_1 = 0.1 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1} & k_{-1} = 1 \text{ s}^{-1} & k_{\text{cat},1} = 20 \text{ s}^{-1} \\
 k_2 = 0.035 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1} & k_{-2} = 1 \text{ s}^{-1} & k_{\text{cat},2} = 20 \text{ s}^{-1} \\
 k_3 = 0.042 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1} & k_{-3} = 1 \text{ s}^{-1} & k_{\text{cat},3} = 8 \text{ s}^{-1} \\
 k_4 = 0.03 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1} & k_{-4} = 1 \text{ s}^{-1} & k_{\text{cat},4} = 3 \text{ s}^{-1}
 \end{array}$$

Using this set of intrinsic rate constants, we then examined the effect of changing $[S]_0$ and $[E]_0$ on the kinetics of each of the species S, P1, P2, P3 and P4. Then, from a global fitting of the time course of these species to equations (1a) to (1e) given below, we deduced the

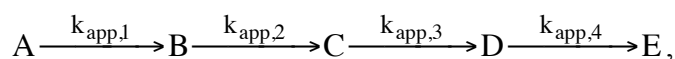
apparent rate constant $k_{app,i}$ associated to each step of substrate to product conversion, as we did with our experimental NMR data.

As shown in panel C of Figure S4, at constant $[E]_0$ (8 nM), decreasing $[S]_0$ from 120 to 50 μ M results in a slight increase (about 20%) of each apparent rate constant. The ratios between apparent rate constants are independent on $[S]_0$ indicating that a change of the initial substrate concentration in the cell extracts should only have a global scaling effect on the apparent rate constants determined *in vitro*.

As shown in panel D of Figure S4, at constant $[S]_0$, increasing $[E]_0$ results in a speeding up the kinetics. The variation of the apparent rate constants with $[E]_0$ is linear, as intuitively expected, indicating that a change of the enzyme concentration has only a global scaling effect on the apparent rate constants.

Equations of the linear 5-state model

According to the linear 5-state model:



the time course of the disappearance/appearance of each phosphorylated species A to E in the S380-S385 cluster (called species A' to E' in the S361-T366 cluster) is given by the following equations:

$$A = A_0 \exp^{-k_{app,1}t} \quad (1a)$$

$$B = A_0 \left\{ \frac{-k_{app,1}}{k_{app,1} - k_{app,2}} \exp^{-k_{app,1}t} - \frac{-k_{app,1}}{k_{app,2} - k_{app,1}} \exp^{-k_{app,2}t} \right\} \quad (1b)$$

$$C = A_0 \left\{ \frac{k_{app,1}k_{app,2}}{(k_{app,1} - k_{app,2})(k_{app,1} - k_{app,3})} \exp^{-k_{app,1}t} + \frac{k_{app,1}k_{app,2}}{(k_{app,2} - k_{app,1})(k_{app,2} - k_{app,3})} \exp^{-k_{app,2}t} + \frac{k_{app,1}k_{app,2}}{(k_{app,3} - k_{app,1})(k_{app,3} - k_{app,2})} \exp^{-k_{app,3}t} \right\} \quad (1c)$$

$$D = A_0 k_{app,1} k_{app,2} k_{app,3} \left\{ \frac{-\exp^{-k_{app,1}t}}{(k_{app,1} - k_{app,2})(k_{app,1} - k_{app,3})(k_{app,1} - k_{app,4})} - \frac{\exp^{-k_{app,2}t}}{(k_{app,2} - k_{app,1})(k_{app,2} - k_{app,3})(k_{app,2} - k_{app,4})} \right. \\ \left. - \frac{\exp^{-k_{app,3}t}}{(k_{app,3} - k_{app,1})(k_{app,3} - k_{app,2})(k_{app,3} - k_{app,4})} - \frac{\exp^{-k_{app,4}t}}{(k_{app,4} - k_{app,1})(k_{app,4} - k_{app,2})(k_{app,4} - k_{app,3})} \right\} \quad (1d)$$

$$E = A_0 \left\{ \frac{k_{app,2} k_{app,3} k_{app,4}}{(k_{app,1} - k_{app,2})(k_{app,1} - k_{app,3})(k_{app,1} - k_{app,4})} \exp^{-k_{app,1}t} + \frac{k_{app,1} k_{app,3} k_{app,4}}{(k_{app,2} - k_{app,1})(k_{app,2} - k_{app,3})(k_{app,2} - k_{app,4})} \exp^{-k_{app,2}t} \right. \\ \left. + \frac{k_{app,1} k_{app,2} k_{app,4}}{(k_{app,3} - k_{app,1})(k_{app,3} - k_{app,2})(k_{app,3} - k_{app,4})} \exp^{-k_{app,3}t} + \frac{k_{app,1} k_{app,2} k_{app,3}}{(k_{app,4} - k_{app,1})(k_{app,4} - k_{app,2})(k_{app,4} - k_{app,3})} \exp^{-k_{app,4}t} + 1 \right\} \quad (1e)$$

where A , B , C , D , E (called A' , B' , C' , D' , E' for the S361-T366 cluster) are the resonance amplitudes of residues in each species, with $A_0 = A+B+C+D+E$ and $k_{app,1}$, $k_{app,2}$, $k_{app,3}$ and $k_{app,4}$ are the apparent rate constants of the S385, S380, T383 and T382 phosphorylation events, respectively (called $k'_{app,1}$, $k'_{app,2}$, $k'_{app,3}$ and $k'_{app,4}$ for T366, S362, S361 and T363, respectively). Each apparent rate constant depends on the rates for reversible enzyme binding and for catalysis and product dissociation, and is specific for a given concentration of substrate and kinase.

Figures

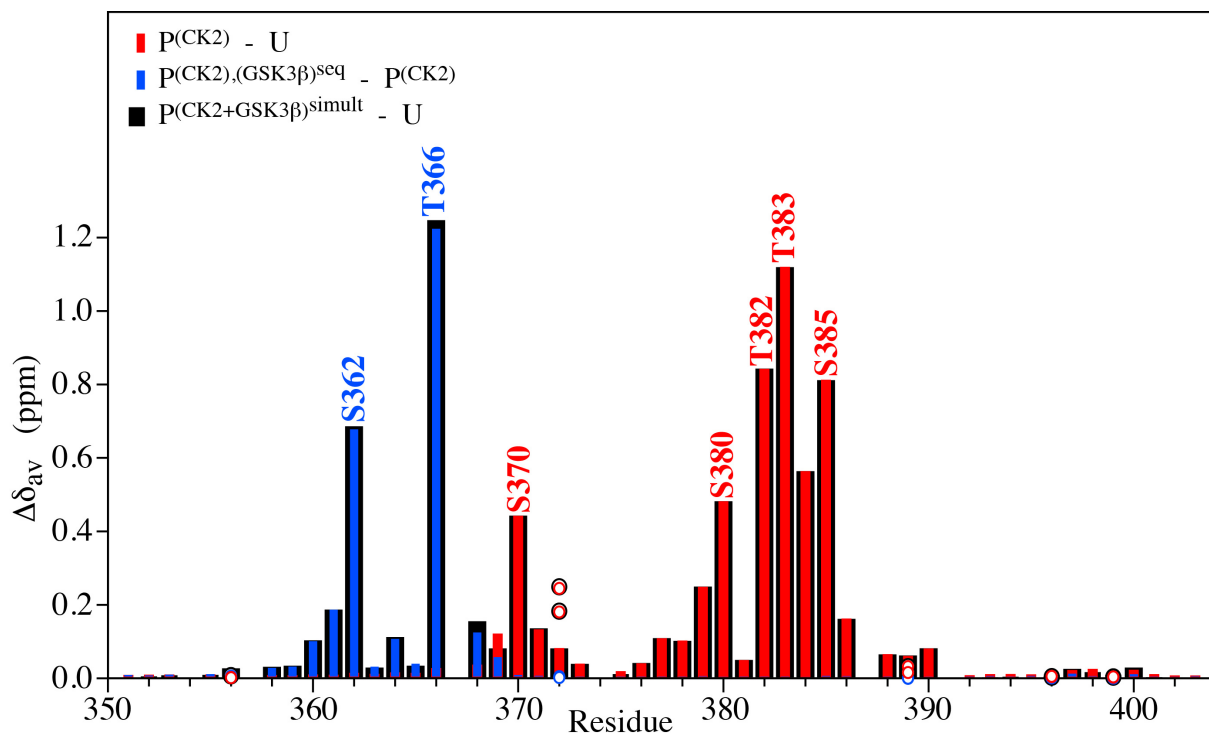


Figure S1. Phosphorylation-induced NMR chemical shift perturbations. Average (^1H , ^{15}N) chemical shift changes, calculated as $\Delta\delta_{av} = [(\Delta\delta_{\text{H}})^2 + (\Delta\delta_{\text{N}} \times 0.159)^2]^{1/2}$, induced upon sequential phosphorylation by CK2 after 21 h (red, CK2-phosphorylated to unphosphorylated) and by GSK3 β after 9 h (blue, sequentially CK2- and GSK3 β -phosphorylated to CK2-phosphorylated) or by simultaneous phosphorylation by the two kinases (black, simultaneous CK2- and GSK3 β -phosphorylated to unphosphorylated). Open circles correspond to NH₂ groups of Asn and Gln residues. ^1H and ^{15}N chemical shifts of Ser/Thr residues phosphorylated by CK2 and GSK3 β (labeled in red and blue respectively) are the most affected. Chemical shifts can be sensitive to phosphorylation-induced changes in the neighborhood of a phosphorylated residue up to $n \pm 5$.

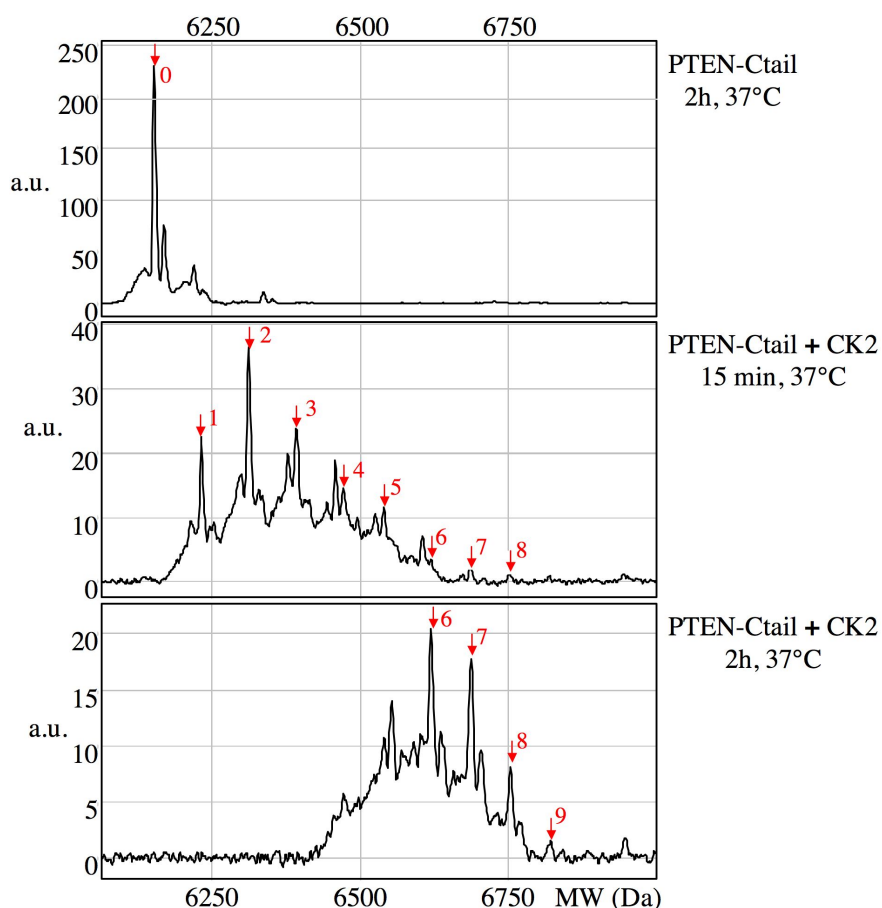


Figure S2. SELDI-TOF-mass spectrometry profiles of PTEN-Ctail phosphorylated by CK2 kinase. PTEN-Ctail (12 μ M) was incubated with 6 nM of CK2 kinase, 2 mM ATP and 10 mM $MgCl_2$ -containing kinase buffer at 37°C. As control, PTEN-Ctail was monitored after 2 hours at 37°C in the absence of kinase (upper panel). In the presence of CK2, aliquot were removed at 15 min (middle panel) and 2 hours (lower panel) after the beginning of the phosphorylation reaction. The CK2-reaction was stopped and the samples were analyzed using the SELDI-TOF-MS technology. Peaks matching the molecular weight of PTEN-Ctail and of its phosphorylated forms are indicated by arrows on the spectra. Nine phosphorylations of PTEN-Ctail were observed 2 hours after the CK2 addition in our experimental conditions.

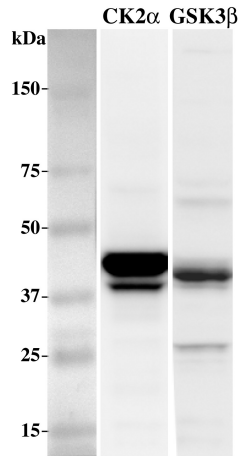


Figure S3. Western Blot. Immunoblots revealing the presence of endogenous CK2 α (45 kDa) and GSK3 β (47 kDa) kinases in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell extracts.

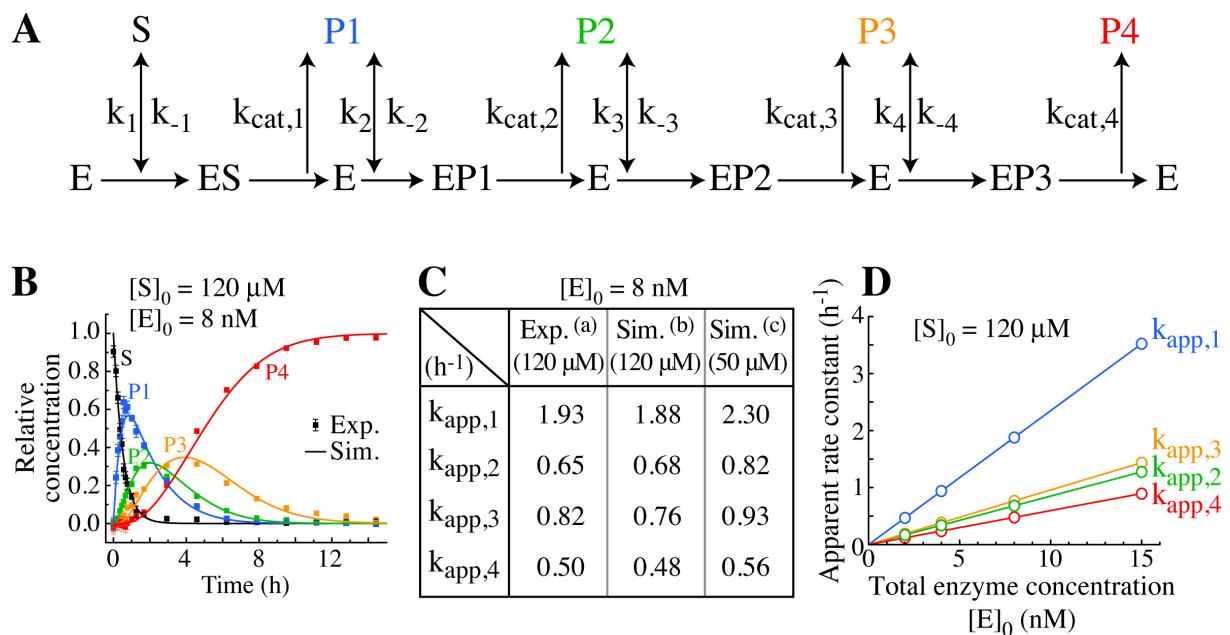


Figure S4. Simulation of the dynamical process of phosphorylation in the S380-S385 cluster. (A). Sequential oversimplified enzymatic reaction model in the S380-S385 cluster. E is the enzyme, S is the unphosphorylated substrate, P1, P2 and P3 are the three released intermediate products with 1, 2 and 3 phosphorylated sites and P4 is the fully phosphorylated product (S, P1 to P4 correspond to species A, B to E in our model described by equation (1) of the manuscript). ES, EP1 to EP3 are the enzyme/substrate complexes transiently formed

during the chain reaction. k_i and k_{-i} are the rates for reversible enzyme binding and $k_{cat,i}$ the constant characterizing the overall process leading to catalysis and to dissociation of the phosphorylated product from the enzyme. The sum of the concentrations of substrate in its different states is assumed constant though the reaction, so that $[S]+[P1]+[P2]+[P3]+[P4] = [S]_0$, $[S]_0$ being the initial substrate concentration (the concentration of the bound species ES, EP1 to EP3 are neglected). The concentration of enzyme, $[E]_0$, is constant though the reaction. **(B)** The simulation of the variation of the concentration of substrate and product in the time course of the reaction is shown as lines (in black, blue, green, orange and red for S, P1, P2, P3 and P4, respectively), using the optimized set of k_i , k_{-i} and $k_{cat,i}$ parameters (see Materials and Methods of Supporting Information above) and our experimental conditions: $[S]_0 = 120 \mu\text{M}$ and $[E]_0 = 8 \text{ nM}$. The NMR experimental data are shown as filled squares (with the same color-coding for species A, B, C, D and E, respectively). **(C)** Influence of the initial substrate concentration on the apparent rate constants. Table of the apparent rate constants $k_{app,1}$, $k_{app,2}$, $k_{app,3}$ and $k_{app,4}$ (in h^{-1}) extracted from fitting (a) our experimental data recorded at $[S]_0 = 120 \mu\text{M}$, (b) the simulated data performed at $[S]_0 = 120 \mu\text{M}$ and (c) the simulated data performed at $[S]_0 = 50 \mu\text{M}$ (at constant $[E]_0 = 8 \text{ nM}$). **(D)** Influence of the enzyme concentration on the apparent rate constants. Plot of the apparent rate constants $k_{app,1}$, $k_{app,2}$, $k_{app,3}$ and $k_{app,4}$ (blue, green, orange and red, respectively) extracted from fitting the simulated data performed at various enzyme concentrations $[E]_0$ (at constant $[S]_0 = 120 \mu\text{M}$). The solid line corresponds to linear regression.

Tables

Table S1. Values of the apparent rate constants (h^{-1}) of phosphorylations within the S380-S385 cluster.

Species	$k_{\text{app},1}$ (S385) (h^{-1})	$k_{\text{app},2}$ (S380) (h^{-1})	$k_{\text{app},3}$ (T383) (h^{-1})	$k_{\text{app},4}$ (T382) (h^{-1})
A ⁽¹⁾	1.93 ± 0.29	NA	NA	NA
B ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.65 ± 0.01	NA	NA
	2.15 ± 0.32	0.64 ± 0.002	NA	NA
C ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.82 ± 0.05	NA
	1.93 ⁽²⁾	0.64 ± 0.05	0.82 ± 0.05	NA
D ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.82 ⁽⁴⁾	0.49 ± 0.04
	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.85 ± 0.11	0.49 ± 0.04
E ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.82 ⁽⁴⁾	0.51 ± 0.04
	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.99 ± 0.30	0.48 ± 0.09
A+B ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.64 ± 0.09	NA	NA
B+C ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.77 ± 0.02	NA
C+D ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.82 ⁽⁴⁾	0.58 ± 0.01
C+D+E ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.82 ⁽⁴⁾	0.84 ± 0.03 ⁽⁶⁾
D+E ⁽¹⁾	1.93 ⁽²⁾	0.65 ⁽³⁾	0.82 ⁽⁴⁾	0.65 ± 0.02
Global A to E ⁽⁵⁾	2.00 ± 0.05	0.65 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.49 ± 0.06
Consensus values	1.93 ± 0.29	0.65 ± 0.01	0.82 ± 0.05	0.50 ± 0.04

⁽¹⁾ Values of the apparent rate constants correspond to averages and standard deviations over individual fits of each representative of a phosphorylated species (or combinations of species) as indicated on Figure 2. These values depend on the concentration of kinase and substrate (8 nM CK2 and 120 μM PTEN-Ctail).

⁽²⁾ Average $k_{\text{app},1}$ deduced from fitting kinetics of A.

⁽³⁾ Average $k_{\text{app},2}$ deduced from fitting kinetics of B.

⁽⁴⁾ Average $k_{\text{app},3}$ deduced from fitting kinetics of C.

⁽⁵⁾ Global fit of average of species A, B, C, D, E. Errors correspond to standard errors (from Monte Carlo analysis).

⁽⁶⁾ Since $C+D+E = 1-A-B$, this combination of species is essentially dependant on $k_{\text{app},1}$ and $k_{\text{app},2}$. Thus, the value of $k_{\text{app},4}$ cannot be inferred from such a combination.

Table S2. Values of the apparent rate constants (h^{-1}) of the isolated phosphorylation S370.

	k_{app} (S370) (h^{-1})
U ⁽¹⁾	0.16 ± 0.01
P ⁽¹⁾	0.15 ± 0.01

Consensus values ⁽²⁾	0.15 ± 0.01
--	--------------------

⁽¹⁾ Values of the apparent rate constants correspond to averages and standard deviations over individual fits performed on each representative of the unphosphorylated (U) or phosphorylated (P) species. Representative residues of the phosphorylation of S370 were S370^{U/P}, V369, N372. These values depend on the concentration of kinase and substrate (8 nM CK2 and 120 μM PTEN-Ctail).

⁽²⁾ Consensus values correspond to average and standard deviation of fitting the U and P species (the two lines above).

Table S3. Values of the apparent rate constants (h⁻¹) of phosphorylations within the S361-T366 cluster.

Species	k'_{app,1} (T366) (h⁻¹)	k'_{app,2} (S362) (h⁻¹)	k'_{app,3} (S361) (h⁻¹)	k'_{app,4} (T363) (h⁻¹)
A' (T366 ^U) ⁽¹⁾	0.46 ± 0.01	NA	NA	NA
1 - A' (T366 ^P) ⁽¹⁾	0.41 ± 0.01	NA	NA	NA
A'+B' ⁽¹⁾	0.43 ⁽²⁾	0.193 ± 0.010	NA	NA
C' ⁽¹⁾	0.43 ⁽²⁾	0.193 ⁽³⁾	0.012 ± 0.001	NA
D' ⁽¹⁾	0.43 ⁽²⁾	0.193 ⁽³⁾	0.012 ⁽⁴⁾	< 0.006 ± 0.001 ⁽⁵⁾
Consensus values	0.43 ± 0.03	0.193 ± 0.010	0.012 ± 0.001	< 0.006 ± 0.001 ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Values of the apparent rate constants correspond to individual fits of the average amplitudes representative of a species (or a combination of species) as indicated on Figure 3 and standard errors come from Monte Carlo analysis. These values depend on the concentration of kinases and substrate (8 nM CK2, 39 nM GSK3β and 120 μM PTEN-Ctail). For T366^U (species A') and T366^P (species B'+C'+D'+E' = 1 - A') the apparent rate constant was extracted from a fit to single exponential functions.

⁽²⁾ k'_{app,1} deduced from consensus value of fitting kinetics of A' and 1 - A'.

⁽³⁾ k'_{app,2} deduced from fitting kinetics of A'+B'.

⁽⁴⁾ k'_{app,3} deduced from fitting kinetics of C'.

⁽⁵⁾ Poor accuracy on k'_{app,4}, since the decay of species D' is not sampled.

References

- (1) Terrien, E.; Simenel, C.; Prehaud, C.; Buc, H.; Delepierre, M.; Lafon, M.; Wolff, N. *Biomol NMR Assign* 2009, 3, 45-8.

(2) Prehaud, C.; Wolff, N.; Terrien, E.; Lafage, M.; Megret, F.; Babault, N.; Cordier, F.; Tan, G. S.; Maitrepierre, E.; Menager, P.; Chopy, D.; Hoos, S.; England, P.; Delepierre, M.; Schnell, M. J.; Buc, H.; Lafon, M. *Sci Signal* 2010, 3, ra5.

(3) Loh, S. H. Y.; Francescut, L.; Lingor, P.; Bahr, M.; Nicotera, P. *Cell Death and Differentiation* 2008, 15, 283-298.

2.2. Perspectives

La RMN est particulièrement bien adaptée pour suivre la phosphorylation pour notre étude de PTEN-Cter. Dans un premier temps, l'objectif de ce projet est de mettre en place une méthodologie pour détailler le mécanisme de phosphorylation de PTEN-Cter par des kinases *in vitro* et par des kinases endogènes dans des extraits de cellules neuronales. Dans un deuxième temps, nous souhaitons nous focaliser sur MAST2 pour identifier le(s) résidu(s) de PTEN-Cter phosphorylé(s) par cette kinase et le rôle de ces phosphorylations dans un contexte cellulaire. L'étude de la phosphorylation de PTEN est rendue difficile par les problèmes rencontrés pour produire le domaine kinase soluble de MAST2. Plusieurs projets, réalisés en parallèle, sont toujours en cours pour produire ce domaine. Enfin, des résidus phosphorylés de PTEN-Cter semblent affecter la conformation de la protéine et aurait une répercussion directe sur sa fonction. Ainsi, pour le mettre en évidence, une dernière étude consiste à étudier la conformation dite « ouverte/fermée » de PTEN selon l'état de phosphorylation de la queue C-terminale. Nous détaillerons dans cette partie les résultats préliminaires que nous avons déjà obtenus et les stratégies qui sont envisagées.

2.2.1. Cinétique de phosphorylation de PTEN-Cter *in vitro* (suite)

La Ser385 est le résidu qui amorce la cascade de phosphorylation de PTEN-Cter. Que se passe-t-il si la sérine est substituée par une alanine ? Un mutant est en cours de construction pour répondre à cette question, pour savoir si la cascade est bloquée ou simplement retardée.

Nous avons vu aussi que Ser361 et Thr363 sont phosphorylés, probablement par CK2 à la vue des sites consensus. Ces deux nouveaux résidus n'avaient jamais été identifiés phosphorylés jusqu'à présent. Ces phosphorylations interviennent après la phosphorylation par GSK3- β de Ser362 et Ser366. À ce stade nous ne pouvons conclure si ces résidus sont phosphorylés par CK2 ou GSK3- β . Un moyen de le savoir, pour identifier sans ambiguïté la kinase responsable, serait de refaire cette expérience en arrêtant la réaction juste avant la phosphorylation de ces résidus (en chauffant tout simplement les échantillons pour inactiver les kinases) et ajouter ensuite dans un cas la kinase CK2 et dans l'autre GSK3- β .

2.2.2. Cinétique de phosphorylation de PTEN-Cter dans les extraits de neurones (suite)

CK2 et GSK3- β sont les deux kinases majoritaires identifiées mais il en est d'autres qui semblent aussi jouer un rôle important dans la régulation de PTEN à travers la phosphorylation de PTEN-Cter tel que MAST2. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons décidé de suivre la phosphorylation de PTEN-Cter par des kinases endogènes à partir d'extraits de neurones. D'après nos données, les cinétiques sont différentes de celles obtenues *in vitro* avec CK2 et GSK3- β . Nous avons observé quelques différences notables, comme la présence dans les extraits d'une phosphorylation supplémentaire (Thr383 ?) par une kinase différente de CK2 et GSK3- β . Ainsi, il est possible de prendre plusieurs directions pour aller plus loin dans l'interprétation de nos données :

- Utilisation dans les extraits d'inhibiteurs de CK2 et GSK3- β . (que devient Thr383 ?) ;
- Culture de cellules neuronales dont le gène de PTEN est soit éteint ou soit surexprimé (que devient Ser380 ?) ;
- Utilisation de mutants de PTEN-Cter (S385A...) pour diminuer la phosphorylation de CK2.

Ces trois premiers points participent à identifier les résidus qui pourraient être affectés par d'autres kinases endogènes, et plus particulièrement MAST2, sans que l'on ait besoin de produire le domaine kinase de MAST2.

2.2.3. Étude de la phosphorylation de PTEN-Cter *in cellulo*

En se projetant sur le plus long terme, il serait intéressant de suivre par RMN la phosphorylation de PTEN injecté dans des cellules. La technique a été éprouvée, à ce jour, uniquement avec des oocytes. Plusieurs défis expérimentaux restent à surmonter :

- La vectorisation des peptides

Il est indispensable de faire pénétrer PTEN-Cter marquée $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ dans les cellules, de manière reproductible et efficace. Il existe des séquences peptidiques pénétrantes. Certaines, comme les séquences TAT que nous avons testées, sont

très efficaces mais, après translocation, nous ne contrôlons pas la localisation cellulaire du peptide qui peut être très différente de celle de la protéine endogène. D'autres équipes en Europe essaient aussi de faire pénétrer leur protéine d'intérêt marquée par électroporation. L'efficacité de cette technique reste très dépendante des cellules et des protéines utilisées et n'est pas généralisable.

- *Le seuil de détection en RMN*

La RMN est une technique peu sensible. Les quantités nécessaires sont de l'ordre, au minimum, de plusieurs dizaines de micromolaires. De ce fait, si nous envisageons de mesurer les constantes cinétique de phosphorylation *in cellulo* telles qu'elles ont été réalisées *in vitro*, nous devrions cibler une concentration finale de la centaine de micromolaires. D'une part, nous risquons de rencontrer des difficultés expérimentales pour atteindre ces concentrations et d'autre part, nous serons donc très éloignés des concentrations de PTEN endogène.

- *Maintien des cellules en vie dans un tube Shigemi de RMN*

Les neuroblastomes poussent habituellement en adhérant à une surface solide avec un milieu de culture riche en éléments essentiels pour la croissance des cellules eucaryotes. Il s'agit de maintenir les cellules en vie pendant l'expérience RMN (>20h), sachant que nous sommes contraints de placer une importante quantité de cellules (100 millions) dans un volume très restreint (200 à 300µl). Ainsi, l'enjeu majeur est que les cellules, du fait de leur concentration, ne soient pas asphyxiées et ne lysent pas. Des tubes spécialement conçus pour ce genre d'expériences devront très probablement dans l'avenir être développés pour répondre aux nouvelles exigences de la RMN biologique.

- *Les modifications post-traductionnelles dans les neuroblastomes*

Contrairement aux extraits cellulaires, nous ne pouvons pas inhiber la déphosphorylation de PTEN-Cter par les phosphatases endogènes. La dégradation de PTEN-Cter par le protéasome peut aussi présenter une limite supplémentaire. De plus, nous sommes aussi dépendants de la concentration intracellulaire d'ATP produites par la cellule.

Nous cherchons avant toute chose à répondre à une question biologique : Est-ce que la kinase MAST2 participe à la régulation de la phosphorylation de PTEN dans des neuroblastomes humains ? Nous disposerons de lignées cellulaires surexprimant MAST2 ou, à l'inverse, avec une expression très réduite.

2.2.4. Production et tests d'activités *in vitro* de la kinase MAST2

Il a été démontré que MAST2 phosphoryle PTEN-Cter *in cellulo* (52) mais aucun site n'a encore été identifié. Nous avons donc décidé de produire le domaine kinase de MAST2 (MAST2-K) chez *E.coli* BL21(DE3) star pour étudier la phosphorylation de PTEN-Cter *in vitro*. Deux constructions ont été exprimées : MAST2-K298 et MAST2-K352.

Le domaine MAST2-K298 correspond au domaine kinase fonctionnel exprimé dans les cellules COS-7 (52). Nous sommes donc repartis de cette même délimitation.

MAST2-K352 possède une extension de 54 acides aminés en C-terminal qui correspond à une séquence conservée chez la famille des AGC kinases et qui est essentielle pour l'activité catalytique d'une majorité de ces kinases (Cf. Chapitre 2, p.46).

Ces domaines ont été exprimés en présence d'une étiquette histidine (HIS) (HIS-MAST2-K298 et HIS-MAST2-K352), d'une étiquette « *Glutathion S-Transferase* » (GST) (GST-MAST2-K298 et GST-MAST2-K352) ou encore d'une étiquette « *Maltose Binding Protein* » (MBP) (MBP-MAST2-K298 et MBP-MAST2-K352) en N-terminal dans des plasmides Gateway pDEST15, 17 et MBP (Invitrogen).

Les constructions avec les étiquettes HIS et MBP sont surexprimées chez *E.coli*, contrairement aux constructions avec l'étiquette GST. Cependant, nous n'avons jamais réussi, pour toutes les constructions, à produire un domaine catalytique actif en solution, malgré les différentes conditions que nous avons utilisées. De nombreux tests de dénaturation et renaturation ont été réalisés mais cela ne nous a pas permis de solubiliser HIS-MAST2-K298 ou HIS-MAST2-K352 : aucune activité de phosphorylation de PTEN-Cter n'a pu être mise en évidence. L'étiquette MBP augmente la quantité de protéine dans la phase soluble pour la construction MBP-MAST2-K352 mais pas pour MBP-MAST2-K298. Cependant,

lorsque l'étiquette MBP est clivée, nous avons constaté que la protéine s'agrégeait. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité catalytique du domaine, même en conservant l'étiquette MBP et la protéine (83,5kDa) possède un volume de rétention identique au volume mort des colonnes de gel filtration que nous avons testé (S-100, S-200 et S-300). De ce fait, des études biophysiques n'ont pu être réalisées pour caractériser la protéine.

En parallèle, nous avons fait cloner plusieurs constructions de MAST2-K298, MAST2-K352 dans des plasmides permettant leur expression dans des cellules d'insectes Sf9 infectées par baculovirus. La protéine est sécrétée dans le milieu de culture, du fait de la présence d'une séquence signal.

Une construction du bidomaine (MAST2-K698), incluant le domaine kinase (350aa) et le domaine PDZ (100aa) espacés l'un de l'autre d'une large séquence de 250 acides aminés qui ne possède pas de structures secondaires connues, a également été construit. Aucun signal de la protéine n'a pu être détecté à partir des expériences de western blotting. Soit les clones ne s'expriment pas dans les cellules d'insectes (il n'est pas exclu que l'expression de cette kinase perturbe les voies de signalisation des cellules), soit la protéine est très vite dégradée une fois synthétisée.

Ces difficultés nous ont amenés à repenser notre stratégie. La délimitation d'un domaine se faisant de manière empirique, il est absolument nécessaire de tester un nombre de délimitation bien supérieur à celui que nous venons de présenter ici. Plusieurs plateformes en France proposent ce type de solution en faisant des tests à haut débit, avec de nombreuses délimitations et étiquettes, dans le but d'obtenir le domaine exprimé soluble et fonctionnel. Une collaboration a donc été entamée avec le laboratoire d'architecture et fonction des macromolécules biologiques à Marseille.

L'obtention du domaine kinase et du bi-domaine de MAST2 permettrait d'identifier les sites phosphorylés de PTEN-Cter qui, jusque-là, restent inconnus, mais aussi d'étudier l'impact du domaine PDZ sur l'efficacité de phosphorylation de PTEN-Cter. C'est en effet une première étape vers une étude sur l'interdépendance de deux domaines en *cis* de MAST2 qui participe à la régulation de la phosphorylation de PTEN-Cter. La résolution de la structure tridimensionnelle sera

une étape supplémentaire pour élucider le mécanisme de régulation de l'activité catalytique de MAST2.

2.2.5. Étude par RMN de la conformation ouverte/fermée de PTEN en fonction de la phosphorylation de PTEN-Cter

Les conséquences de la phosphorylation de PTEN-Cter sont multiples. Nous avons pu en avoir un bref aperçu dans l'introduction. En effet, phosphorylé, PTEN a une activité catalytique plus faible et est moins susceptible à la protéolyse alors que, non phosphorylé, l'activité catalytique est augmentée mais est aussi plus sensible à l'action des caspases et de la dégradation par le protéasome.

Nous nous intéressons ici aux changements conformationnels induits par la phosphorylation de PTEN-Cter, afin de valider le modèle ouvert/fermé et d'identifier, à partir de mutants alanines, quels sont les sites phosphorylés nécessaires au passage de la conformation dite « ouverte » ou « fermée » de PTEN. Nous ne connaissons ni le mécanisme d'ouverture et fermeture ni la surface d'interaction des domaines de PTEN. Ces conformations seraient dépendantes de la phosphorylation de PTEN-Cter. Nous entendons par conformation « fermée » que la partie C-terminale interagit avec les domaines PTP et/ou C2 de PTEN, contrairement à la conformation ouverte. Il a en effet été proposé que le domaine C2, qui interagit avec la membrane plasmique *via* les phosphatidyl sérines, puisse aussi interagir avec les sérines et thréonines phosphorylées de PTEN-Cter. Nous comprenons donc que, par compétition de site, PTEN phosphorylé ne peut plus se lier à la membrane. Par conséquent, l'activité catalytique de PTEN se retrouve réduite lorsque PTEN est dans une conformation dite « fermée ». La RMN couplée au SAXS se révèle alors être une approche pertinente pour analyser et identifier ce type d'interaction transitoire interdomaine. Dans ce but, nous avons exprimé PTEN entier et les domaines C2 et C-terminal de PTEN (PTEN-C2-Cter) avec une étiquette histidine en N-terminal à partir de la souche *E.coli* BL21(DE3) star. Nous obtenons une très forte expression de PTEN entier qui se retrouve entièrement dans la phase insoluble. Cependant, les tests de dénaturation et renaturation ne permettent pas de replier la protéine dans la phase soluble. Par contre, une faible quantité de PTEN est obtenue en cellules d'insectes dont une partie se retrouve dans la phase soluble et active. Plusieurs tests d'expressions sont engagés pour améliorer ce rendement.

Par ailleurs, une fraction de PTEN-C2-Cter est exprimée dans la phase soluble. La prochaine étape consiste donc à optimiser l'expression de ce domaine en milieu minimum enrichi en isotope $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ pour étudier la conformation de PTEN-C2-Cter *in vitro* par RMN lorsqu'il est phosphorylé ou non par des kinases telles que CK2, GSK3- β ou encore MAST2-K. Si les conditions sont favorables, il sera possible de déterminer la surface d'interaction entre le domaine C2 et PTEN-Cter sur la base des différences de déplacements chimiques à partir des spectres HSQC $^1\text{H}-^{15}\text{N}$.

Résultats 3 : Applications

« Développement de peptides pro-survie. »

Résumé

Sur la base de nos résultats décrits dans le paragraphe 1, nous avons décidé d'utiliser nos connaissances et nos résultats pour développer des peptides de forte affinité pour MAST2-PDZ et capables d'induire la survie d'une cellule neuronale. Nous postulons que le phénotype de survie de la cellule est corrélé à l'affinité des peptides pour MAST2-PDZ. À partir de la structure des complexes de MAST2-PDZ, nous avons donc déterminé des séquences optimales de haute affinité pour MAST2-PDZ. Un premier lot de peptides optimisés a été testé *in vitro*. Nous avons augmenté l'affinité d'un facteur 10 pour le meilleur peptide par rapport à la partie cytoplasmique de la glycoprotéine G issue d'une souche virulente. Nos collaborateurs ont mis au point une stratégie pour produire ce peptide par le système de lentivirus dans un modèle de cellules neuronales humaines. Les premiers résultats montrent que ce peptide augmente significativement la formation des branchements des axones des cellules neuronales qui est un marqueur de survie bien établi. Sachant que ces peptides pourraient être utilisés pour un usage thérapeutique, un brevet a été récemment déposé²¹. Le rôle de ces peptides serait de restaurer le réseau de communication entre les neurones qui a été détruit suite à une maladie dégénérative, ou à un accident neurologique. Suite à un deuxième tour d'optimisation, un deuxième peptide est actuellement testé, son affinité pour MAST2-PDZ étant augmentée d'un facteur 20.

²¹ Wolff N., Préhaud C, Lafon M, Khan Z, Terrien E. DI N° 2011-20. *European patent application* 11 306 3184. (2011) "*High MAST2-Affinity polypeptides and uses thereof*"

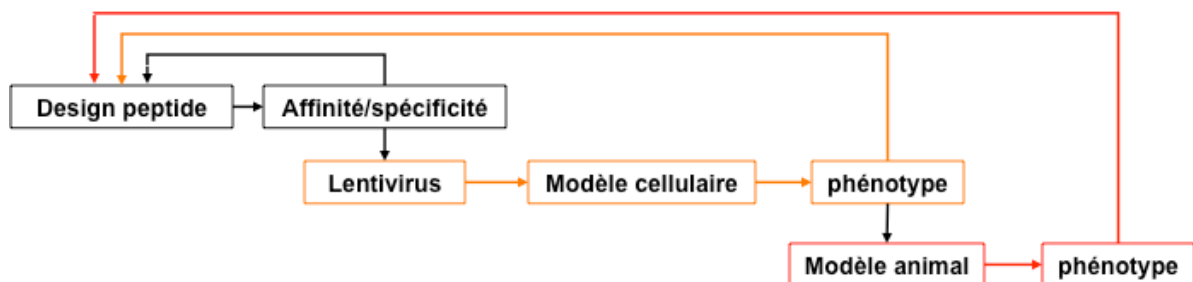
3.1. Résultats

La stratégie de conception des peptides, que nous avons décidé d'employer pour induire la survie des neurones, repose sur la structure des complexes de MAST2-PDZ. Nous sommes partis de l'hypothèse suivante : en inhibant la formation des complexes de MAST2-PDZ avec le (ou les) ligand(s) cellulaires de MAST2-PDZ, la survie des neurones est induite. Le schéma ci-dessous illustre cette hypothèse avec le ligand PTEN (un des ligands cellulaires de MAST2-PDZ identifiés) (Fig. 64).



Figure 64 : Perturbation de l'homéostasie cellulaire. À gauche, l'interaction de MAST2 avec PTEN participe au maintien de l'homéostasie cellulaire. À droite la compétition avec un peptide pro-survie (PPS) empêche la fixation du PDZ-BS de PTEN sur MAST2-PDZ. Ce déséquilibre favorise la survie de la cellule.

Voici la stratégie globale que nous avons construite pour valider notre démarche :



L'affinité du peptide optimisé pour MAST2-PDZ est mesurée *in vitro* par microcalorimétrie. Suivant le résultat, il est nécessaire ou non de faire un nouveau tour d'optimisation. Si le résultat est considéré comme positif, alors la séquence codant le peptide sélectionné est intégrée au génome d'un lentivirus. Des cellules neuronales de différentes lignées sont ensuite infectées par un lentivirus pour produire le peptide. Le phénotype de la cellule est alors analysé. Si le résultat est satisfaisant, les peptides seront testés sur un modèle animal.

3.1.1. Stratégie d'optimisation des séquences à partir de la structure des complexes de MAST2-PDZ

Le développement de ces peptides pro-survie repose sur l'analyse du domaine PDZ de MAST2. Nous avons donc tenu compte de la spécificité et de la force d'interaction du peptide pour MAST2-PDZ.

L'étude de la spécificité d'un ligand pour son partenaire dans la cellule est une tâche délicate. Nous avons démontré précédemment que la séquence Cyto13-vir interagit préférentiellement avec le domaine PDZ de MAST1 et MAST2, seuls interactants mis en évidence par double-hybride. Une substitution unique en position (-3) Gln -> Glu du PDZ-BS est suffisante pour diminuer la spécificité du ligand (Cf. figure 12, p.33) sans affecter son affinité. Comme nous l'avons démontré, cette relaxation de spécificité conduit cependant la cellule vers la mort, la séquence virale interagissant avec le domaine PDZ de la phosphatase PTPN4 (43).

Nous avons donc développé notre raisonnement dit « de spécificité » à partir de la force d'interaction du ligand pour MAST2-PDZ et PTPN4-PDZ : un ligand très affin pour MAST2-PDZ ($< 1\mu\text{M}$) et peu affin pour PTPN4-PDZ ($> 500\mu\text{M}$) serait un bon candidat afin d'induire la survie cellulaire sans déclencher l'apoptose (Fig. 65).

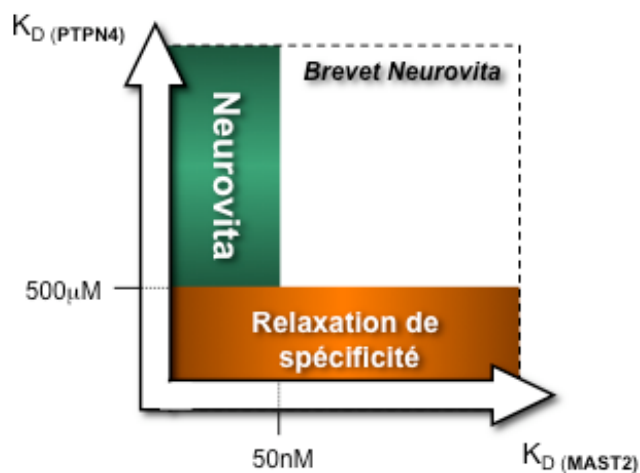


Figure 65 : Schéma représentant la constante de dissociation de MAST2-PDZ (en abscisse) et PTPN4-PDZ (en ordonné) pour un même ligand. Les peptides possédant une affinité pour PTPN4-PDZ $<$ à $500\mu\text{M}$ sont exclus quelque soit l'affinité pour MAST2-PDZ. Les peptides qui possèdent une affinité $>$ à $500\mu\text{M}$ avec PTPN4-PDZ et une très forte affinité pour MAST2-PDZ ($< 1\mu\text{M}$) seront retenus. Le but du projet Neurovita est de proposer des peptides ayant une affinité de quelques dizaine de nM.

D'après nos données structurales et thermodynamiques, les peptides se délimitent en trois régions : un premier segment correspond à l'ancrage C-terminal, le deuxième à une zone centrale qui ne possède pas ou peu d'interaction avec MAST2-PDZ et pour le troisième segment, le site d'ancrage du Trp(-11) ou Phe(-11) (Fig. 66).

Les peptides pro-survie ont été conçus en deux étapes. La première étape consiste à définir les résidus importants pour la spécificité du ligand. Ces acides aminés seront fixés dans les différents tours d'optimisation. Ensuite, nous avons défini les acides aminés susceptibles d'apporter un large gain d'affinité en se basant sur les résultats obtenus par microcalorimétrie et à partir de la structure des complexes de MAST2-PDZ.

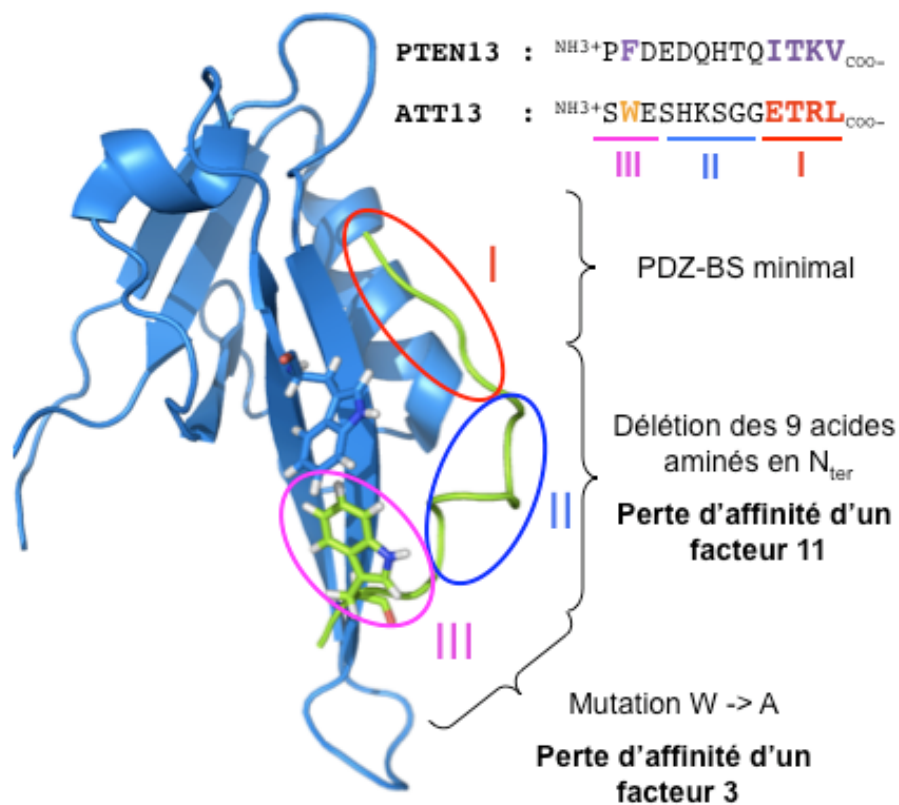


Figure 66 : Structure du complexe MAST2-PDZ/Cyto13-att (2KQF). Le complexe est représenté en structures secondaires à partir du logiciel Pymol. En bleu, MAST2-PDZ. En vert, le ligand Cyto13-att. Les résidus C-terminaux qui forment le site minimal de fixation de MAST2-PDZ sont entourés en rouge (partie I). Trp(-11), constituant le point d'ancrage III est représenté en bâtonnets et entouré en rose (partie III). Les résidus qui forment le lien entre la partie I et la partie III sont entourés en bleu (partie II). La suppression de l'ancrage du Trp(-11) diminue l'affinité apparente d'un facteur 3. La suppression de l'ancrage N-terminal (II + III) diminue l'affinité apparente d'un facteur 11.

Étape 1 : Spécificité des peptides pour MAST2-PDZ

Nous avons défini 3 acides aminés clefs des peptides viraux qui participent à la reconnaissance spécifique de MAST2-PDZ mais pas à celle de PTPN4-PDZ.

1 / Tout d'abord, nous avons conservé l'Arginine (-1) sur la base de la structure du complexe MAST2-PDZ/Cyto13-att (Fig.67, panneau de gauche). En effet, le groupement guanidinium de la chaîne latérale de Arg(-1) forme un pont

ionique avec O ϵ 2 de la chaîne latérale du Glu44 de MAST2-PDZ. Parallèlement, l'analyse de la structure cristallographique de PTPN4-PDZ en complexe avec Cyto13-att (code PDB 3NFK) indique que la densité électronique de Arg(-1) est très mal définie et ne fait aucun pont ionique avec les acides aminés adjacents de PTPN4-PDZ (pas de contrainte de la chaîne latérale) (Fig. 67, panneau de droite). De plus, la mesure des constantes de dissociation des complexes de PTPN4-PDZ et l'analyse de la structure du complexe PTPN4-PDZ/GluN2A-16 (code PDB 3NFL), mettent en avant le rôle favorable d'une courte chaîne latérale anionique telle que Asp(-1) (43).

2/ Gln(-3) est un résidu essentiel pour le maintien de la spécificité avec MAST2-PDZ que nous avons conservé pour la conception de nos peptides optimisés. En effet, la substitution de Glu \rightarrow Gln pour le complexe de MAST2-PDZ n'affecte pas la force d'interaction du complexe contrairement au complexe PTPN4-PDZ (Fig. 67). De plus, en double hybride, le peptide Cyto13-vir ne reconnaît pas le domaine PDZ de PTPN4 et nous avons montré que cette simple substitution par Glu est suffisante pour faire basculer le devenir de la cellule vers la mort (27).

3/ Pour terminer, nous avons conservé l'ancrage de Trp(-11) qui fait l'originalité de la fixation du ligand par rapport au complexe PTPN4-PDZ, qui n'interagit qu'avec les 4-5 acides aminés C-terminaux de Cyto13-att (Fig. 67). En effet, contrairement à PTPN4-PDZ, MAST2-PDZ possède une surface d'interaction plus étendue avec des brins β 2 et β 3 allongés. Le groupement indol de Trp(-11) fait des contacts de Van der Waals avec le groupement indol de Trp41 et avec les chaînes latérales de Ile24 et Val26 de MAST2-PDZ.

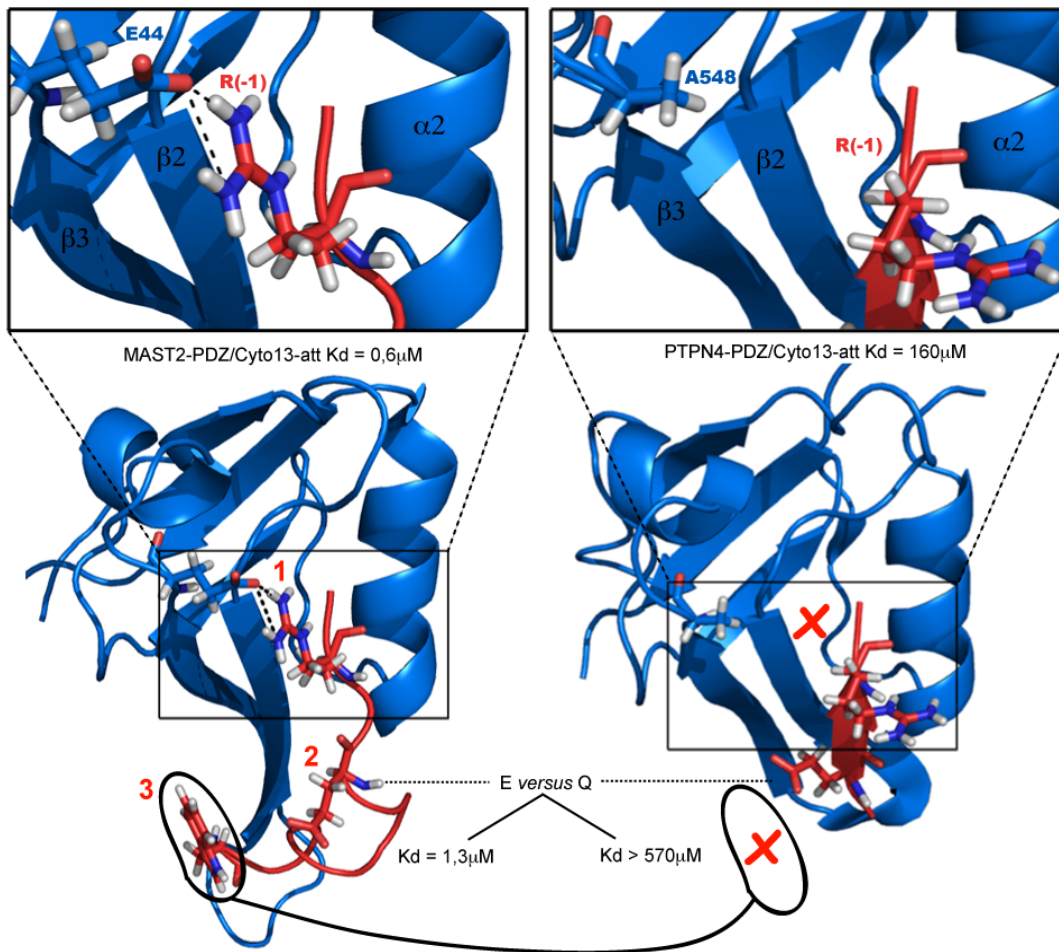


Figure 67 : Spécificité des peptides viraux pour MAST2-PDZ et PTPN4-PDZ. À gauche, structure RMN de plus basse énergie du complexe MAST2-PDZ (bleu)/Cyto13-att (rouge) (code PDB : 2KQF). Les résidus des peptides qui favorisent la reconnaissance spécifique de MAST2-PDZ sont représentés en bâtonnets avec 1 qui correspond à Arg(-1), 2 à Glu(-3) et 3 à Trp(-11). L'agrandissement à gauche illustre la formation du pont ionique entre Arg(-1) et Glu44 (pointillés noirs). À droite, structure cristallographique du complexe PTPN4-PDZ (bleu)/Cyto13-att (rouge) (code PDB : 3NFK). Seulement cinq acides aminés du peptide en Cterminal possèdent une densité électronique et interagissent avec la poche de fixation de PTPN4-PDZ. L'agrandissement à droite indique que Arg(-1) est exposé au solvant.

Ainsi, notre séquence minimale spécifique de MAST2-PDZ ressemblerait à XWXXXXXXXXQXRϕ avec X pour n'importe quel acide aminé et ϕ pour un acide aminé hydrophobe. Nous avons ensuite défini les acides aminés pouvant générer un gain d'affinité supplémentaire.

Étape 2 : Gain d'affinité des peptides pour MAST2-PDZ

Il existe peu de possibilité afin d'optimiser la partie C-terminale, point d'ancrage I. Sur les 4 acides aminés qui composent le PDZ-BS minimal, il ne reste que la position (0) et la position (-2) à optimiser, les positions (-1) et (-3) restant

fixées afin de maintenir la spécificité pour MAST2-PDZ. Les deux positions (0) et (-2) déterminent aussi la classe à laquelle le domaine PDZ appartient. Nous avons vu que MAST2-PDZ interagit préférentiellement avec les PDZ-BS de classe 1 (XS/TX ϕ) et également avec ceux de classe 2 (X ϕ X ϕ) avec néanmoins une diminution de la force d'interaction du complexe (Tab.5). En effet, le groupement méthyl de Thr(-2) forme à la fois une interaction de type Van der Waals avec les chaînes latérales de Val76 et Val77 et une liaison hydrogène avec O ϵ de Thr(-2) et le proton de N ϵ de His73 que l'on ne retrouve pas avec les ligands de classe 2.

Pour la position (0), nous avons conservé la leucine. En analysant la structure de MAST2-PDZ en complexe avec Cyto13-att et PTEN13-Cter, nous avons observé que Leu(0) remplit mieux la cavité hydrophobe de MAST2-PDZ composé par les résidus Tyr17, Phe19, Leu21, Val76, Val77 et Ile80 que Val(0). En conclusion, nous avons conservé la séquence C-terminale du virus de la rage (-QTRL) de la souche virulente CVS.

Les segments I et III étant fixés, nous avons donc porté nos efforts d'optimisation sur le segment II qui possède très peu de contacts avec MAST2-PDZ et qui se retrouve contraint par l'ancrage C-terminal et l'ancrage de Trp(-11) qui est conservé chez la majorité des protéines G des souches du virus de la rage. En terme énergétique, la contribution du segment II se traduirait par une faible contribution enthalpique favorable et une contribution entropique largement défavorable. Cela peut s'interpréter soit par la contrainte des angles φ et ϕ des acides aminés du segment II lié ou soit par une organisation particulière de la couche de solvation autour du complexe. Sur cette base, nous avons cherché à conserver la forte contribution enthalpique mesurée lorsque l'on ajoute Cyto13-vir, apporté principalement par l'ancrage C-terminal, tout en réduisant la pénalité entropique du segment II.

La majorité des protéines G ont conservé le doublet de glycine en position (-5) et (-6) et au moins une des glycines est strictement conservée. Nous supposons que cette glycine est un avantage pour le positionnement de Trp(-11) qui est payé par un coup entropique défavorable dû à la contrainte des angles φ et ϕ d'au moins une de ces glycines. Malheureusement, nous ne disposons pas des données sur l'amplitude de mouvement du segment II. En effet, nous n'avons mesuré que

quelques NOEs entre le segment II et MAST2-PDZ qui ne sont pas suffisantes pour conclure sur la flexibilité du segment II. En l'absence de telles données, nous nous sommes focalisés sur les combinaisons d'acides aminés de Cyto13-vir et PTEN13-Cter qui possède un ancrage N-ter de Phe(-11) en l'absence de Gly sur le segment II. Nous avons donc créé dans un premier temps des peptides hybrides avec des résidus qui explorent un espace conformationnel, *via* leurs angles φ et ϕ , restreint par rapport aux glycines pour diminuer la pénalité entropique et qui possèdent des interactions moins labiles que le complexe MAST2-PDZ/Cyto13-vir pour augmenter la contribution enthalpique.

Nous avons aussi diminué la taille du segment II pour favoriser au maximum les contacts entre le peptide et MAST2-PDZ tout en conservant l'ancrage de Trp(-11) avec Ile24, Val26 et Trp41. Tous ces peptides ont été synthétisés puis testés *in vitro* afin de mesurer leur constante de dissociation apparente avec MAST2-PDZ par microcalorimétrie. Nous avons également analysé les paramètres thermodynamiques de ces interactions afin d'ajuster notre protocole d'optimisation.

3.1.2. Mesure des constantes d'affinité

Nous avons mis en évidence une relation linéaire entre enthalpie et entropie pour les différents peptides viraux en interaction avec MAST2-PDZ (Cf. figure 63, p170). En formant une liaison hydrogène supplémentaire (contribution enthalpique favorable) le système est alors plus contraint (contribution entropique défavorable). En jouant sur l'équilibre entre ΔH et $T\Delta S$, nous avons alors optimisé les séquences à partir de nos structures et des paramètres thermodynamiques des complexes pour concevoir des peptides de haute affinité pour MAST2-PDZ.

Premier tour d'optimisation (Test 1) :

Un premier lot de 6 peptides a été synthétisé. Chaque expérience a été faite dans les mêmes conditions à 30 μ M de MAST2-PDZ finale et en titrant avec le peptide par ITC. Les valeurs sont reportées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Paramètres d'interactions mesurées par ITC de MAST2-PDZ complexé avec les peptides du premier tour d'optimisation.

		Séquence	Kd (μM)	ΔH	TAS	n
	PTEN13-Cter	PFDEDQHTQITKV	1,99	-6323	1451,558	1,19
	Cyto13-vir	SWESHKSGGQTRL	1,26	-9929	-1878,39	1,00
Test 1	439	SWEVHTQQTRL	0,21	-8454	646,66	1,02
	441	SWEVHGGQTRL	0,12	-10230	-808,176	1,07
	442	SWEVHASGGQTRL	0,49	-10340	-1737,34	1,04
	443	SWAEAQHTQQTRL	0,4	-9088	-360,878	1,01

Note : les peptides en poudre (10 mg) ont été solubilisés dans du tampon Tris 50mM (pH 7,5), NaCl 150mM. Deux des peptides sont totalement insolubles (440 et 444).

Pour ce premier test, nous avons procédé pas à pas en essayant d'identifier les résidus « clefs » pour augmenter l'affinité apparente du complexe. Les peptides 442 et 443 ont été optimisés en conservant la taille de la séquence de 13 acides aminés.

Les séquences du segment II de Cyto13-att pour le peptide 442 et du segment II de PTEN13-Cter pour 443 ont servi de séquences initiales en y apportant quelques modifications déterminées à partir de la structure de chacun des complexes de MAST2-PDZ.

Nous avons substitué 2 acides aminés pour 442 : Ser(-9) \rightarrow Val(-9) et Lys(-7) \rightarrow Ala(-7). D'après la structure de MAST2-PDZ/Cyto13-att, Ser(-9) est à proximité de Ala23, Ile24 et Arg25. En substituant Ser(-9) par un acide aminé hydrophobe (Val), il était possible de favoriser les contacts de Van der Waals. Lys(-7) ne fait aucun contact avec MAST2-PDZ et est tourné vers le solvant. Nous avons donc choisi un petit acide aminé neutre en faisant l'hypothèse que ce résidu est moins déstabilisant que la longue chaîne latérale de Lys(-7).

Pour le peptide 443, nous avons substitué les deux aspartates (-10) et (-8) par deux alanines. Dans la structure MAST2-PDZ/PTEN13-Cter, ces deux acides aminés sont tournés vers le solvant.

Il convient d'être prudent sur la contribution thermodynamique apportée par la substitution de chaque acide aminé du peptide, les effets étant souvent pleiotropes. Cependant, nous constatons (Tableau 6) que nous avons amélioré l'affinité apparente du complexe d'un facteur 2 à 3 par rapport à la séquence originale de Cyto13-vir (1,3 μM). Pour les peptides 442 et 443, nous conservons une très forte contribution enthalpique (-10341 et -9088 cal/mol). Il est intéressant de noter que

442 qui possède une paire de glycine présente une contribution entropique aussi défavorable (-1737 cal/mol) que Cyto13-vir (-1878 cal/mol) alors que 443, qui ne n'a pas de glycines, possède une contribution entropique plus favorable de 1377cal/mol par rapport à 442.

Les peptides 439 et 441 ont une séquence plus courte (11 acides aminés). Des résidus du segment II ne sont pas du tout en contact avec MAST2-PDZ d'après nos spectres de RMN. Nous avons donc supprimé Lys(-7) et Ser(-6) qui ne nous semblaient pas indispensables pour maintenir l'ancrage de Trp(- 11) passant alors en position -9 Trp(-9). Comme précédemment, nous avons testé le segment II issu du ligand exogène (Cyto13-vir) pour le peptide 441 ou issu du ligand endogène (PTEN13-Cter) pour le peptide 439.

Premièrement, pour les deux peptides 439 et 441, nous améliorons l'affinité apparente d'un facteur 5 à 10 par rapport à Cyto13-vir. Deuxièmement, nous constatons qu'en supprimant deux acides aminés, nous augmentons la contribution entropique à l'énergie libre du complexe. Pour 439, la contribution entropique est augmentée de 2524 cal/mol avec en parallèle une diminution de la contribution enthalpique 1475 cal/mol. Pour 441, la large contribution enthalpique (-10230 cal/mol) est conservée mais la contribution entropique (+1070 cal/mol) augmente sensiblement. À travers ces expériences, il se confirme que le doublet de glycine joue un rôle important dans l'énergie libre du complexe.

Deuxième tour d'optimisation (Test 2) :

Sur la base des deux peptides les plus affins (439 et 441), nous avons choisi une nouvelle série de peptides en modifiant trois positions : (-4), (-5) et (-6).

Tableau 6 : Paramètres d'interactions mesurées par ITC de MAST2-PDZ complexé avec les peptides du deuxième tour d'optimisation.

		Séquence	Kd (µM)	ΔH	TΔS	n
	PTEN13-Cter	PFDEDQHTQITKV	1,99	-6323	1451,558	1,19
	Cyto13-vir	SWESHKSGGQTRL	1,26	-9929	-1878,39	1,00
Test 2	453	SWEVYTGQTRL	0,24	-6511	2521,08	0,85
	454	SWEVHGQQTRL	0,06	-8715	1108,56	1,01
	455	SWEVHTGQTRL	0,13	-9434	-42,316	0,91
	460	SWEVAGGQTRL	0,19	-7484	1686,68	0,92
	461	SWEVATQQTRL	0,13	-7688	1722,44	0,806

Dans un premier temps, un peptide hybride entre 439 et 441 a été conçu en substituant une des glycines de 441 correspond au résidu de 439. La substitution de Gly(-4) en Gln(-4) pour le peptide 454 augmente l'affinité d'un facteur 2 par rapport à 441, soit un facteur 20 par rapport à la séquence originale (Cyto13-vir). Pour 454, nous observons que la présence de Gln(-4), comme dans 439, diminue la contribution enthalpique par rapport à 441 (+1515cal/mol) mais est contrebalancée par une contribution entropique plus importante (+1916cal/mol). Par contre, la substitution de Gly(-5) en Thr(-5) pour le peptide 455 ne change pas l'affinité du complexe si nous le comparons à 441. En effet, la diminution de la contribution enthalpique (+796 cal/mol) s'accompagne d'une perte entropique (+766 cal/mol).

Dans un deuxième temps, la contribution de His(-8) a été évaluée afin d'identifier si ce résidu jouait un rôle important dans l'énergie du système. D'après la structure des complexes de MAST2-PDZ, His(-8) de Cyto13-att et His(-6) de PTEN13-Cter sont proches de Arg25 de MAST2-PDZ. En partant des séquences des peptides 439 et 441, nous avons donc muté His(-6) en alanine constituant alors les séquences 460 et 461. Nous constatons effectivement une diminution de la contribution enthalpique (+2746 cal/mol et +766 cal/mol). En contrepartie, un gain entropique est observé dans les deux cas qui ne compense pas totalement la perte énergétique pour 460 (+2494 cal/mol) contrairement à 461 (+1076 cal/mol). La contribution de His est significative mais dépend de la combinaison d'acides aminés en aval (GG *versus* TQ), la contribution peut être favorable ou défavorable.

Enfin, nous avons testé une dernière substitution de His(-8) par Tyr(-8) qui est présente dans certaines souches virulentes qui provoquent la rage. Nous avons donc remplacé His(-8) de 455 par une tyrosine (peptide 453) pour estimer sa contribution. L'affinité apparente du complexe est peu affectée. Nous observons une importante diminution de la contribution enthalpique par rapport à 455 (+2923 cal/mol) qui est partiellement compensée par une contribution entropique de +2563 cal/mol. Nous avons conclu que Tyr(-8) n'améliore pas l'affinité du ligand avec MAST2-PDZ. Un troisième tour d'optimisation serait envisageable pour améliorer la contribution de la position (-8) car toutes les combinaisons d'acides aminés n'ont pas encore été testées.

3.1.3. Preuve de concept

Tous ces peptides ont été conçus pour tester la survie de cellules neuronales. La stratégie d'utiliser des peptides pénétrant dont on ne maîtrise pas la localisation cellulaire, n'a pas été retenue car le groupe de Monique Lafon a mis en évidence que le trafic membranaire est nécessaire pour déclencher significativement la survie des cellules neuronales. Les peptides, couplés à un signal d'adressage à la membrane, ont donc été exprimés dans des cellules humaines (SH-SY5Y), de rats (Neuroscreen) et de souris (DRG), à partir de lentivirus. Ces protocoles, développés par le groupe de Monique Lafon, sont complexes et coûteux en temps mais ils ont le grand avantage d'exprimer la molécule cible de manière constitutive et stable. Les lentivirus ont été utilisés pour y introduire le gène codant le peptide d'intérêt. Les lentivirus infectent les cellules neuronales et expriment le peptide cible. La croissance des neurites, marqueur de survie dans les neurones, est ensuite analysée. Dans un premier temps, le peptide Cyto13-vir a été testé. Une croissance significative des neurites a été observée. Pour le peptide qui possède une affinité supérieure (x10) pour MAST2-PDZ, 441, la croissance des neurites est comparable à celle induite par Cyto13-vir. Cependant, l'arborisation des neurites, autre marqueur de survie, est significativement augmentée. Le peptide 454, le plus affin pour MAST2-PDZ, est en cours de test.

Pour conclure, nous avons réussi à augmenter significativement l'affinité de ligand pour MAST2-PDZ en analysant les paramètres structuraux et thermodynamiques. Nous avons produit des peptides de hautes affinités pour MAST2-PDZ qui possèdent une faible affinité pour PTPN4-PDZ *in vitro*. À partir d'un premier tour d'optimisation, nous avons conçu un peptide avec une affinité apparente supérieure d'un facteur 10 par rapport à la séquence originale pour MAST2-PDZ. Ce peptide, exprimé dans des cellules neuronales, induit significativement la survie des cellules en augmentant le nombre de branchement des neurites. Sur la base de ces résultats, nous avons poursuivi avec un deuxième tour d'optimisation qui a permis de gagner un facteur 2 supplémentaire pour l'affinité du peptide pour MAST2-PDZ.

3.2. Discussion & perspectives

Au final, plusieurs peptides présentant une affinité de quelques dizaines de nanomolaire pour le domaine PDZ ont été sélectionnés. À noter que seulement 4% des interactions *in vitro* PDZ/PDZ-BS possèdent une affinité sub-micromolaire (81). Nous proposons ici, des peptides avec des affinités parmi les meilleurs pour un domaine PDZ. En raisonnant uniquement sur la contribution apportée par le PDZ-BS, nous nous confrontons aux limites de notre démarche. Nous ne tenons pas compte des réarrangements structuraux de MAST2-PDZ (Cf. figure S3, Terrien *et al*, 2012, p.149), ni de l'hydratation de l'ensemble du complexe par exemple.

Nous n'avons pas fait pour l'instant de troisième tour d'optimisation. Il sera intéressant d'attendre les résultats *in cellulo* du peptide 454 avant de s'engager dans cette voie pour tester de nouvelles séquences. Il y a, à l'évidence, des positions à optimiser. Par exemple, la position (0) est une possibilité. Nous avons à disposition un PDZ-BS d'une souche d'un virus de la rage où Leu(0) de Cyto13-att est substituée par Met(0). La méthionine en position (0) n'est pas fréquente parmi les PDZ-BS et pourrait être utilisée pour augmenter la spécificité du peptide pour MAST2-PDZ. Nous avons mesuré la constante d'affinité de ce peptide (Cyto13-trm) avec MAST2-PDZ. Il améliore sensiblement l'affinité par rapport à Cyto13-att et interagit très faiblement avec PTPN4-PDZ ($> 500\mu\text{M}$).

Il est aussi probable que nous ayons atteint la limite du système d'interaction de MAST2-PDZ pour augmenter l'affinité. Nous avons vu, en effet, que l'affinité stagne autour de 60-100nM pour le dernier tour d'optimisation. La surface d'interaction du complexe MAST2-PDZ est particulièrement large pour un complexe PDZ/peptide mais reste faible au regard de l'ensemble des complexes protéiques (238). Les gains ou les pertes d'affinités dûs à la substitution d'un résidu sur le segment II sont faibles et ne contribuent qu'à une faible amélioration de l'affinité des peptides pour MAST2-PDZ.

Nous pouvons aussi nous interroger sur la nécessité de créer des peptides davantage affins pour déclencher la survie. Notre hypothèse de départ repose en effet sur la compétition des peptides optimisés avec les ligands endogènes de MAST2-PDZ. De ce fait, une amélioration de l'affinité devrait être corrélée avec une augmentation de la survie cellulaire, sauf si nous avons atteint un seuil critique pour

le déclenchement des mécanismes de survie. Une étude précédente sur la mort cellulaire induite par des peptides pro-apoptotiques a en effet montré que la force d'interaction des peptides pour leur cible (PTPN4-PDZ) était proportionnelle, jusqu'à une valeur seuil, au % de mort cellulaire (43). Une interaction transitoire peut être nécessaire pour déclencher un phénotype de survie (239). Le peptide le plus affiné ne sera donc pas forcément le meilleur candidat, d'où la nécessité de développer une méthode efficace pour pouvoir tester l'efficacité de plusieurs peptides. Le brevet a été déposé dans le but de proposer des molécules capables de restaurer le réseau neuronal détérioré de patients ayant subi un traumatisme. Pour cette étude, nos collaborateurs ont retenu les critères d'accroissement des neurites (capacité à créer de nouveaux contacts avec les neurones voisins) et d'arborisation des neurites (capacité à augmenter le nombre de contact d'un neurite avec les neurones adjacents).

Nous avons constaté une élongation des neurites en présence de Cyto13-vir. Pour le peptide 441, l'élongation des neurites n'est pas différente mais le nombre de branchement est significativement plus important. Il nous est très difficile de conclure si l'affinité *in vitro* de nos ligands pour MAST2-PDZ est le facteur discriminant, vu le faible nombre de peptides testés pour le moment *in cellulo*. Nous n'avons pas non plus évalué les spécificités de chaque peptide. Enfin – nous l'avons déjà souligné à plusieurs reprises mais c'est une difficulté récurrente – l'efficacité du peptide réside aussi par sa localisation cellulaire. L'ajout d'un segment transmembraire, grâce à l'insertion du gène qui code le peptide optimisé (+ un signal d'adressage à la membrane) dans des lentivirus, augmente significativement l'efficacité des peptides pour déclencher les voies pro-survie. La mise en place de molécules qui ciblent spécifiquement des compartiments cellulaires est un « challenge » supplémentaire pour proposer des molécules efficaces qui restaureraient le réseau neuronal détérioré *in vivo*.

Conclusions et perspectives générales

Ces dernières pages me permettent ici de faire une brève synthèse des résultats obtenus au cours de cette thèse et de mieux appréhender les enjeux et défis futurs qui s'ouvrent à nous pour la compréhension des mécanismes de régulation de MAST2 et PTEN. Ces avancées ont ainsi pu voir le jour grâce à la complémentarité et la collaboration fructueuse des deux unités qui ont travaillé sur ce projet.

Le virus de la rage est un pathogène qui, pour se disséminer dans l'organisme de l'hôte, induit la survie des neurones infectés en détournant la machinerie cellulaire. Le PDZ-BS de la glycoprotéine G du virus de la rage est nécessaire pour déclencher cette survie. Durant une grande partie de cette thèse, nous avons collecté de nombreux résultats afin de proposer des mécanismes moléculaires qui conduisent à la survie du neurone. Nous avons ainsi pu montrer que le phénotype de survie dépend du recrutement des protéines cellulaires MAST1 et MAST2 par le PDZ-BS de la glycoprotéine G. La spécificité du PDZ-BS de la glycoprotéine G est essentielle dans la virulence du virus. Nous avons en effet montré qu'une simple substitution en position -3 du PDZ-BS de la glycoprotéine G (Gln->Glu) suffisait à diminuer la spécificité du PDZ-BS, ce que nous avons appelé la relaxation de spécificité. En interagissant avec des partenaires supplémentaires, d'autres voies de signalisation sont perturbées, entraînant inéluctablement la cellule vers la mort. Dans une cellule infectée par une souche virulente du virus de la rage, la glycoprotéine G interagit spécifiquement avec le domaine PDZ de MAST2 et relocalise celle-ci à la membrane. Nous avons détaillé *in vitro* les déterminants d'interactions et de spécificité du PDZ-BS de la glycoprotéine G pour le domaine PDZ de MAST2.

MAST2 possède une fonction régulatrice de la longueur des neurites et interagit *via* son domaine PDZ avec le PDZ-BS de PTEN qui est une protéine inhibitrice de la voie de survie AKT. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliquant le PDZ-BS de la glycoprotéine G dans la cellule infectée, une description détaillée de MAST2-PDZ en complexe avec les 13 aa C-terminaux de PTEN et de la glycoprotéine G a été réalisée. Le réseau d'interaction des deux complexes est identique avec une interaction canonique de la partie C-terminale du peptide et une interaction originale impliquant la région N-terminale du peptide avec un aromatique en position -11 qui n'a jamais été mis en évidence dans d'autres complexes PDZ/PDZ-BS. Cet aromatique est conservé dans la quasi-majorité des glycoprotéines G des souches virulentes de la rage. La substitution de cet aromatique par une alanine diminue l'affinité du complexe d'un facteur 3.

Nous avons ainsi proposé un modèle sur la participation de MAST2 dans la régulation de PTEN dans la cellule. Le PDZ-BS de la glycoprotéine G est nécessaire pour induire l'exclusion nucléaire de PTEN qui joue un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Ainsi, la glycoprotéine G exprimée en large excès dans une cellule infectée inhibe la formation du complexe MAST2/PTEN *in cellulo* et modifie la répartition cellulaire de PTEN. Pour préciser le rôle du complexe MAST2/PTEN dans la survie cellulaire, il est nécessaire d'apporter de nouvelles évidences expérimentales. Cependant, nous nous confrontons à des mécanismes qui font intervenir de nombreuses autres protéines, domaines et modifications post-traductionnelles qui régulent son activité de manière extrêmement complexe. La kinase MAST2 phosphoryle la partie C-terminale de PTEN. L'efficacité de phosphorylation de cette kinase est dépendante de l'interaction du PDZ-BS de PTEN avec le domaine PDZ de MAST2 (Fig. 68). Il est bien établi, dans la littérature, que la phosphorylation de PTEN contrôle sa localisation cellulaire et sa fonction. L'étape clef de l'enclenchement de la survie neuronale par le virus pourrait être la perturbation de la phosphorylation de PTEN par MAST2 *via* la glycoprotéine G.

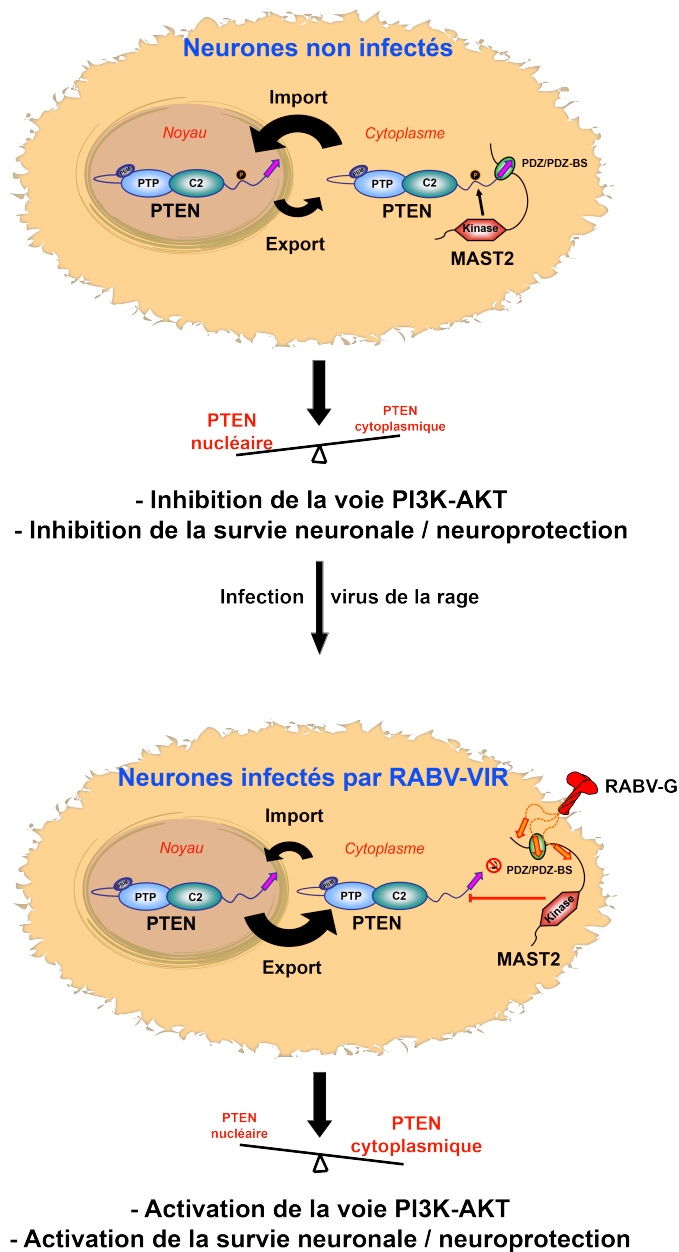


Figure 68 : Schéma du mécanisme moléculaire de la survie neuronale impliquant le trio MAST2/PTEN /glycoprotéine virale. En haut : cellule non infectée. Interaction du domaine PDZ de MAST2 avec le PDZ-BS de PTEN. Phosphorylation de la partie C-terminale de PTEN. La(les) phosphorylation(s) participe(nt) à la relocalisation cellulaire de PTEN. En bas : cellule infectée par le virus de la rage (RABV-vir). L'interaction de MAST2 et PTEN est inhibée, par compétition, par la glycoprotéine virale. La phosphorylation de PTEN-Cter est par conséquent diminuée, induisant une exclusion nucléaire de PTEN. Les phénotypes de survie sont dépendants de la localisation de PTEN.

Nous nous sommes donc intéressés aux modifications post-traductionnelles de PTEN et plus précisément à la phosphorylation de PTEN-Cter par plusieurs kinases, dont MAST2. Une étude par RMN de la phosphorylation de PTEN-Cter a été menée *in vitro* avec deux kinases majoritaires CK2 et GSK3- β dans un premier temps. Cette approche nous a permis pour la première fois, dans nos conditions, d'observer l'ensemble des phosphorylations par CK2 (Ser370, Ser380, Thr382/383 et Ser385) et GSK3- β (Ser362 et Thr366) qui étaient jusqu'à présent obtenues de façon parcellaire dans les publications. De plus, l'étude cinétique de l'apparition de chaque site phosphorylé, qui n'avait encore jamais été réalisée, nous a permis de

mettre en évidence l'ordre d'apparition des résidus phosphorylés par CK2 puis GSK3- β . Ces deux cascades indépendantes de phosphorylations ont, par ailleurs, des fonctions biologiques *a priori* distinctes. De plus, deux nouveaux résidus phosphorylés (Ser361 et Thr363) ont été identifiés *in vitro*. Le profil de phosphorylation est très semblable dans les extraits cellulaires avec, cependant, un autre chemin de phosphorylation identifié suggérant l'action d'au moins une kinase supplémentaire qui pourrait être MAST2.

Le rôle de l'activité catalytique de MAST2 reste à démontrer pour la survie neuronale. Nous avons donc entamé une étude sur le domaine kinase de MAST2 dont l'efficacité de l'activité catalytique est dépendante de la fixation du PDZ-BS de PTEN au domaine PDZ de MAST2. L'étude de l'activité catalytique de MAST2-K est en cours mais les tests réalisés à ce jour ne nous ont pas permis d'obtenir un domaine soluble et actif. D'autres tests sont en cours, notamment pour l'expression en cellules eucaryotes afin d'élucider le mécanisme particulièrement intéressant de l'activité catalytique de MAST2.

Le domaine PDZ de MAST2 est en équilibre monomère-dimère en solution *in vitro*. La forme monomérique est quant à elle favorisée en présence du ligand de MAST2-PDZ. Par comparaison des structures des domaines PDZ résolues de la famille des MAST kinases, nous avons pu constater que l'ancrage N-terminal du peptide (Cyt13-att et PTEN13-Cter) implique les mêmes acides aminés des brins β 2/ β 3 de MAST2-PDZ qui participent à la formation du dimère chez MAST1,3-PDZ. Cette observation nous a menés à nous interroger sur la présence du dimère de MAST2 dans un contexte cellulaire. Des données complémentaires doivent être apportées pour éclaircir ce point qui a déjà été mis en évidence dans d'autres systèmes analogues tel que l'homologue, chez la souris, du domaine PDZ de la protéine GRASP (Tamalin) qui dimérise de la même manière que MAST1,3-PDZ.

À partir de l'ensemble de ces données, la perspective de lier recherche fondamentale et appliquée a vu le jour grâce notamment à un financement obtenu auprès de l'Institut CARNOT-Pasteur Maladies infectieuses, qui a pour objectif de favoriser les projets valorisant la recherche appliquée. Ainsi, ayant une

connaissance détaillée au niveau atomique du domaine PDZ de MAST2, nous avons produit des peptides affins pour le domaine PDZ avec, en postulat de départ que (i) le déclenchement de la survie d'un neurone est induit par l'inhibition du complexe MAST2-PDZ/PTEN et que (ii) l'efficacité du substrat de MAST2-PDZ pour déclencher le phénotype de survie dépend, au moins en partie, de l'affinité de la molécule pour MAST2-PDZ. Ainsi, sur la base de la structure de MAST2-PDZ, nous avons sélectionné plusieurs peptides présentant un $K_{D(\text{app})}$ 10 à 20 fois plus affin que le peptide issu du virus virulent de la rage. Notre simple postulat s'est avéré fructueux puisque les deux peptides les plus affins, exprimés dans divers modèles de cellules neuronales, ont induit une réponse pro-survie. Des études complémentaires sont à l'œuvre pour alimenter le brevet qui a été déposé à la suite de ces résultats.

Dans cette thèse, nous avons donc abordé plusieurs aspects de la régulation des domaines PDZ. Nous avons abordé la relation entre les interactions PDZ/PDZ-BS, la localisation cellulaire et les modifications post-traductionnelles. De nombreux points, résumés dans cette conclusion, n'ont pu être que partiellement abordés pendant cette thèse et mériteraient encore de nombreuses investigations plus approfondies. Cependant, ces résultats fournissent des outils efficaces pour la compréhension des mécanismes de régulation de PTEN et de MAST2 et ouvrent ainsi plusieurs axes de recherches clairement identifiés et prometteurs pour le futur.

Annexe 1

(Publication)

^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the PDZ of Microtubule-Associated Serine/Threonine kinase 205 (MAST205) in complex with the C-terminal motif from the rabies virus glycoprotein.

Elouan Terrien, Catherine Simenel, Christophe Préhaud *et al* (2009)

^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the PDZ of microtubule-associated serine/threonine kinase 205 (MAST205) in complex with the C-terminal motif from the rabies virus glycoprotein

Elouan Terrien · Catherine Simenel ·
Christophe Prehaud · Henri Buc · Muriel Delepierre ·
Monique Lafon · Nicolas Wolff

Received: 27 October 2008 / Accepted: 19 December 2008 / Published online: 13 January 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract Most of microbes hijack the cellular machinery to their advantage by interacting with specific target of the host cell. Glycoprotein of rabies virus is a key factor controlling the homeostasis of infected neuronal cells and proteins belonging to the human microtubule associated serine threonine kinase family have been identified as potential cellular partners. As a first step towards its structural study, we have assigned the backbone and side chain nuclei resonances of the PDZ domain (PSD-95, Discs Large, ZO-1) of MAST205 in complex with the C-terminal residues of the glycoprotein of rabies virus. The BMRB accession code is 155972.

Keywords MAST205 · NMR assignment · PDZ ·
Viral infection

Biological context

PDZ (PSD-95, Discs Large, ZO-1) domains are important modular protein-interaction domains of human proteins. They form globular structures of 80–100 amino acids organized into five beta strands and two alpha helices creating a

socket to fix a peptide of a partner protein. Typically, PDZ domains recognize C-terminal residues (PDZ-BS) and assemble multicomponent protein complexes inside eukaryotic cells (Nourry et al. 2003). These PDZ domains are usually found in large multidomain scaffold proteins that include catalytic function like phosphatase or kinase activities. The biological function of each PDZ domain is determined by its intrinsic ligand specificity and also by the context in which it interacts with other cellular components.

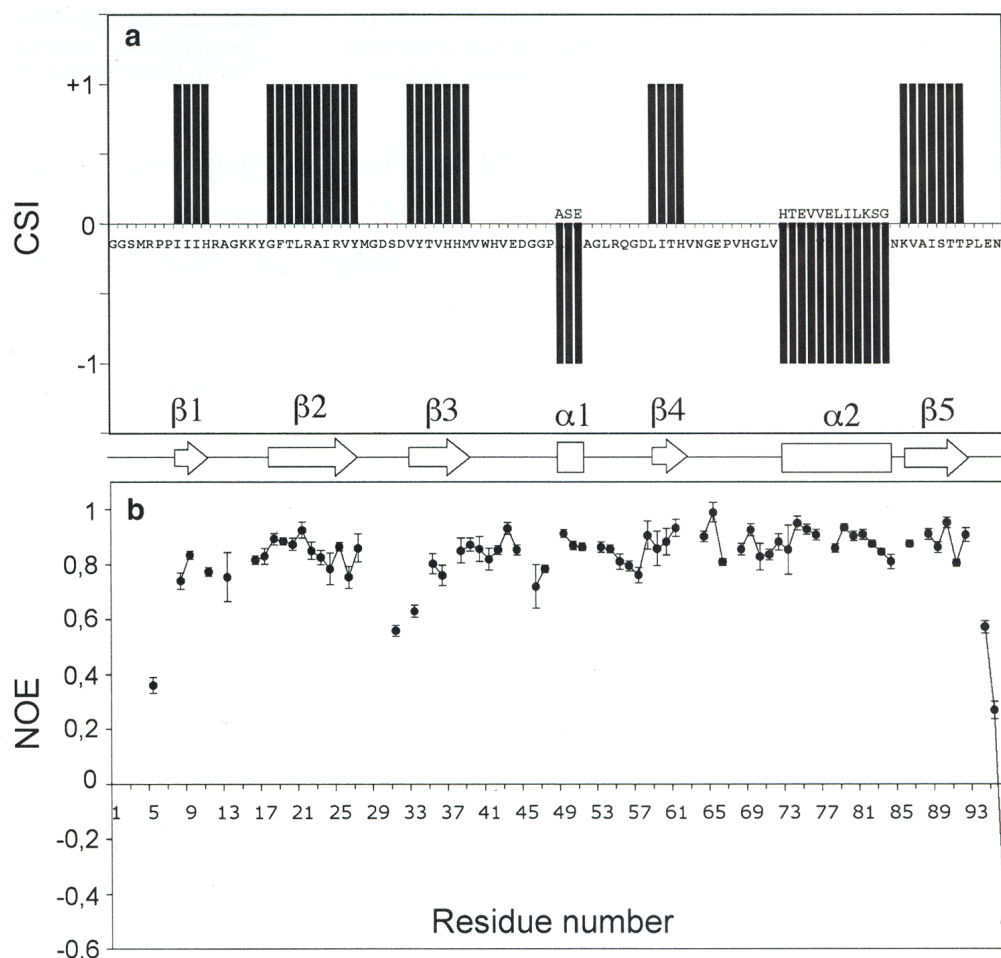
Perturbation of signal pathway of the infected cells constitutes a strategic target for microbes. PDZ-BS have been identified in several virus proteins associated with host cell subversion, including HTLV-1 (Rousset et al. 1998), adenovirus type 9, HPV (Lee et al. 2000) and influenza virus (Jackson et al. 2008). By studying the glycoprotein of rabies virus, we identified a PDZ-BS in the C-terminal of the cytoplasmic domain (Cyto-G). Glycoprotein of rabies virus has been found to control entry, egress and pathogenicity of this virus, in particular the viral glycoprotein is critical for death of infected cells (Prehaud et al. 2003). We postulated that the interactions between viral PDZ-BS and PDZ domains of cellular partners could play a major role in the phenotypes exhibited by the viral glycoprotein. Cellular protein partners of the Cyto-G were identified after screening of an adult human brain cDNA library with the yeast two-hybrid system (*Hybrigenics company*TM). The human microtubule associated serine threonine kinase 205 (MAST205) (Lumeng et al. 1999) containing a PDZ domain was one of the Cyto-G partners. MAST205-PDZ is classified as class I PDZ domains recognizing motifs S/T-X- ϕ (X, any amino acid; ϕ , hydrophobic). In class I PDZ domains, MAST205-PDZ displays a sequence identity of 24.5% with Shank-PDZ, and 27.4% and 29.4% with the PDZ domains 5 and 6, respectively, of MAGI2.

E. Terrien · C. Simenel · M. Delepierre · N. Wolff (✉)
Unité de Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules,
Département de Biologie Structurale et Chimie, CNRS URA
2185, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris
Cedex 15, France
e-mail: wolff@pasteur.fr

C. Prehaud · M. Lafon
Unité de Neuro-Immunologie Virale, Département de Virologie,
Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France

H. Buc
Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France

Fig. 2 **a** Secondary structure elements of MAST205-PDZ in complex with Cyto-G according to the CSI consensus resulting of the $C\beta$, $C\alpha$, CO and $H\alpha$ secondary chemical shifts. Arrows represent the β -strands and rectangles the helices; **b** ^1H - ^{15}N heteronuclear NOE of MAST205-PDZ in complex with Cyto-G (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 298 K)



residues A13, G14, D45 and G46 were weak, possibly reflecting the existence of chemical exchange effects on these two loops. About 97% and 98% of the $C\alpha$ and $C\beta$ were assigned, respectively. ^1H and ^{13}C chemical shifts were obtained for approximately 88% of the CH_n and aromatic side chains. The topology of PDZ domain is confirmed by $C\beta$, $C\alpha$, CO and $H\alpha$ chemical shifts with five β -strands and two helices (Fig. 2a). The ^1H - ^{15}N heteronuclear NOEs confirmed, with a mean root-mean-square deviation (rmsd) value of 0.81 ± 0.10 , an overall rigid structure of the complex on the fast NMR timescale (Fig. 2b). Highest NOE values are observed in the secondary structure elements and lowest NOE values in the N- and C-termini. In addition, loop β 2- β 3, involving in the interaction with the ligand, appears flexible on the ps-ns timescale.

Chemical shift assignments of MAST205-PDZ in complex with the viral peptide have been deposited in the BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) under accession number 155972.

Acknowledgements We thanks J. D'Alayer from Institut Pasteur Facility "Analyse et Microséquençage des Protéines" for mass spectrometry and microsequencing and V. Bondet, E. Frachon and

J. Bellalou from Institut Pasteur Facility "Production de Protéines recombinantes et d'Anticorps" for protein expression and purification. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-MIME Patho-PDZ). E. Terrien is recipient of a MRT fellowship.

References

- Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA (2008) A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(11):4381–4386. doi:10.1073/pnas.0800482105
- Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, Javier RT (2000) Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* 74(20):9680–9693. doi:10.1128/JVI.74.20.9680-9693.2000
- Lumeng C, Phelps S, Crawford GE, Walden PD, Barald K et al (1999) Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* 2(7):611–617. doi:10.1038/10165
- Nourry C, Grant SG, Borg JP (2003) PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE* 2003(179):RE7
- Prehaud C, Lay S, Dietzschold B, Lafon M (2003) Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. *J Virol* 77(19):10537–10547. doi:10.1128/JVI.77.19.10537-10547.2003

- Rousset R, Fabre S, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P (1998) The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene* 16(5):643–654. doi:10.1038/sj.onc.1201567
- Wishart DS, Sykes BD (1994) Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods Enzymol* 239:363–392. doi:10.1016/S0076-6879(94)39014-2

Annexe 2

(Publication)

Attenuation of Rabies Virulence: Takeover by the
Cytoplasmic Domain of Its Envelope Protein

Christophe Préhaud, Nicolas Wolff, Elouan Terrien *et al* (2010)

Attenuation of Rabies Virulence: Takeover by the Cytoplasmic Domain of Its Envelope Protein

Christophe Préhaud, Nicolas Wolff, Elouan Terrien, Mireille Lafage, Françoise Mégret, Nicolas Babault, Florence Cordier, Gene S. Tan, Elodie Maitrepierre, Pauline Ménager, Damien Chopy, Sylviane Hoos, Patrick England, Muriel Delepierre, Matthias J. Schnell, Henri Buc and Monique Lafon (19 January 2010) *Science Signaling* **3** (105), ra5. [DOI: 10.1126/scisignal.2000510]

The following resources related to this article are available online at <http://stke.sciencemag.org>.
This information is current as of 18 April 2012.

- Article Tools** Visit the online version of this article to access the personalization and article tools:
<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;3/105/ra5>
- Supplemental Materials** "Supplementary Materials"
<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;3/105/ra5/DC1>
- Related Content** The editors suggest related resources on *Science's* sites:
<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans;3/106/pc2>
- References** This article has been **cited by** 4 article(s) hosted by HighWire Press; see:
<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;3/105/ra5#BIBL>
- This article cites 35 articles, 19 of which can be accessed for free:
<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;3/105/ra5#otherarticles>
- Glossary** Look up definitions for abbreviations and terms found in this article:
<http://stke.sciencemag.org/glossary/>
- Permissions** Obtain information about reproducing this article:
<http://www.sciencemag.org/about/permissions.dtl>

VIRULENCE

Attenuation of Rabies Virulence: Takeover by the Cytoplasmic Domain of Its Envelope Protein

Christophe Préhaud,^{1,2,3*} Nicolas Wolff,^{1,4,5} Elouan Terrien,^{1,4,5} Mireille Lafage,^{1,2,3} Françoise Mégret,^{1,2,3} Nicolas Babault,^{1,4,5} Florence Cordier,^{1,4,5} Gene S. Tan,⁶ Elodie Maitrepierre,^{1,4,5} Pauline Ménager,^{1,2,3} Damien Chopy,^{1,2,3} Sylviane Hoos,^{1,7,5} Patrick England,^{1,7,5} Muriel Delepierre,^{1,4,5} Matthias J. Schnell,⁶ Henri Buc,¹ Monique Lafon^{1,2,3†}

(Published 19 January 2010; Volume 3 Issue 105 ra5)

The capacity of a rabies virus to promote neuronal survival (a signature of virulence) or death (a marker of attenuation) depends on the cellular partners recruited by the PDZ-binding site (PDZ-BS) of its envelope glycoprotein (G). Neuronal survival requires the selective association of the PDZ-BS of G with the PDZ domains of two closely related serine-threonine kinases MAST1 and MAST2. Here, we found that a single amino acid change in the PDZ-BS triggered the apoptotic death of infected neurons and enabled G to interact with additional PDZ partners, in particular the tyrosine phosphatase PTPN4. Knockdown of PTPN4 abrogated virus-mediated apoptosis. Thus, we propose that attenuation of rabies virus requires expansion of the set of host PDZ proteins with which G interacts, which interferes with the finely tuned homeostasis required for survival of the infected neuron.

INTRODUCTION

The virulence of a microbe is related to its capacity to invade host tissues and successfully promote its own replication and dissemination. Rabies virus (RABV), a neurotrophic virus that causes fatal encephalitis in mammals, has developed a unique strategy to ensure its propagation in the nervous system: Its virulence correlates with the ability of the infected neurons to survive. Attenuation of laboratory strains obtained in the search for candidate live vaccines is linked to their ability to trigger cell death (1). The differential commitment of an infected cell to death or survival likely involves the establishment of different sets of interactions with distinct endogenous signaling networks, a phenomenon that could depend on specific mutations in the RABV genome.

An early step in several viral infections involves the recruitment of large submembrane scaffolds inside the host cell (2, 3). The catalytic activity of such multiprotein complexes is often regulated through the integration of signals transmitted through their PDZ domains (4, 5). PDZ domains are globular structures, 80 to 100 amino acid residues in length, that contain a groove into which the C-terminal segment of a partner protein [that is, the PDZ-binding site (PDZ-BS)] inserts (6). Viruses such as human papillomavirus trigger severe perturbations in signaling pathways in host cells because the PDZ-BS of one of their viral proteins competes with endogenous PDZ-binding partners (2, 3, 7, 8). This process is sensitive to specific mutations in the viral genome (9). The envelope glycoprotein (G) of RABV is a key determinant of attenuation (1, 10–12). Its C-terminal sequence con-

tains a consensus sequence for a class 1 PDZ-BS, X-S/T-X-V/I/L_{COOH}. Sequences of PDZ-BSs vary among RABV strains that exhibit distinct phenotypes. Comparisons of isogenic viral strains that differ only in their PDZ-BSs could provide insight into the molecular basis of the opposing phenotypes of infected cells. Here, we examined whether altering this PDZ-BS could trigger the switch between the death and survival phenotypes of RABV-infected cells.

RESULTS

Characterization of the VIR and ATT strains of RABV

VIR and ATT are laboratory RABV strains that differed markedly in their capacities to cause fatal encephalitis in mice, a marker of virulence (Fig. 1A). The sequences of G in VIR and ATT differ at six positions, two of which map within the cytoplasmic domain of G (Cyto-G): a His→Leu (HL) mutation at position –33 and a Gln→Glu (QE) mutation at position –3, relative to the last amino acid residue of the C terminus, which is denoted as 0. The QE change introduces a mutation in the putative PDZ-BS, which is located at the C terminus of Cyto-G (Fig. 2A). The sequences of the putative PDZ-BS are Gln-Thr-Arg-Leu (QTRL) and Glu-Thr-Arg-Leu (ETRL) for the VIR and ATT strains, respectively. VIR and ATT also display distinct abilities to promote the survival or death of infected neurons in vitro (Fig. 1). VIR triggered a survival phenotype that was characterized by the protection of infected cells from apoptosis (Fig. 1B), a significant increase in the abundance of phosphorylated Akt (pAkt) (Fig. 1C), and a marked ability to sustain neurite outgrowth (Fig. 1, D and E, and Supplementary text). In contrast, ATT was devoid of these properties and instead triggered apoptosis of the infected neurons.

Characterization of recombinant RABVs

Isogenic recombinant RABVs (rRABVs) that express the corresponding full-length G envelope proteins (G-vir-HQ or G-att-LE) and rRABVs in which Cyto-G regions were exchanged (G-vir-LE and G-att-HQ) or in which PDZ-BSs were exchanged (G-vir-HE and G-att-LQ) were generated

¹Institut Pasteur, 75724 Paris, France. ²Unité de Neuroimmunologie Virale, Département de Virologie, Institut Pasteur, 75724 Paris, France. ³CNRS URA 3015, Institut Pasteur, 75724 Paris, France. ⁴Unité de Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules, Département de Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur, 75724 Paris, France. ⁵CNRS URA 2185, Institut Pasteur, 75724 Paris, France. ⁶Department of Microbiology and Immunology, and Jefferson Vaccine Centre, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107–5541, USA. ⁷Plateforme de Biophysique des Macromolécules et de leurs Interactions, Institut Pasteur, 75724 Paris, France.

*The author is on a 6-month visit to Thomas Jefferson University.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: monique.lafon@pasteur.fr

and characterized, as were rRABVs from which the PDZ-BSSs were deleted (G-vir-H Δ and G-att-L Δ) (Fig. 2A and Supplementary text). With the exception of the strain carrying G-att-LQ, in which replication and transcription rates were impeded (fig. S1), the growth of all of the recombinant viruses was satisfactory (Fig. 2, B and C). The strain carrying G-att-LQ was not included in this study.

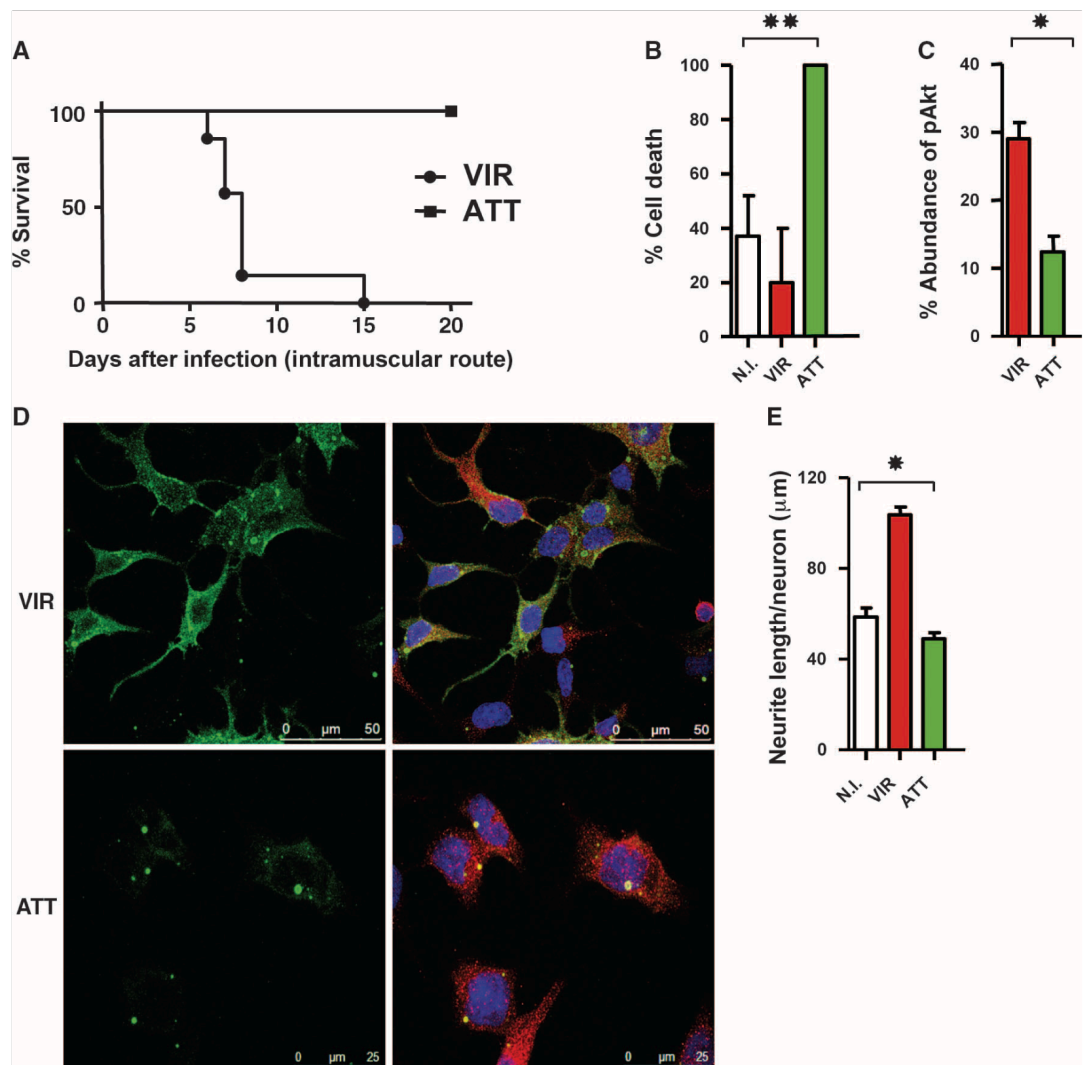
The PDZ-BS of G is involved in controlling the fate of infected neuronal cells and attenuation

Infection of the human neuroblastoma cell line SK-N-SH with the various rRABVs showed that (i) the distinct traits of the VIR and ATT strains were transferred with the mutations present in their respective Cyto-Gs (Fig. 3); (ii) the ability to trigger apoptosis in the infected cell required the presence of the Glu (E) residue (Fig. 3A); and (iii) full increases in the abundance of pAkt and in neurite outgrowth required the Gln (Q) residue (Fig. 3, B and C). Although deletion of the PDZ-BS attenuated growth and the production of G at the membrane in rRABV-infected human neuronal cell lines, neurite

outgrowth depended neither on the total abundance of G nor on the quantity of G that was associated with the membrane (Fig. 3D and Supplementary text). The Q residue was also required to keep neurites from retracting (fig. S2).

In addition, fluorescein isothiocyanate (FITC)-Tat-conjugated peptides corresponding to the last 13 amino acid residues of Cyto-G of vir-PDZ-BS (Tat-Cyto13-vir), att-PDZ-BS (Tat-Cyto13-att), or a disrupted PDZ-BS (Tat-Cyto12- Δ -vir) were synthesized and delivered into cells. In cells that had taken up these peptides, Tat-Cyto13-vir and Tat-Cyto13-att qualitatively caused traits similar to those observed in cells exposed to G-vir-HQ and G-att-LE, respectively (Fig. 3E). These phenotypes were lost when the PDZ-BS was disrupted in the injected peptide (Tat-Cyto12- Δ -vir). Injection of the PDZ-BS-containing peptides was therefore sufficient to trigger differential phenotypes, although we cannot exclude that the mutation at position -33 exerted a modulating effect. In addition experiments, cells were treated at an early stage with peptides corresponding to one particular strain after having been infected with a virus carrying a G envelope protein of the

Fig. 1. Cells infected with VIR or ATT RABVs are characterized by attenuation-apoptosis or virulence-neurosurvival phenotypes, respectively. (A) Six 6-week-old female OF1 Swiss mice were injected in the hind limbs with VIR or ATT RABVs (1×10^7 PFU per 100 μ l). Mortality was recorded daily and the Kaplan-Meier survival curves were established ($P = 0.001$ by log rank Mantel-Cox test). (B) Membrane permeation as a marker of apoptosis was measured in RABV-infected human neuroblastoma cells 48 hours after infection. Cell death is represented as a percentage of that in ATT-infected cells that represents 100% death. $**P = 0.003$, analysis of variance (ANOVA). N.I., not infected. (C to E) Assessment of neuronal survival in RABV-infected human neuroblastoma cells. (C) Measurement of the abundance of pAkt in cells 48 hours after infection. $*P = 0.001$, Student's t test. (D) The ability of RABV-infected cells (24 hours after infection) to undertake neurite growth was revealed by confocal microscopy analysis in which cells were labeled with an antibody against RABV nucleocapsid (green), an antibody against β III neuronal tubulin (red), and Hoechst 33342 to stain the nuclei. Top row, VIR-infected cells; bottom row, ATT-infected cells. (E) Sustained neurite outgrowth was assessed by measurement of the average length of neurites quantified at 24 hours after infection. $*P < 0.0001$, ANOVA. The data shown are representative of at least triplicate experiments.



other strain and the presence or absence of neurite outgrowth was recorded. It appeared that the resulting phenotype reflected the nature of the peptide rather than that of the virus, thus showing the dominant effect of the C-terminal peptide. In mice, a viral strain carrying Gln in Cyto-G was more virulent than those strains containing Glu, which identified again that Glu is a major attenuation factor (Fig. 3F). Thus, the putative PDZ-BS of G appears to be critical for determining whether the fate of infected cells is to die or survive and for controlling attenuation of the virus.

In contrast to Cyto-G-vir, Cyto-G-att has multiple PDZ-containing binding partners

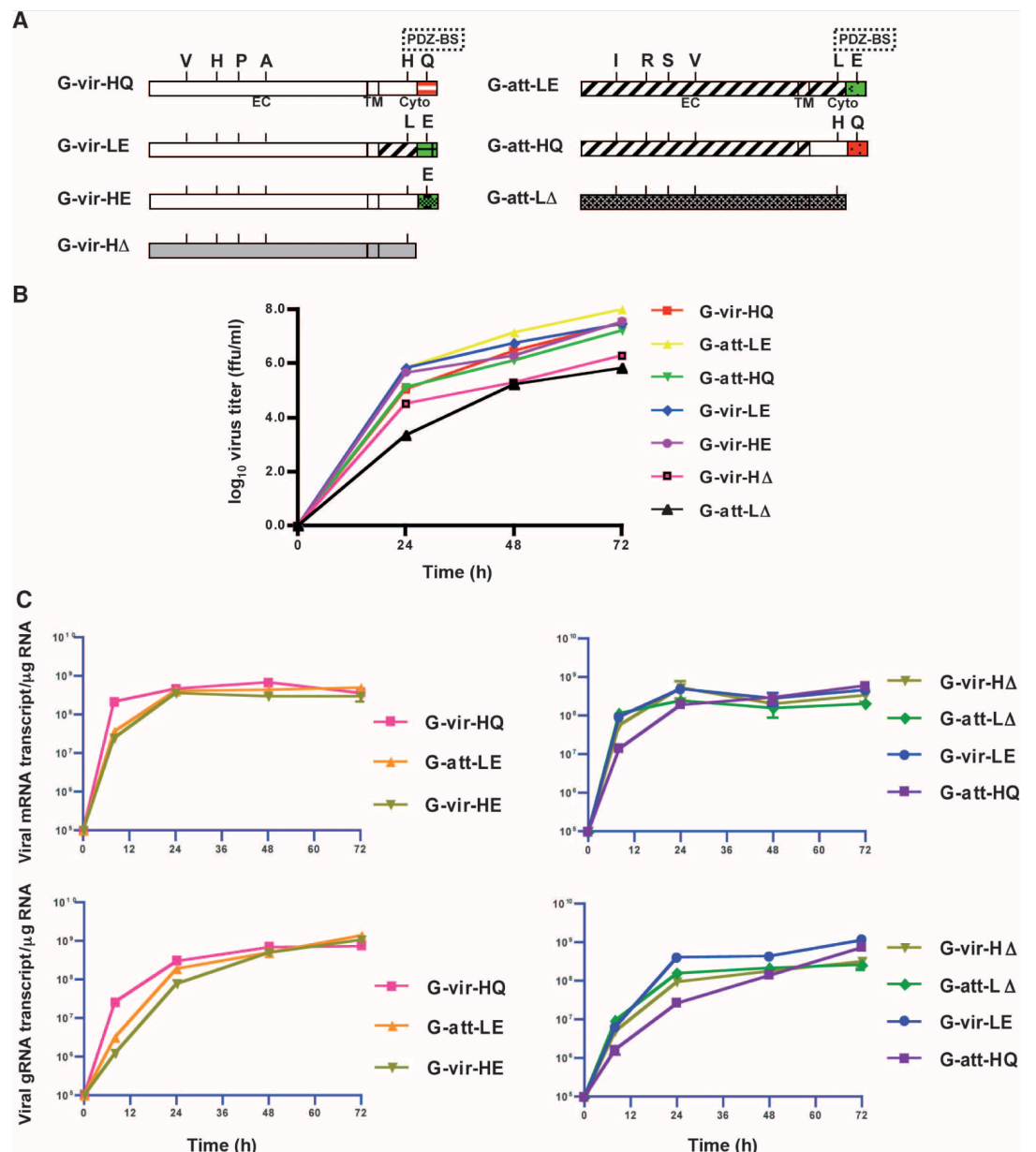
The cellular protein partners of G were identified in a high-throughput, two-hybrid screen of a human adult brain complementary DNA (cDNA) library with both isogenic Cyto-G proteins, which have distinct PDZ-BSs (QTRL

for VIR and ETRL for ATT), as baits (Fig. 4A). All of the binding partners that were detected contained PDZ domains, and disruption of the PDZ-BS by deleting the last amino acid residue (Cyto-G-Δ0) abolished all of the interactions. Cyto-G-QTRL interacted only with the PDZ domain of microtubule associated serine-threonine kinases 1 and 2 (MAST1 and MAST2) (13), two closely related isozymes. Replacement of Q with E to give Cyto-G-ETRL increased the number of interacting proteins to include three unrelated PDZ partners: the non-receptor protein tyrosine phosphatase 4 (PTPN4) (14), the tumor suppressor discs-large (DLG2), and the multi-PDZ domain scaffolding protein (MPDZ).

PTPN4-PDZ discriminates Cyto-Gs

The interactions of C-terminal peptides of the G envelope proteins containing the PDZ-BS (Cyto13-vir and Cyto13-att) (Fig. 4B) with MAST2-

Fig. 2. Analysis of rRABVs expressing the different PDZ-BSs of G. (A) Schematic representation of the two original RABV G envelope proteins (G-vir-HQ, G-att-LE) and of the five G variants (G-vir-LE, G-att-HQ, G-vir-HE, G-att-LΔ, and G-vir-HΔ) used in this study. (B) Single-step growth curves of the rRABVs in human neuroblastoma cells. Cells were infected with rRABVs at an MOI of 3 and viral production was assayed at the indicated time points. Results are presented as the mean numbers of focus-forming units (ffu) from three independent experiments. (C) Quantification of viral transcription (messenger RNA, mRNA) and replication (genomic RNA, gRNA) of the rRABVs by real-time RT-PCR in human neuroblastoma cells infected with rRABVs at an MOI of 3. Data are representative of three independent experiments. SDs were less than 5%.

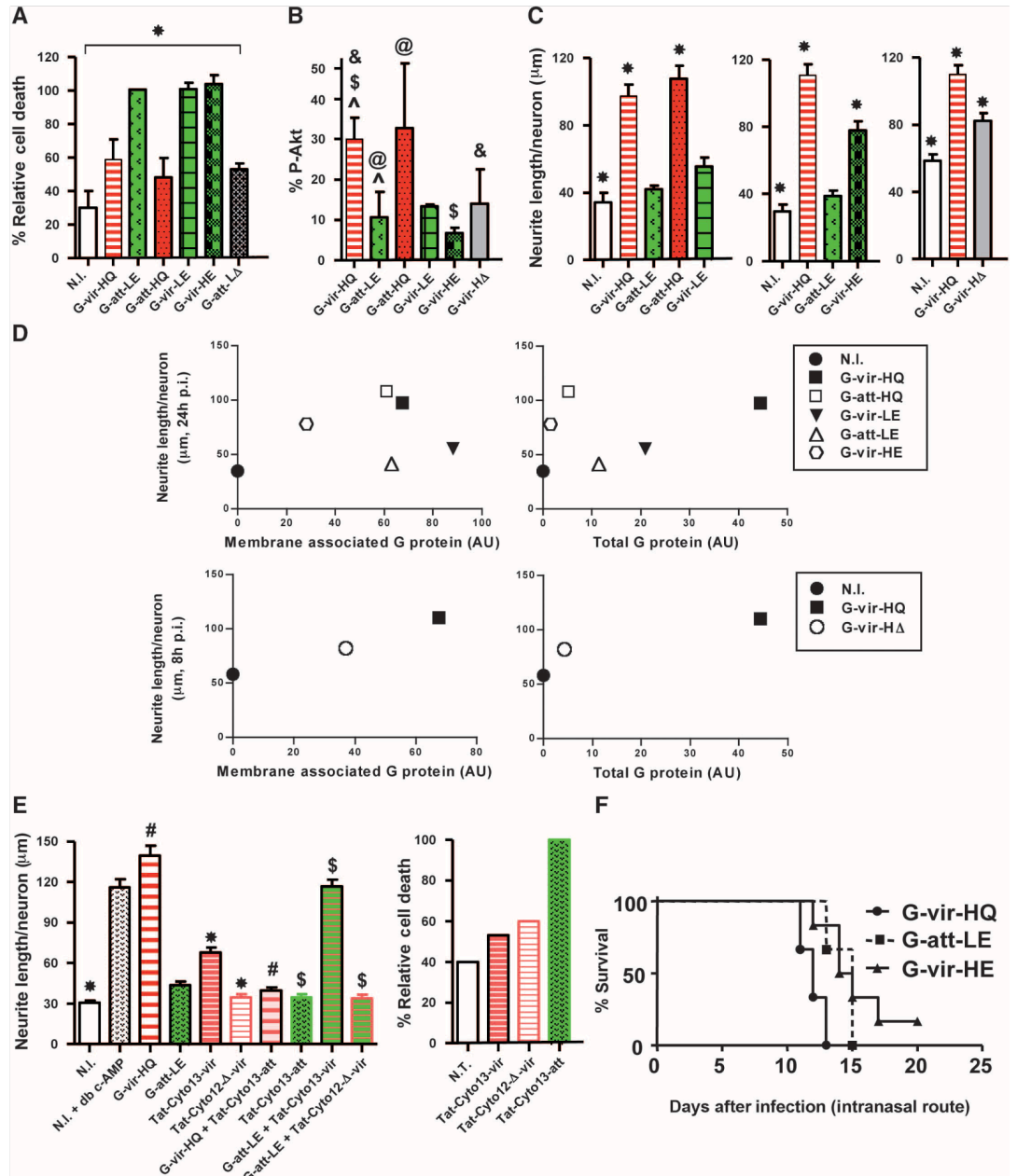


RESEARCH ARTICLE

PDZ and PTPN4-PDZ were analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC). MAST2-PDZ and PTPN4-PDZ adopt a typical PDZ fold. More chemical shift changes (in number and amplitude) were observed between the PTPN4-PDZ-Cyto13-vir and PTPN4-PDZ-Cyto13-att complexes (Fig. 4, C and D, right panels) than between the MAST2-PDZ-Cyto13-vir and MAST2-PDZ-Cyto13-att complexes (Fig. 4, C and D, left panels). The binding of MAST2-PDZ to Cyto13-vir induced only few chemical shift perturbations compared to those generated by the binding to Cyto13-att, and all

were located in the $\beta 2$ strand near the E/Q peptide mutation at position -3, reflecting a similar binding mode for the two peptides. In addition, measurement of the corresponding dissociation constants (K_D) showed that MAST2-PDZ bound to both peptides with similar affinities, comparable to those measured for the PDZ-BS of the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN), an interacting partner of MAST2-PDZ (Fig. 4E, left panel) (5). This lack of discrimination between peptides was confirmed when the affinities of MAST2-PDZ for Cyto-G peptides containing 44 residues (Cyto44-

Fig. 3. The nature of the PDZ-BS controls whether infected cells exhibit the attenuation-apoptosis or the virulence-neurosurvival phenotype. Human neuroblastoma cells were infected at an MOI of 3 with rRABVs, and apoptosis or survival phenotypes were monitored as assessed by measurement of the abundance of pAkt and the extent of neurite outgrowth. (A) The ETRL PDZ-BS is a key determinant in triggering neuronal apoptosis in an isogenic virus model, whereas the QTRL PDZ-BS (B and C) is mandatory for phosphorylation of Akt and outgrowth of neurites. (A) $^*P < 0.0001$, ANOVA. (B) $^{\wedge}P < 0.003$; $^{\$}P < 0.005$; $^{\&}P < 0.05$, $^{\textcircled{A}}P < 0.04$ (Student's *t* test). (C) $^*P < 0.0001$, ANOVA. (D) Correlation analysis of neurite outgrowth with the membrane association of G (left) or with the total abundance of G (right) were undertaken. AU, arbitrary unit. The Pearson's correlation coefficients (*r*s) were all less than 1, which indicates an absence of correlation, suggesting that the neurosurvival phenotype is linked to the sequence of G rather than to the accumulation of G. Data shown are representative of six experiments. (E) Delivery of Tat-conjugated, PDZ-BS-containing peptides drives neurite outgrowth, in the case of Tat-Cyto 13-vir, or apoptosis, in the case of Tat-Cyto13-att, and is a dominant phenotype. The cell death experiment is representative of three experiments. $^*P < 0.0001$ for N.I., Tat-Cyto13-vir, and Tat-Cyto12- Δ -vir; $^{\#}P < 0.0001$ for G-vir-HQ and G-vir-HQ + Tat-Cyto13-att; $^{\$}P < 0.0001$ for Tat-Cyto13-att, G-att-LE + Tat-Cyto13-vir, and G-att-LE + tat-Cyto12- Δ -vir. (F) Insertion of the ETRL PDZ-BS sequence into that of the G of a virus with the VIR genetic background (G-vir-HE) is sufficient to attenuate virulence of G-vir-HQ injected by intra-



nasal route. Results are presented as Kaplan-Meier survival curves. The log rank (Mantel-Cox) tests for G-vir-HQ compared to G-att-LE and for G-vir-HQ compared to G-vir-HE were both 0.005, indicating that they are statistically different.

att and Cyto44-vir) were determined. The two peptides bound with similar affinity to MAST2-PDZ with K_D values of 0.25 and 0.39 μM for Cyto44-att and Cyto44-vir, respectively. By contrast, for PTPN4-PDZ, the chemical shift perturbations induced by the E/Q change at position -3 in the peptide were much more pronounced and affected not only the β_2 strand but also the β_3 and β_4 strands and the α_2 helix (Fig. 4, C and D, right panels). The affinity of PTPN4-PDZ for Cyto13-att was substantially higher (fourfold) than its affinity for Cyto13-vir (Fig. 4E, right panel). These patterns of discrimination are in agreement with the NMR data, which showed more widespread conformational perturbations in the PTPN4-PDZ complexes than in those containing MAST2-PDZ (Fig. 4, C and D). Although the affinities of the peptides for PTPN4-PDZ were weaker than those for MAST2-PDZ, the values were consistent with those measured for the complex formed by PTPN4-PDZ and the PDZ-BS of the glutamate receptor NR2A (Fig. 4E, right panel), a functional interacting partner of PTPN4-PDZ (15). Binding of the Cyto-G peptide to both MAST2-PDZ and PTPN4-PDZ was abolished when the PDZ-BS was deleted (Cyto9- Δ) (Fig. 4E). These in vitro assays demonstrated the high affinity and indistinguishable specificity of MAST2-PDZ for the two PDZ-BSs and the discrimination in peptide recognition exhibited by PTPN4-PDZ. In conclusion, interaction with MAST2 alone is unlikely to explain the different cellular effects exerted by both Cyto-G proteins. Additional interactions achieved by the PDZ-BS of ATT, with PTPN4 in particular, might then be involved in the acquisition of an attenuation phenotype.

The cellular distribution of PTPN4 and MAST2 is affected by G

To analyze whether the interactions of the G envelope proteins with MAST2, PTPN4, or both modified their distribution in infected cells, the distribution of MAST2 and PTPN4 and their spatial interactions with G

during infection were analyzed by confocal microscopy (Fig. 5). In uninfected cells, MAST2 and PTPN4 were distributed uniformly throughout the cytoplasm (Fig. 5A). After infection with a virulent strain (G-vir-HQ) or an attenuated strain (G-att-LE), MAST2 redistributed to areas in which G accumulated, especially at the plasma membrane (arrows Fig. 5B). In contrast, PTPN4 and G exhibited distinct patterns of localization depending on the nature of the infecting viral strain (Fig. 5C). When cells were infected with G-vir-HQ, no substantial colocalization was noted (Fig. 5C, arrowheads), whereas the distributions of PTPN4 and G largely overlapped after infection with G-att-LE (Fig. 5C, arrows). Relocalization patterns of both MAST2 and PTPN4 at the membrane were lost when infection involved a virus containing a G in which the PDZ-BS had been deleted, G-att-L Δ (Fig. 5, B and C, arrowheads) or G-vir-H Δ (Fig. 5B, arrowheads). The cellular localizations of MAST2 and PTPN4 were consistent with the two-hybrid and biophysical results, implying no discrimination by MAST2 between both G proteins and a specific interaction of PTPN4 with the G protein of an attenuated strain of the virus.

The interaction between PTPN4 and G is required for RABV-mediated apoptosis

To determine whether the specific interaction between the PDZ-BS of the attenuated RABV strain and PTPN4-PDZ was sufficient to trigger apoptosis, expression of *PTPN4* was silenced in Cos-7 cells (Fig. 6A). In the absence of infection, the percentage of control cells that underwent apoptosis was low. In contrast, this percentage was significantly increased ($P < 0.03$) in cells in which PTPN4 was knocked down (Fig. 6A). The ability of ATT to trigger apoptosis in control cells was lost in PTPN4-silenced cells (Fig. 6B), whereas the VIR strain did not trigger apoptosis in control cells or in cells in which PTPN4 was knocked down (Fig. 6B). The first observation suggests that PTPN4 is an inhibitor of apoptosis, whereas the second observation indicates that the interaction between

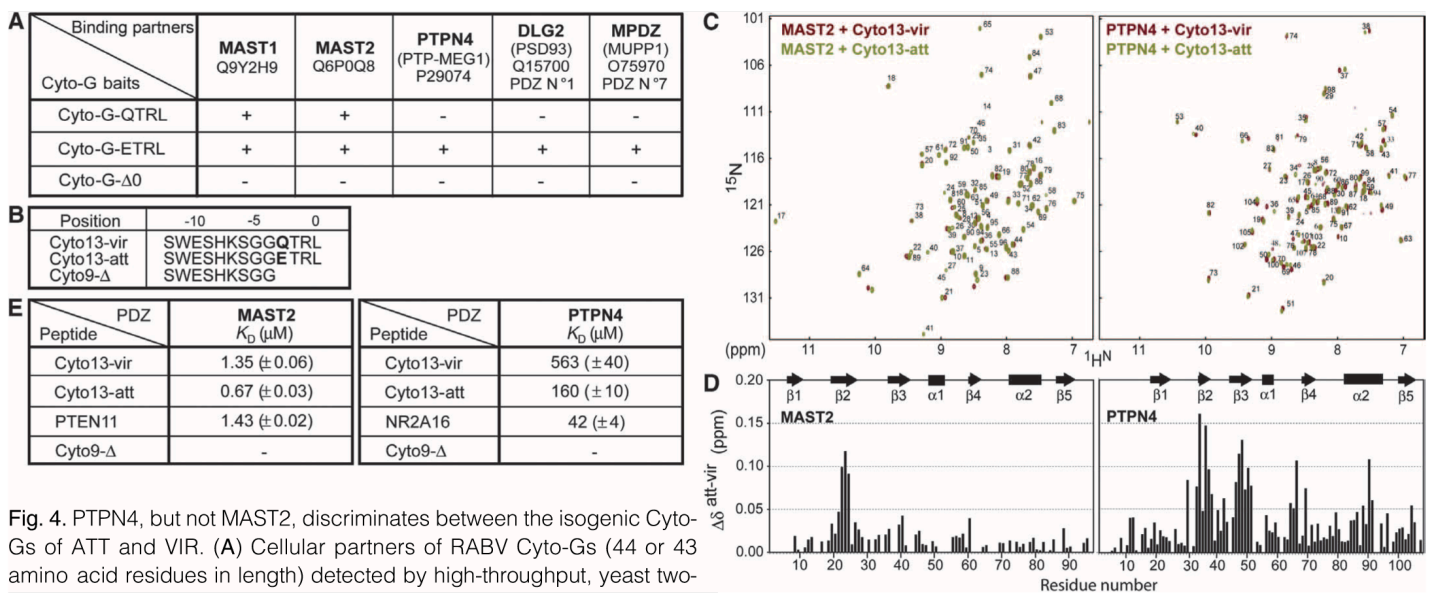


Fig. 4. PTPN4, but not MAST2, discriminates between the isogenic Cyto-Gs of ATT and VIR. (A) Cellular partners of RABV Cyto-Gs (44 or 43 amino acid residues in length) detected by high-throughput, yeast two-hybrid analysis. UniProt accession numbers are given for the binding partners. (B) Peptide sequences selected for biophysical analysis. (C) Superposition of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of MAST2-PDZ (left) and PTPN4-PDZ (right) in complex with Cyto13-vir (red peaks) and Cyto13-att (green peaks). (D) Backbone amide chemical shift differences versus residue number for MAST2-PDZ (left) and PTPN4-PDZ (right) in complex with Cyto13-vir and Cyto13-att. Secondary-structure elements of MAST2-PDZ

and PTPN4-PDZ in complex with Cyto13-att, according to the Chemical Shift Index Consensus, are shown at the tops of the panels. (E) Dissociation constants (K_D) for the binding of Cyto13-vir, Cyto13-att, Cyto9- Δ , and control peptides (PTEN11 and NR2A16) to MAST2-PDZ [determined by ITC; \pm SE] and to PTPN4-PDZ (determined by NMR; \pm SD over 10 ^1H - ^{15}N resonances); -, no binding.

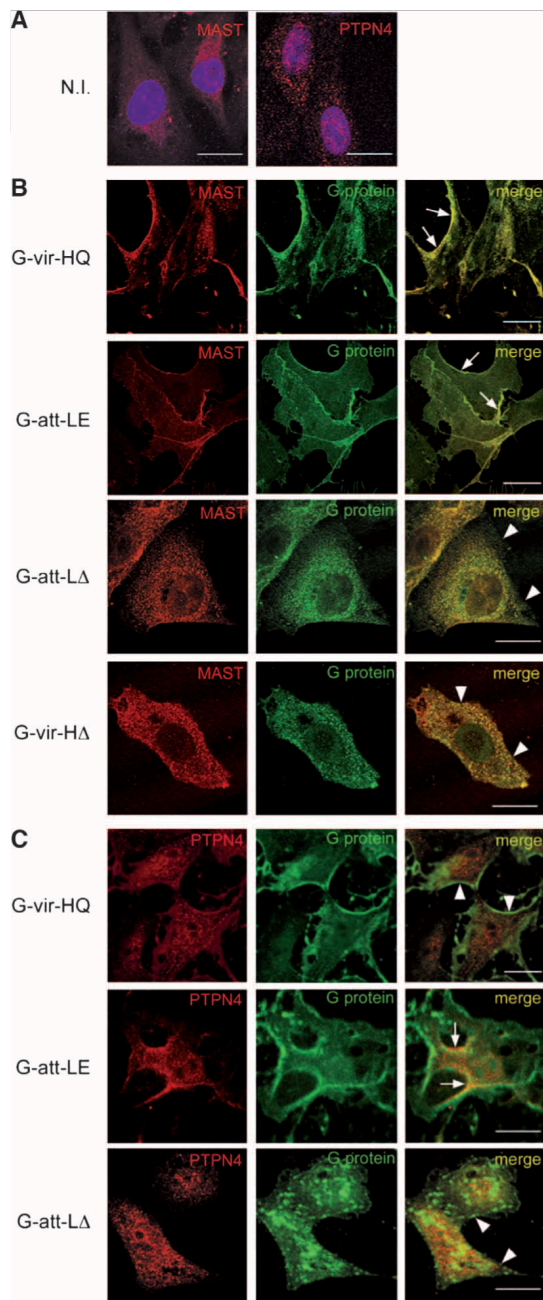


Fig. 5. G relocates its two main partners PTPN4 and MAST2 through its PDZ-BS. **(A)** The distributions of MAST2 (red) and PTPN4 (red) were detected by confocal microscopy in uninfected neuroblastoma cells. Nuclei are in blue (Hoechst 33342). **(B)** The distribution of MAST2 was detected after infection of cells with G-vir-HQ, G-att-LE, G-att-L Δ , or G-vir-H Δ . Mander's coefficients of colocalization were 0.6 for G-att-LE, 0.56 for G-att-L Δ , and 0.37 for G-vir-H Δ . **(C)** The distribution of PTPN4 was detected after infection with G-vir-HQ, G-att-LE, or G-att-L Δ . RABV G is shown in green. Scale bars, 20 μ m. Mander's coefficients of colocalization were 0.37 for G-vir-HQ, 0.8 for G-att-LE, and 0.65 for G-att-L Δ . Arrows show colocalization; arrowheads denote the absence of colocalization. Data are representative of at least three independent experiments.

PTPN4 and Cyto-G is necessary for RABV-mediated apoptosis of infected cells.

DISCUSSION

Here, we have identified MAST2 and PTPN4 as key neuronal partners of virulent and attenuated RABV strains, respectively. These proteins exert opposing effects on the fate of uninfected neurons. Silencing the expression of *MAST2* enhances neurite outgrowth and protects against retraction (16). Conversely, as shown here, silencing the expression of *PTPN4* markedly increases neuronal apoptosis. Infection of cells by VIR or ATT strains of RABV appears to be phenotypically equivalent to silencing *MAST2* or *PTPN4*, respectively. Thus, we propose that the PDZ-BSs of VIR and ATT G envelope proteins compete with the endogenous partners of MAST2-PDZ and PTPN4-PDZ, thereby disrupting the normal function of MAST2 and PTPN4 (Fig. 6C). Furthermore, the commitment of a RABV-infected neuron to survive or die depends on the PDZ-BS contained in the G of the infecting RABV.

Specific recognition of the PTPN4-PDZ domain by an ETRL-containing PDZ-BS had a dual effect. Not only did it interfere with the antiapoptotic function of PTPN4, it also “shunted” the intrinsic ability of its carrier virus to stimulate neurite outgrowth, neuronal plasticity, and ultimately survival. This “takeover” mechanism operated through a single Gln \rightarrow Glu (QE) change, which increased the number of its PDZ domain-containing partners and led to the attenuation of RABV virulence. A somewhat similar mechanism affects the virulence of influenza virus strains (17, 18); in this case, the number of PDZ-interacting partners of the NS1 protein in the highly virulent avian strain of influenza is increased dramatically compared to that of a less pathogenic strain.

It is unlikely that simple competition effects that act at the level of both PDZ domains could account for such a drastic shift in outcome; however, MAST and PTPN4 also have catalytic domains that covalently modify the ligands that they recognize at their respective PDZ domains. The chemical events that they trigger, phosphorylation and dephosphorylation, are different. Hence, MAST and PTPN4 could modify their endogenous bound ligands at two different loci, X and Y. As is often the case, covalent changes exerted at the catalytic sites could then irreversibly fix an initial discrimination exerted at the level of their respective PDZ (Fig. 6C).

Thus, for RABV, virulence does not simply require the subversion of a signaling pathway in the infected cell through the displacement of a crucial interacting partner of the MAST2 PDZ; the virulent RABV strains have also evolved to minimize perturbations of other essential signaling networks. Restoration of such spurious interference attenuates the virulence of RABV efficiently. Because RABV-dependent apoptosis leads to immunopotentiality (19), the findings described here open new avenues of thought for the generation of highly attenuated RABV vaccines through the use of reverse genetics technology.

MATERIALS AND METHODS

Cells, viruses, molecular clones, and synthetic peptides

The attenuated [ATT, American Type Culture Collection (ATCC) #vr332] and the virulent (VIR, ATCC #vr959) laboratory strains of RABV and the cloning of the genes encoding their respective G envelope proteins have been previously described (1). The GenBank accession numbers of the Gs from the ATT and VIR strains are AF 406693 and AF 406694, respectively. The human neuroblastoma cell lines SK-N-SH (ATCC, HTB-11) and

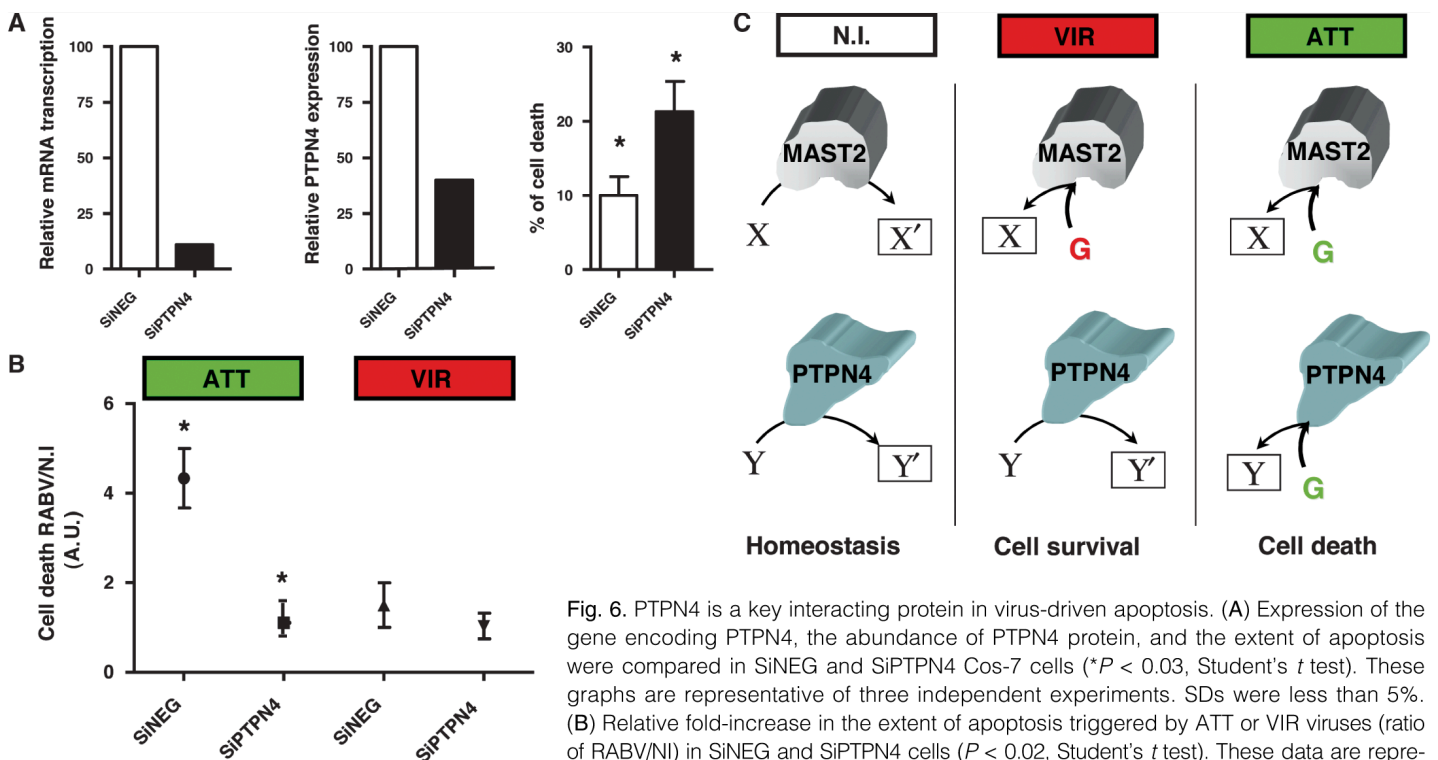


Fig. 6. PTPN4 is a key interacting protein in virus-driven apoptosis. (A) Expression of the gene encoding PTPN4, the abundance of PTPN4 protein, and the extent of apoptosis were compared in SiNEG and SiPTPN4 Cos-7 cells ($*P < 0.03$, Student's *t* test). These graphs are representative of three independent experiments. SDs were less than 5%. (B) Relative fold-increase in the extent of apoptosis triggered by ATT or VIR viruses (ratio of RABV/NI) in SiNEG and SiPTPN4 cells ($P < 0.02$, Student's *t* test). These data are representative of three experiments. (C) Scheme presenting the molecular mechanisms through

which the PDZ-BS of the G envelope proteins function as competitors of the natural substrates of MAST and PTPN4 (X and Y, respectively) to control the attenuation of RABV strains. In the absence of infection, X and Y are converted into X' and Y', respectively. Homeostasis would result in part from the balanced effects of both metabolites X' and Y'. During infection of cells with VIR, binding of the PDZ-BS from the VIR strain of RABV to the PDZ domain of MAST would prevent the modification of X into X', and, as observed after knockdown of MAST, would put the cell onto a path to survival. During infection with ATT, binding of the PDZ-BS of the ATT strain of RABV to both MAST and PTPN4 would prevent not only the modification of X into X' but also the modification of Y into Y'. Dominance of the effect of Y on the effect of X would lead to the commitment of the infected cell to cell death. In this scheme, the apoptotic fate is dominant over that of survival.

a subclone of SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) (16) were used in this study. Peptides containing the last 13 or 12 amino acid residues of Cyto-G were conjugated to the cell membrane transduction domain of the HIV-1 Tat protein, YGRKKRRQRRR (20); Tat-conjugated peptides can cross the blood-brain barrier and plasma membrane. For detection in cells, the peptides were labeled at their N-termini with FITC. The sequences of the peptides are as follows. FITC-TAT-Cyto-13-att, $C_{21}H_{11}NO_5S$ -YGRKKRRQRRR-SWEHKSGGETRL_{COOH}; FITC-TAT-Cyto13-vir, $C_{21}H_{11}NO_5S$ -YGRKKRRQRRR-SWEHKSGGQTRL_{COOH}; and FITC-TAT-Cyto12-Δ-vir, $C_{21}H_{11}NO_5S$ -YGRKKRRQRRR-SWEHKSGGQTR_{COOH} (20).

Infections of mice

Groups of six 6-week-old female OF1 Swiss mice (25 to 27 g in weight) were injected by intramuscular route (for ATT and VIR strains) with 1×10^7 plaque-forming units (PFU) per 100 μl in the hind limbs or by intranasal route (for G-vir-HQ, G-att-LE, and G-vir-HE rRABVs) under slight anesthesia (isoflurane) with 1×10^4 PFU of rRABV in 10 μl RPMI 1640 medium containing 2% horse serum, as described previously (21, 22). Mortality was recorded daily. Data are presented as Kaplan-Meier survival curves.

Measurement of apoptosis

Membrane permeation, a marker of apoptosis, was measured by detecting either the exposure of phosphatidylserine at the outer side of the plasma

membrane with FITC-conjugated annexin V (R&D) or the passage of Hoechst 33342 (Sigma), a marker of nuclei, through the plasma membrane. Forty-eight hours after infection, RABV-infected cells and uninfected control cells were harvested without fixation or permeabilization and were treated with FITC-conjugated annexin or with Hoechst 33342. Detection of apoptosis in cells treated with FITC-Tat-conjugated peptides for 6 hours was performed by incubation with propidium iodide. Percentages of fluorescent cells were determined by flow cytometry with a FACSCalibur (BD Biosciences). Results were analyzed with CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Measurement of Akt phosphorylation in RABV-infected cells by flow cytometry

Cells that were infected with RABV for 48 hours were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) containing Ca^{2+} and Mg^{2+} (PBS $Ca^{2+}Mg^{2+}$), scraped, and pelleted (at 900g for 5 min at 4°C) in staining buffer (SB) [PBS, 1% inactivated fetal bovine serum (FBS), and 0.1% sodium azide (pH 7.5)]. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 30 min at 4°C and resuspended in permeabilization buffer (PB) (PBS, 1% FBS, 0.1% sodium azide, and 0.1% saponin). Cells were incubated with a mouse monoclonal antibody (mAb) (8-2) against G (23) and a rabbit antibody against pAkt (phosphorylated at Ser⁴⁷³) (Cell Signalling #9271) followed by a biotinylated antibody against mouse immunoglobulin G (IgG) and, finally, with R-phycoerythrin (PE)-conjugated

streptavidin and Alexa Fluor 488–conjugated antibody against rabbit IgG. Cells were then washed with PB and resuspended in CellFIX (BD Biosciences, USA) for analysis by flow cytometry.

High-throughput assays of neurite outgrowth and retraction

Neurite outgrowth and retraction assays were performed as previously described (16). Briefly, SH-SY5Y cells were seeded on 24-well plates (Cell Bind plastic ware, Corning) in nondifferentiating medium [Dulbecco's modified Eagle's medium–Ham's F12 (DMEMF12) (Invitrogen) with 20% FBS, 1% penicillin and streptomycin, and 1% glutamine] and cultured overnight at 37°C. Twenty-four hours after seeding, cells were either left uninfected or were infected with RABVs at a multiplicity of infection (MOI) of 3 in differentiating medium [neurobasal medium (Invitrogen) with B27 supplement (Invitrogen), 1% penicillin and streptomycin, and 1% glutamine]. Twenty-four hours (or alternatively 8 hours for experiments with G-vir-HA) after infection, cells were processed and incubated with antibody (Promega, # G7121) against neuronal-specific β III tubulin, antibody against RABV nucleocapsid (Bio-Rad, #72114), and Hoechst 33342. Alternatively, cells were also incubated with crystal violet to visualize neurite processes. Retraction assays were performed as mentioned above except for the addition of 10 μ M lysophosphatidic acid (Sigma) to the differentiating medium. Cells were imaged with a Leica DM 5000B UV microscope equipped with a DC 300FX camera ($\times 40$ or $\times 20$ objectives) and analyzed with ImageJ 1.38X Software (W. Rasband, National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and the NeuronJ plug-in (24). The average length of neurites per neuron was determined from triplicate experiments.

Synthetic peptide assays

Monolayers of SK-N-SH cells (4×10^5 per well of a 24-well plaque) that had been cultured for 24 hours were treated with peptides (20 μ M in culture medium) and apoptosis was analyzed after 6 hours. For neurite outgrowth assays, SH-SY5Y cells were either infected with rRABVs or left uninfected as described earlier. Two hours after infection, cells were treated with 50 μ M peptide solutions in culture medium and high-throughput neurite outgrowth assays were carried out as described earlier. Cells treated with 1 mM dibutyryl cyclic adenosine 5'-monophosphate (16) were included as controls.

Recovery of recombinant viruses and viral characterization

The RABV G envelope protein is a 524–amino acid residue, type I transmembrane glycoprotein that forms the trimeric spikes of the viral envelope and is associated with the plasma membrane and cytoplasmic membranes of infected neuronal cells. Mature G contains three domains: the ectodomain (EC), a transmembrane domain (TM), and a cytoplasmic domain (Cyto) (Fig. 2A). The genes of ATT and VIR that encode G were manipulated according to standard cloning procedures (25). Site-directed mutagenesis was undertaken with the QuickChange multisite-directed mutagenesis kit (Stratagene). The recovery of recombinant viruses and the assessment of their biological properties (growth, transcription, replication, and spread assay) were performed as described previously (22, 26, 27). Genes encoding G in all of the recombinant viruses were sequenced to confirm their identities and the absence of any other mutations. The eight constructs consist of full-length G-vir-HQ and G-att-LE, both end-swap mutants (G-vir-LE and G-att-HQ), both PDZ-BS–deleted mutants (G-vir-HA and G-att-LA), and the PDZ-BS swap mutants (G-vir-HE and G-att-LQ) (Fig. 1B). G-att-LQ could not be validly used in this study because its low replication rate considerably slowed the appearance of a measurable physiological phenotype in infected cells and therefore made comparison with the other rRABVs at any time point difficult (fig. S1). Quantification of the abundance of G in

infected cells was performed either by flow cytometry (in the case of cytoplasmic membrane-associated G) with a mAb (6-15-C4) against G (28) or by Western blotting analysis (to assess the total amount of G) with a mAb (8–2) against G according to methods published elsewhere (1, 29).

Yeast two-hybrid analyses

Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics (<http://www.hybrigenics-services.com>). The coding sequences for amino acid residues 1 to 44 of Cyto-G-QTRL, Cyto-G-ETRL, or Cyto-G- $\Delta 0$ were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and subcloned into pB27 as a C-terminal fusion to LexA (N-LexA-bait-C). The corresponding constructs were checked by sequencing and used as baits to screen a randomly primed human adult brain cDNA library constructed in pP6 [pB27 and pP6 derived from the original pBTM116 (30, 31) and pGADGH (32) plasmids, respectively]. Clones (54, 68, and 61 million, five- to sevenfold the complexity of the library) were screened for Cyto-G-QTRL, Cyto-G-ETRL, or Cyto-G- $\Delta 0$, respectively, by a mating approach with Y187 (*mat α*) and L40 Δ Gal4 (*mat α*) yeast strains as previously described (33). A total of 29, 62, and 47 His⁺ colonies in the screening for Cyto-G-QTRL, Cyto-G-ETRL, and Cyto-G- $\Delta 0$, respectively, were selected on medium lacking tryptophan, leucine, and histidine. The prey fragments of the positive clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. The resulting sequences were used to identify the corresponding interacting proteins in the GenBank database (National Center for Biotechnology Information) through a fully automated procedure. A confidence score [predicted biological score (PBS)] was attributed to each interaction as previously described (31).

Sample preparation for NMR and ITC studies

The coding sequences of MAST2-PDZ and PTPN4-PDZ were inserted as N-terminal glutathione S-transferase–tagged proteins in a pDEST15 expression plasmid (Gateway System, Invitrogen). The vectors were used to transform *Escherichia coli* BL21 (DE3) star cells (Invitrogen). Unlabeled MAST2-PDZ and PTPN4-PDZ were produced in Luria-Bertani (LB) medium and uniformly ¹⁵N/¹³C- or ¹⁵N-labeled samples were produced in M9 minimal medium containing ¹⁵NH₄Cl with or without 2.0 g/liter [¹³C]glucose as the sole nitrogen and carbon sources. Proteins were expressed and purified as previously described (34). Viral peptides (Cyto13-att, Cyto13-vir, and Cyto9- Δ), NR2A16 (SNRRVYKKMPSIESDV) peptide, and PTEN11 (SWDEDQHTQITKV) (20) peptide were synthesized in solid phase by an Fmoc strategy (Covalab). All samples were prepared in a buffer containing 50 mM tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and a protease inhibitor cocktail (Roche) with the addition of 2 mM dithiothreitol (DTT) for the PTPN4-PDZ-peptides solutions. D₂O (12%) was added to NMR samples.

NMR experiments

NMR experiments were recorded at 298 K on a Varian Inova 600-MHz spectrometer equipped with a cryogenically cooled triple-resonance pulsed field gradient probe. The ¹HN, ¹⁵N, C α , C β and CO resonance assignments of PTPN4-PDZ (0.4 mM PTPN4-PDZ: 2 mM Cyto13-att) were based on standard heteronuclear three-dimensional experiments. ¹H-¹⁵N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra were recorded with MAST2-PDZ at a final concentration of 0.8 mM with viral peptides (at a PDZ/peptide ratio of 1:2), and with PTPN4-PDZ at a final concentration of 0.16 mM mixed with Cyto13-vir or Cyto13-att peptides at ratios of 1:19 and 1:10, respectively. For titrations, NMR samples initially contained 0.16 mM U-¹⁵N-labeled PTPN4-PDZ. Unlabeled peptide was added stepwise to a final PDZ/peptide ratio of 1:19 or 1:10 for Cyto13-vir and Cyto13-att peptides, respectively. The final peptide concentrations were

2.1 and 1.1 mM, respectively. ^1H - ^{15}N HSQC spectra were recorded at 11 different titration points. Average (^1H , ^{15}N) chemical shift changes were calculated as $\Delta\delta_{\text{av}} = [(\Delta\delta_{\text{H}})^2 + (\Delta\delta_{\text{N}} \times 0.159)^2]^{1/2}$. The dissociation constants of the respective complexes (K_{D}) were obtained by fitting the titration data with a model assuming a 1:1 complex formation and with nonlinear regression.

ITC

ITC measurements were made with a VP-ITC calorimeter (MicroCal). MAST2-PDZ was titrated at 298 K by 25 to 45 consecutive injections of 5- to 7- μl aliquots of the peptides at 6-min intervals. Raw data were normalized and corrected for the heats of dilution of the peptides. Equilibrium dissociation constants were determined by performing nonlinear curve fitting of the corrected data to a model with one set of sites with Origin7.0 software (OriginLab).

Immunocytochemistry

RABV- and mock-infected cells were washed once with PBS containing Ca^{2+} and Mg^{2+} , fixed with 4% PFA for 30 min at room temperature, washed again, and treated with gelatin (1% in water) for 5 min at 4°C. Samples were incubated for 20 min at room temperature in 0.3% Triton X-100 in PBS, and surface IgG receptors were blocked with saturating buffer (PBS containing 2% bovine serum albumin and 5% FBS) for 30 min at room temperature followed by a 10-min incubation at 4°C with Fc block (at a 1:50 dilution). MAST2 was detected with a goat antibody (Santa Cruz #55852) against the C terminus of MAST2 for 2 hours at room temperature followed by incubation with an Alexa Fluor 488-conjugated antibody against goat IgG. PTPN4 was detected with a rabbit antibody against the synthetic PTPN4 peptide (NH_2 -CEGFVKPLTTSTNK-COOH) followed by an Alexa Fluor 488-conjugated antibody against rabbit IgG. G envelope protein was detected with a mouse mAb (6-15-C4) against G followed by an Alexa Fluor 594-conjugated antibody against mouse IgG. Primary and secondary antibodies were diluted in saturating buffer. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Slides were washed with PBS containing Ca^{2+} and Mg^{2+} , and water was used for the last wash. Coverslips were mounted in Fluoromount-G or ProLong Gold Antifade reagent (Southernbiotech and Invitrogen, respectively). Confocal microscopy images were acquired with a Zeiss LSM 510 META (version 3.2) on an Axiovert 200M microscope with a Plan Apochromat 63 \times and numerical aperture 1.4 objective. Confocal images were compiled from serial Z stacks 0.3- μm apart, representing at least two experiments. Colocalization of G with MAST2 or PTPN4 was analyzed with the colocalization finder and the threshold plug-in Jacop of ImageJ (35). Manders' colocalization coefficients (36) with automatic threshold were determined and validated with the van Steensel test (37).

Knockdown of PTPN4

Cos-7 cells (ATCC, CRL-1651) were electroporated (nucleofected) with a nucleofector (amaxa Nucleofector Technology) with a BLOCK-i Pol II miR RNAi Expression Vector kit (Invitrogen) specific for *PTPN4* (NM_002830.2_3451). A stable cell line that was isolated after treatment with blasticidin was used for the silencing experiment (SiPTPN4 cells). The plasmid pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR-neg was used as a negative control (to generate SiNEG cells). Silencing of the expression of *PTPN4* was assessed by quantitative real-time reverse transcription PCR (Q-RT-PCR) and flow cytometry analysis as described previously (29).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/3/105/ra5/DC1
Supplementary Text

Fig. S1. G-att-LQ exhibits defective transcription and replication.

Fig. S2. The PDZ-BS is also a critical factor for neurite protection (neurosurvival).

Fig. S3. Comparison of the spreading of G-vir-HE, G-vir-HQ and G-att-LE rRABVs in culture.

References

REFERENCES AND NOTES

1. C. Préhaud, S. Lay, B. Dietzschold, M. Lafon, Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. *J. Virol.* **77**, 10537–10547 (2003).
2. K. K. Frese, S. S. Lee, D. L. Thomas, I. J. Latorre, R. S. Weiss, B. A. Glaunsinger, R. T. Javier, Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein. *Oncogene* **22**, 710–721 (2003).
3. I. J. Latorre, M. H. Roh, K. K. Frese, R. S. Weiss, B. Margolis, R. T. Javier, Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **118**, 4283–4293 (2005).
4. M. C. Subauste, P. Nalbant, E. D. Adamson, K. M. Hahn, Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein β -catenin with the scaffolding protein MAGI-2. *J. Biol. Chem.* **280**, 5676–5681 (2005).
5. M. Valiente, A. Andrés-Pons, B. Gomar, J. Torres, A. Gil, C. Tapparel, S. E. Antonarakis, R. Pulido, Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J. Biol. Chem.* **280**, 28936–28943 (2005).
6. A. Y. Hung, M. Sheng, PDZ domains: Structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem.* **277**, 5699–5702 (2002).
7. S. S. Lee, B. Glaunsinger, F. Mantovani, L. Banks, R. T. Javier, Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* **74**, 9680–9693 (2000).
8. R. Rousset, S. Fabre, C. Desbois, F. Bantignies, P. Jalinet, The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene* **16**, 643–654 (1998).
9. M. H. Noteborn, D. Todd, C. A. Verschuere, H. W. de Gauw, W. L. Curran, S. Veldkamp, A. J. Douglas, M. S. McNulty, A. J. van der Eb, G. Koch, A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J. Virol.* **68**, 346–351 (1994).
10. M. Faber, R. Pulmanausahakul, S. S. Hodawadekar, S. Spitsin, J. P. McGettigan, M. J. Schnell, B. Dietzschold, Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* **76**, 3374–3381 (2002).
11. K. Morimoto, D. C. Hooper, S. Spitsin, H. Koprowski, B. Dietzschold, Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* **73**, 510–518 (1999).
12. M. I. Thoulouze, M. Lafage, V. J. Yuste, L. Baloul, L. Edelman, G. Kroemer, N. Israel, S. A. Susin, M. Lafon, High level of Bcl-2 counteracts apoptosis mediated by a live rabies virus vaccine strain and induces long-term infection. *Virology* **314**, 549–561 (2003).
13. C. Lumeng, S. Phelps, G. E. Crawford, P. D. Walden, K. Barald, J. S. Chamberlain, Interactions between β 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat. Neurosci.* **2**, 611–617 (1999).
14. K. Takeuchi, A. Kawashima, A. Nagafuchi, S. Tsukita, Structural diversity of band 4.1 superfamily members. *J. Cell Sci.* **107**, 1921–1928 (1994).
15. K. Hironaka, H. Umemori, T. Tezuka, M. Mishina, T. Yamamoto, The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor δ 2 and ϵ subunits. *J. Biol. Chem.* **275**, 16167–16173 (2000).
16. S. H. Loh, L. Francescut, P. Lingor, M. Bahr, P. Nicotera, Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen. *Cell Death Differ.* **15**, 283–298 (2008).
17. D. Jackson, M. J. Hossain, D. Hickman, D. R. Perez, R. A. Lamb, A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 4381–4386 (2008).
18. J. C. Obenauer, J. Denson, P. K. Mehta, X. Su, S. Mukatira, D. B. Finkelstein, X. Xu, J. Wang, J. Ma, Y. Fan, K. M. Rakestraw, R. G. Webster, E. Hoffmann, S. Krauss, J. Zheng, Z. Zhang, C. W. Naeve, Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* **311**, 1576–1580 (2006).
19. F. Mégret, C. Préhaud, M. Lafage, C. Batejat, N. Escricou, S. Lay, M. I. Thoulouze, M. Lafon, Immunopotential of the antibody response against influenza HA with apoptotic bodies generated by rabies virus G-ERA protein-driven apoptosis. *Vaccine* **23**, 5342–5350 (2005).
20. Abbreviations for the amino acids are as follows: D, Asp; E, Glu; G, Gly; H, His; K, Lys; L, Leu; N, Asn; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; and Y, Tyr.
21. S. Camelo, M. Lafage, A. Galelli, M. Lafon, Selective role for the p55 Kd TNF- α receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis. *J. Neuroimmunol.* **113**, 95–108 (2001).

22. G. S. Tan, M. A. Preuss, J. C. Williams, M. J. Schnell, The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 7229–7234 (2007).
23. J. A. Montaña-Hirose, M. Lafage, P. Weber, H. Badrane, N. Tordo, M. Lafon, Protective activity of a murine monoclonal antibody against European bat lyssavirus 1 (EBL1) infection in mice. *Vaccine* **11**, 1259–1266 (1993).
24. E. Meijering, M. Jacob, J. C. Sarria, P. Steiner, H. Hirling, M. Unser, Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* **58**, 167–176 (2004).
25. B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, (Wiley Interscience Publications, New York, 1988).
26. E. J. Faul, C. N. Wanjalla, J. P. McGettigan, M. J. Schnell, Interferon- β expressed by a rabies virus-based HIV-1 vaccine vector serves as a molecular adjuvant and decreases pathogenicity. *Virology* **382**, 226–238 (2008).
27. R. Pulmanusahakul, J. Li, M. J. Schnell, B. Dietzschold, The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J. Virol.* **82**, 2330–2338 (2008).
28. H. Bunschoten, M. Gore, I. J. Claassen, F. G. Uytendaele, B. Dietzschold, W. H. Wunner, A. D. Osterhaus, Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **70**, 291–298 (1989).
29. P. Ménager, P. Roux, F. Mégret, J. P. Bourgeois, A. M. Le Sourd, A. Danckaert, M. Lafage, C. Préhaud, M. Lafon, Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus Negri Bodies. *PLoS Pathog.* **5**, e1000315 (2009).
30. A. B. Vojtek, S. M. Hollenberg, Ras-Raf interaction: Two-hybrid analysis. *Methods Enzymol.* **255**, 331–342 (1995).
31. E. Formstecher, S. Aresta, V. Collura, A. Hamburger, A. Meil, A. Trehin, C. Reverdy, V. Betin, S. Maire, C. Brun, B. Jacq, M. Arpin, Y. Bellaïche, S. Bellusci, P. Benaroch, M. Bornens, R. Chanet, P. Chavrier, O. Delattre, V. Doye, R. Fehon, G. Faye, T. Galli, J. A. Girault, B. Goud, J. de Gunzburg, L. Johannes, M. P. Junier, V. Mirouse, A. Mukherjee, D. Papadopoulo, F. Perez, A. Plessis, C. Rossé, S. Saule, D. Stoppa-Lyonnet, A. Vincent, M. White, P. Legrain, J. Wojcik, J. Camonis, L. Daviet, Protein interaction mapping: A *Drosophila* case study. *Genome Res.* **15**, 376–384 (2005).
32. P. L. Bartel, S. Fields, Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* **254**, 241–263 (1995).
33. M. Fromont-Racine, J. C. Rain, P. Legrain, Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* **16**, 277–282 (1997).
34. E. Terrien, C. Simenel, C. Préhaud, H. Buc, M. Delepiere, M. Lafon, N. Wolff, ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the PDZ of microtubule-associated serine/threonine kinase 205 (MAST205) in complex with the C-terminal motif from the rabies virus glycoprotein. *Biomol. NMR Assign.* **3**, 45–48 (2009).
35. S. Bolte, F. P. Cordelières, A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213–232 (2006).
36. E. M. Manders, J. Stap, G. J. Brakenhoff, R. van Driel, J. A. Aten, Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* **103**, 857–862 (1992).
37. B. van Steensel, E. P. van Binnendijk, C. D. Hornsby, H. T. van der Voort, Z. S. Krozowski, E. R. de Kloet, R. van Driel, Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J. Cell Sci.* **109**, 787–792 (1996).
38. This work was supported by grants from Institut Pasteur (IP) and Agence Nationale pour la Recherche (ANR) MIME. E.T., D.C., and N.B. are recipients of Ministère de l'Éducation et de la Recherche fellowships, and P.M. is a recipient of an ANR fellowship. We thank P. Roux, J. D'Alayer, V. Bondet, E. Frachon, J. Bellalou, and J.-F. Charles from IP core facilities for their help. We thank S. Loh and P. Nicotera for the gift of the SH-SY5Y cells, B. Dietzschold for fruitful discussions, E. Vinolo and B. Ruggiero for help in two-hybrid result interpretation, and F. Rey for his support.

Submitted 2 July 2009

Accepted 18 December 2009

Final Publication 19 January 2010

10.1126/scisignal.2000510

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

Supplementary Materials for
**Attenuation of Rabies Virulence: Takeover by the Cytoplasmic Domain
of Its Envelope Protein**

Christophe Préhaud, Nicolas Wolff, Elouan Terrien, Mireille Lafage, Françoise Mégret,
Nicolas Babault, Florence Cordier, Gene S. Tan, Elodie Maitrepierre, Pauline Ménager,
Damien Chopy, Sylviane Hoos, Patrick England, Muriel Delepierre, Matthias J. Schnell,
Henri Buc, Monique Lafon*

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: monique.lafon@pasteur.fr

Published 19 January 2010, *Sci. Signal.* **3**, ra5 (2010)
DOI: 10.1126/scisignal.2000510

This PDF file includes:

Supplementary Text

Fig. S1. G-att-LQ exhibits defective transcription and replication.

Fig. S2. The PDZ-BS is also a critical factor for neurite protection (neurosurvival).

Fig. S3. Comparison of the spreading of G-vir-HE, G-vir-HQ and G-att-LE rRABVs in culture.

References

Supplementary Text

Neurite outgrowth

A standard functional assay of neurite outgrowth with the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y is obtained when signaling pathways are stimulated after treatment with dibutyryl-cyclic AMP (1). During this study, we discovered that RABV has the intrinsic property to trigger neurite elongation. In uninfected conditions, neurites are small (29 to 34 μm , Fig. 3C). After infection with a virulent strain (Fig. 1D and Fig. 3C) the range of average neurites length per neuron was 97 to 110 μm , a three-fold increase compared to neuritis in uninfected cells. This outgrowth phenotype was not observed in cells infected with an attenuated strain of virus (38 to 41 μm , Fig 1D, Fig. 3C).

Deletion of the PDZ-BS attenuates growth and production of G at the membrane in human neuronal cell lines; however neurite outgrowth depends neither upon the total amount of G produced by infected cells nor on the quantity of G associated with the plasma membrane

When human neuroblastoma cells were infected synchronously at an MOI of 3, the two PDZ-BS-deleted rRABVs (G-vir-H Δ and G-att-L Δ) grew at markedly lower titres than those of the parental rRABVs strains: 16- and 166-times lower for G-vir-H Δ and G-att-L Δ , respectively (Fig. 2B). In the meantime, the amount of G detected by flow cytometry in G-vir-H Δ and G-att-L Δ cells 48 hours after infection was reduced by 33% and 56%, respectively. The other rRABVs did not exhibit an extensive defect in their growth properties (Fig. 2B). Therefore, the presence of a PDZ-BS substantially affected rRABVs production and expression of G at the membrane (Fig. 5, A and D). This is consistent with a previous observation that deletion of Cyto-G reduces viral production about six-fold (2). This could be linked to perturbed interactions of Cyto-G with protein M, a key player with G for viral budding and assembly (2, 3). Regulation of RNA transcription and replication of RABV is thought to involve G through an as-yet unknown mechanism (4). Quantitative RT-PCR analysis of the viral transcripts (mRNA) or the replicative viral genomes (gRNA) was performed after infection with rRABVs to test whether deletion of PDZ-BS affected viral transcription and replication. Overall, the viral transcription at late time points (72 hours PI) was not drastically hampered. On the contrary, viral transcription was diminished compared to that in rRABVS parental strains when the PDZ-BS was deleted in both a VIR genetic background (G-vir-H Δ , two-fold) and an ATT genetic background (G-att-L Δ , five-fold) (Fig. 2C).

In mouse models, abnormal primary transcription of rRABV also prevents proper onset of the disease (5). Both G-att-LE and G-vir-HE exhibited lower transcription and replication 8h pi compared to G-vir-HQ (respectively, 6-fold and 8-fold lower transcription and 9-fold and 22-fold lower replication, Fig. 2C). These lower transcription and replication rates at early time points, which are reminiscent of disabled primary transcription, may contribute to a change in virulence. The swap of the PDZ-BS in the G-vir background (G-vir-HE) did not drastically affect transcription and replication at later points. Conversely, the G-att-LQ was highly defective in replication and transcription at 24 hours PI (respectively 27-fold and 4.5-fold, fig. S1B). Experimental conditions, such as the test time of in vitro experiments, have been selected here to minimize these effects.

For some RABV strains, apoptosis is positively correlated with the amount of G (3). Because G-vir-HQ exhibits prosurvival properties whereas G-att-LE exhibits pro-apoptotic properties, the question was raised about any possible correlation between the survival or death phenotypes of infected cells and the amount of G. Therefore, the quantity of G was precisely

determined by Western blotting (to determine the total amount of G) or by flow cytometric analysis of cell-surface protein (to determine the amount of cytoplasmic membrane-associated G). Correlation analysis was undertaken for the neurite outgrowth phenotype at 24 hours PI for G-vir-HQ, G-att-HQ, G-vir-LE, G-att-LE, and G-vir-HE (Fig. 3D) or at 8 hours pi for G-vir-HQ and G-vir-H Δ (Fig. 3D). The calculated Pearson's correlation coefficients (r_s) were all less than 1, indicating that, in our case, neurite outgrowth did not correlate with the amount of G. The same result was obtained when correlation analyses were undertaken with either the retraction or the apoptosis phenotypes and the amount of G. The survival or death properties are therefore linked to the sequence of *G* and not to its accumulation. In conclusion, despite clear differences in viral multiplication, neurite outgrowth depends neither upon the total amount of G nor on the quantity of G associated with the membrane.

The PDZ-BS is a key element for conferring neurites with protection against retraction

A functional assay to test the ability of differentiated neurites to resist the retraction conferred by treatment with a growth cone collapsing drug such as LPA was used to further assess the survival capacity of our RABV strains (1). Neurites of SH-SY5Y cells, which were differentiated with db-c-AMP, were sensitive to LPA (fig. S2A). On the contrary, neurites which had developed after infection with G-vir-HQ or G-att-HQ were not affected by LPA (fig. S2A). This was not the case when cells were infected either by G-vir-HE or G-vir-H Δ (fig. S2, B and C).

The reduced pathogenicity of G-vir-HE or G-att-LE does not result of an impaired cell-to cell spread

To further elucidate the role of PDZ-BS in RABV virulence, the intranasal route was chosen instead of the intramuscular route (as described in Fig. 3F) to infect mice because ATT strains, in contrast to VIR strains, do not cause disease in immunocompetent mice when injected intramuscularly (Fig. 1A). It could be argued that the reduced virulence of G-att-LE and G-vir-HE compared to that of G-vir-HQ resulted from impaired cell-to-cell spreading. However, when virus spread was assessed in Vero cells, the sizes of RABV-positive foci after infection with G-vir-HE or G-att-LE were not different from those observed after infection with G-vir-HQ (fig S3). Thus, in these assays, and in contrast to reports proposing that the pathogenicity of some rRABVs can be regulated by cell-to-cell spread, the reduced virulence observed for G-vir-HE cannot be related per se to a difference in in vitro spreading.

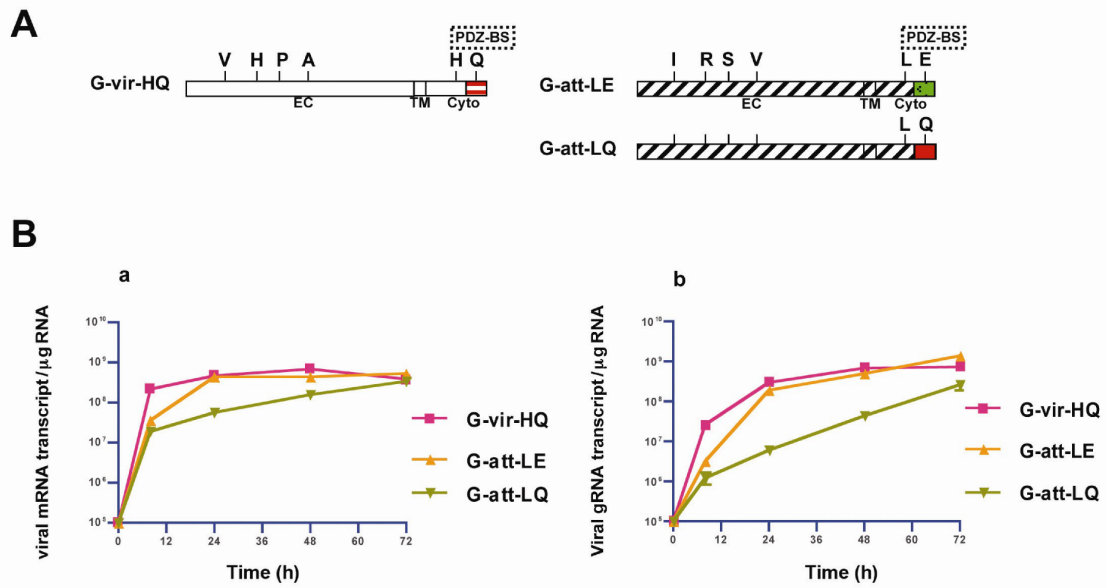


Fig. S1. G-att-LQ exhibits defective transcription and replication. **(A)** Schematic representation of the two original RABV G envelope proteins, G-vir-HQ and G-att-LE, and of the G variant, G-att-LQ, that were used in this study. **(B)** Quantification of viral transcription (mRNA) and replication (gRNA) by real-time PCR was performed in cells infected with rRABVs at an MOI of 3. Data are representative of three independent experiments. (SDs were less than 5%).

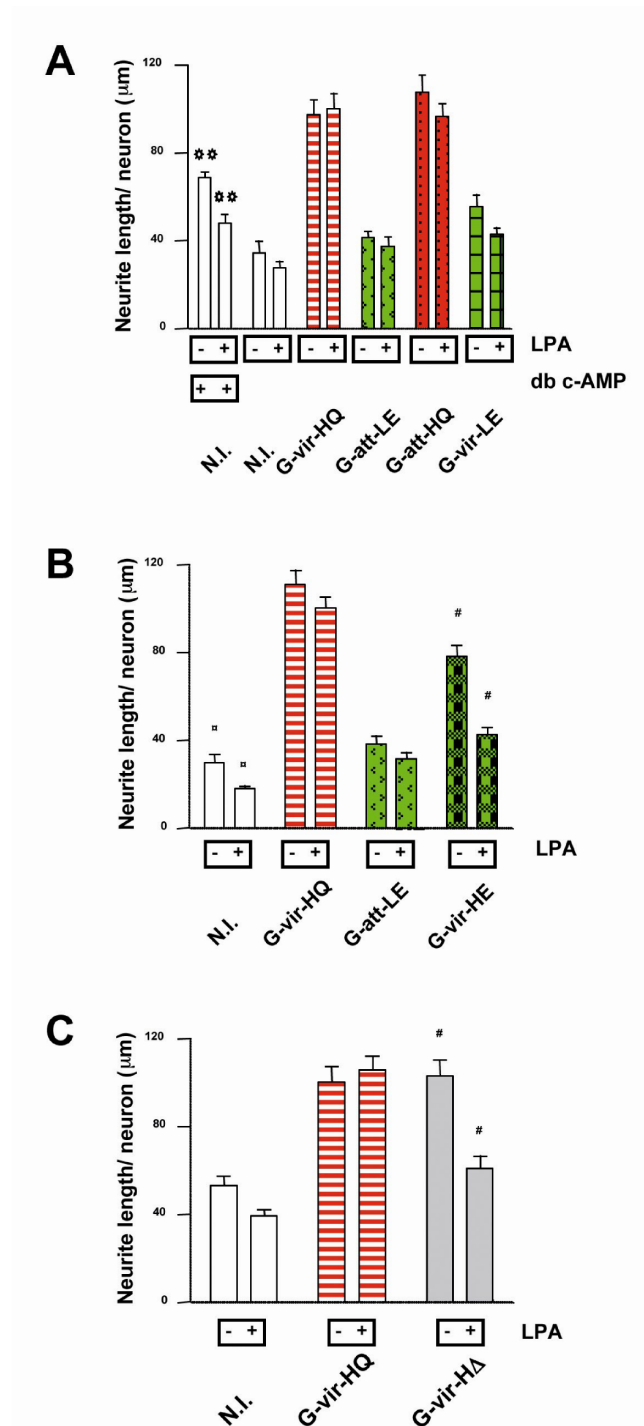


Fig. S2. The PDZ-BS is also a critical factor for neurite protection (neurosurvival). Protection of neurites from retraction was assayed after treatment with LPA in SH-SY5Y cells infected with (A) G-vir-HQ, G-att-LE, G-att-HQ, or G-vir-LE, (B) G-vir-HE, or (C) G-vir-HΔ. Cells infected with the rRABVs at an MOI of 3 were treated 24 hours after infection with 10 μM LPA to monitor the resistance of neurites to retraction. **, $P < 0.002$; □, $P < 0.006$; #, $P < 0.001$, by student's t test.

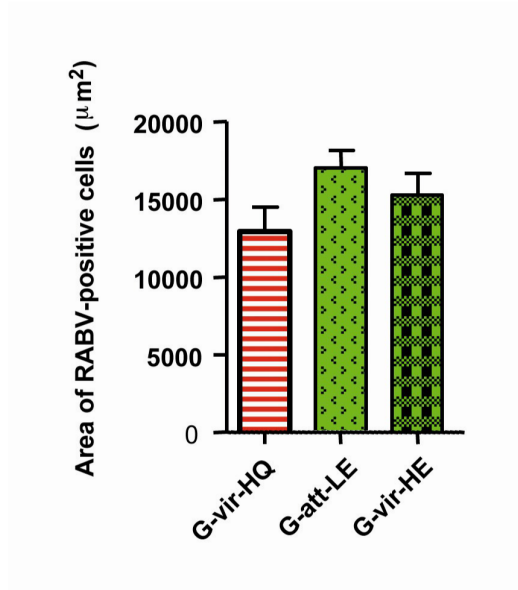


Fig. S3. Comparison of the spreading of G-vir-HE, G-vir-HQ and G-att-LE rRABVs in culture. Vero cells were infected at an MOI of 0.01 and overlaid with semisolid agar. At 48 hours PI, the agar overlay was removed and the cells were fixed with 80% acetone and incubated with a FITC-labeled anti-body against RABV nucleocapsid. Fluorescent foci were captured, and the sizes of fluorescent RABV foci were calculated with ImageJ. Each bar represents means (\pm SEM) of results for 30 foci. The analysis of variance (ANOVA) showed that the means were not statistically different ($P = 0.13$)

References

1. S. H. Loh, L. Francescut, P. Lingor, M. Bahr, P. Nicotera, Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen. *Cell Death Differ.* **15**, 283–298 (2008).
2. T. Mebatsion, M. Konig, K. K. Conzelmann, Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell* **84**, 941–951 (1996).
3. M. Faber, R. Pulmanusahakul, S. S. Hodawadekar, S. Spitsin, J. P. McGettigan, M. J. Schnell, B. Dietzschold, Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* **76**, 3374–3381 (2002).
4. R. Pulmanusahakul, J. Li, M. J. Schnell, B. Dietzschold, The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J. Virol.* **82**, 2330–2338 (2008).
5. G. S. Tan, M. A. Preuss, J. C. Williams, M. J. Schnell, The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 7229–7234 (2007).

Références

References

1. I. Sansal, W. R. Sellers, The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* **22**, 2954-2963 (2004).
2. C. Prehaud, S. Lay, B. Dietzschold, M. Lafon, Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. *J Virol* **77**, 10537-10547 (2003).
3. A. H. Berger, A. G. Knudson, P. P. Pandolfi, A continuum model for tumour suppression. *Nature* **476**, 163-169 (2011).
4. M. Los, S. Maddika, B. Erb, K. Schulze-Osthoff, Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays* **31**, 492-495 (2009).
5. R. Rosset, Pasteur et la rage. (1985).
6. M. J. Schnell, J. P. McGettigan, C. Wirblich, A. Papaneri, The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat Rev Microbiol* **8**, 51-61 (2010).
7. M. A. Mayo, C. R. Pringle, Virus taxonomy--1997. *J Gen Virol* **79** (Pt 4), 649-657 (1998).
8. P. Ge, J. Tsao, S. Schein, T. J. Green, M. Luo, Z. H. Zhou, Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science* **327**, 689-693 (2010).
9. W. Weissenhorn, A. Hinz, Y. Gaudin, Virus membrane fusion. *FEBS Lett* **581**, 2150-2155 (2007).
10. G. Schoehn, F. Iseni, M. Mavrakis, D. Blondel, R. W. Ruigrok, Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site. *J Virol* **75**, 490-498 (2001).
11. M. Lafon, Rabies virus receptors. *J Neurovirol* **11**, 82-87 (2005).
12. M. I. Thoulouze, M. Lafage, M. Schachner, U. Hartmann, H. Cremer, M. Lafon, The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* **72**, 7181-7190 (1998).
13. C. Tuffereau, J. Benejean, D. Blondel, B. Kieffer, A. Flamand, Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *Embo J* **17**, 7250-7259 (1998).
14. P. Liu, J. Yang, X. Wu, Z. F. Fu, Interactions amongst rabies virus nucleoprotein, phosphoprotein and genomic RNA in virus-infected and transfected cells. *J Gen Virol* **85**, 3725-3734 (2004).
15. H. Toriumi, A. Kawai, Association of rabies virus nominal phosphoprotein (P) with viral nucleocapsid (NC) is enhanced by phosphorylation of the viral nucleoprotein (N). *Microbiol Immunol* **48**, 399-409 (2004).
16. S. Finke, R. Mueller-Waldeck, K. K. Conzelmann, Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J Gen Virol* **84**, 1613-1621 (2003).
17. T. Mebatsion, M. Konig, K. K. Conzelmann, Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell* **84**, 941-951 (1996).
18. P. Clarke, K. L. Tyler, Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiol* **7**, 144-155 (2009).
19. B. Engelhardt, The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. *Current pharmaceutical design* **14**, 1555-1565 (2008).
20. V. Hornung, J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, G. Hartmann, 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997 (2006).

21. C. Prehaud, F. Megret, M. Lafage, M. Lafon, Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* **79**, 12893-12904 (2005).
22. D. Choppy, C. N. Detje, M. Lafage, U. Kalinke, M. Lafon, The type I interferon response bridles rabies virus infection and reduces pathogenicity. *J Neurovirol* **17**, 353-367 (2011).
23. L. Baloul, S. Camelo, M. Lafon, Up-regulation of Fas ligand (FasL) in the central nervous system: a mechanism of immune evasion by rabies virus. *J Neurovirol* **10**, 372-382 (2004).
24. M. Lafon, Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **289**, 239-258 (2005).
25. M. Lafon, Immune evasion, a critical strategy for rabies virus. *Dev Biol (Basel)* **131**, 413-419 (2008).
26. I. Tsunoda, T. Tanaka, Y. Saijoh, R. S. Fujinami, Targeting inflammatory demyelinating lesions to sites of Wallerian degeneration. *Am J Pathol* **171**, 1563-1575 (2007).
27. C. Prehaud, N. Wolff, E. Terrien, M. Lafage, F. Megret, N. Babault, F. Cordier, G. S. Tan, E. Maitrepierre, P. Menager, D. Choppy, S. Hoos, P. England, M. Delepiepierre, M. J. Schnell, H. Buc, M. Lafon, Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci Signal* **3**, ra5 (2010).
28. M. I. Thoulouze, M. Lafage, J. A. Montano-Hirose, M. Lafon, Rabies virus infects mouse and human lymphocytes and induces apoptosis. *J Virol* **71**, 7372-7380 (1997).
29. P. Menager, P. Roux, F. Megret, J. P. Bourgeois, A. M. Le Sourd, A. Danckaert, M. Lafage, C. Prehaud, M. Lafon, Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus Negri Bodies. *PLoS Pathog* **5**, e1000315 (2009).
30. D. Chiron, C. Pellat-Deceunynck, M. Amiot, R. Bataille, G. Jego, TLR3 ligand induces NF- κ B activation and various fates of multiple myeloma cells depending on IFN- α production. *J Immunol* **182**, 4471-4478 (2009).
31. J. S. Cameron, L. Alexopoulou, J. A. Sloane, A. B. DiBernardo, Y. Ma, B. Kosaras, R. Flavell, S. M. Strittmatter, J. Volpe, R. Sidman, T. Vartanian, Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *J Neurosci* **27**, 13033-13041 (2007).
32. A. C. Jackson, E. Randle, G. Lawrance, J. P. Rossiter, Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. *J Neurovirol* **14**, 368-375 (2008).
33. L. C. Cantley, B. G. Neel, New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4240-4245 (1999).
34. I. Vivanco, C. L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501 (2002).
35. L. Crews, E. Masliah, Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **19**, R12-20 (2010).
36. S. H. Loh, L. Francescut, P. Lingor, M. Bahr, P. Nicotera, Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen. *Cell Death Differ* **15**, 283-298 (2008).

37. R. Pulmanousahakul, J. Li, M. J. Schnell, B. Dietzschold, The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J Virol* **82**, 2330-2338 (2008).
38. K. O. Cho, C. A. Hunt, M. B. Kennedy, The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* **9**, 929-942 (1992).
39. D. F. Woods, P. J. Bryant, The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-464 (1991).
40. E. Willott, M. S. Balda, A. S. Fanning, B. Jameson, C. Van Itallie, J. M. Anderson, The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7834-7838 (1993).
41. B. Z. Harris, W. A. Lim, Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* **114**, 3219-3231 (2001).
42. E. Kim, M. Sheng, PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* **5**, 771-781 (2004).
43. N. Babault, F. Cordier, M. Lafage, J. Cockburn, A. Haouz, C. Prehaud, F. A. Rey, M. Delepierre, H. Buc, M. Lafon, N. Wolff, Peptides targeting the PDZ domain of PTPN4 are efficient inducers of glioblastoma cell death. *Structure* **19**, 1518-1524 (2011).
44. P. D. Walden, N. J. Cowan, A novel 205-kilodalton testis-specific serine/threonine protein kinase associated with microtubules of the spermatid manchette. *Mol Cell Biol* **13**, 7625-7635 (1993).
45. P. D. Walden, C. F. Millette, Increased activity associated with the MAST205 protein kinase complex during mammalian spermiogenesis. *Biol Reprod* **55**, 1039-1044 (1996).
46. P. Garland, S. Quraishe, P. French, V. O'Connor, Expression of the MAST family of serine/threonine kinases. *Brain Res* **1195**, 12-19 (2008).
47. R. Marmorstein, S. L. Berger, Structure and function of bromodomains in chromatin-regulating complexes. *Gene* **272**, 1-9 (2001).
48. S. K. Hanks, Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* **4**, 111 (2003).
49. E. D. Scheeff, P. E. Bourne, Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Comput Biol* **1**, e49 (2005).
50. L. R. Pearce, D. Komander, D. R. Alessi, The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 9-22 (2010).
51. D. Wang, H. J. Lee, D. S. Cooper, L. Cebotaro, P. D. Walden, I. Choi, C. C. Yun, Coexpression of MAST205 inhibits the activity of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F428-437 (2006).
52. M. Valiente, A. Andres-Pons, B. Gomar, J. Torres, A. Gil, C. Tapparel, S. E. Antonarakis, R. Pulido, Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem* **280**, 28936-28943 (2005).
53. M. P. Scheid, J. R. Woodgett, Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* **546**, 108-112 (2003).
54. J. Eswaran, A. Bernad, J. M. Ligos, B. Guinea, J. E. Debreczeni, F. Sobott, S. A. Parker, R. Najmanovich, B. E. Turk, S. Knapp, Structure of the human protein kinase MPSK1 reveals an atypical activation loop architecture. *Structure* **16**, 115-124 (2008).

55. N. Kannan, N. Haste, S. S. Taylor, A. F. Neuwald, The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1272-1277 (2007).
56. M. M. Hill, B. A. Hemmings, Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* **93**, 243-251 (2002).
57. S. M. Maira, I. Galetic, D. P. Brazil, S. Kaech, E. Ingley, M. Thelen, B. A. Hemmings, Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* **294**, 374-380 (2001).
58. J. Yang, P. Cron, V. Thompson, V. M. Good, D. Hess, B. A. Hemmings, D. Barford, Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell* **9**, 1227-1240 (2002).
59. D. R. Knighton, J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-414 (1991).
60. M. Frodin, T. L. Antal, B. A. Dummler, C. J. Jensen, M. Deak, S. Gammeltoft, R. M. Biondi, A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J* **21**, 5396-5407 (2002).
61. T. Gao, A. Toker, A. C. Newton, The carboxyl terminus of protein kinase c provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J Biol Chem* **276**, 19588-19596 (2001).
62. J. Downward, Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 262-267 (1998).
63. A. Balendran, R. M. Biondi, P. C. Cheung, A. Casamayor, M. Deak, D. R. Alessi, A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J Biol Chem* **275**, 20806-20813 (2000).
64. R. M. Biondi, A. Kieloch, R. A. Currie, M. Deak, D. R. Alessi, The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J* **20**, 4380-4390 (2001).
65. A. J. Te Velthuis, T. Isogai, L. Gerrits, C. P. Bagowski, Insights into the molecular evolution of the PDZ/LIM family and identification of a novel conserved protein motif. *PLoS One* **2**, e189 (2007).
66. M. Zhang, W. Wang, Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Acc Chem Res* **36**, 530-538 (2003).
67. T. Pawson, Organization of cell-regulatory systems through modular-protein-interaction domains. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **361**, 1251-1262 (2003).
68. C. N. Chi, S. Gianni, N. Calosci, C. Travaglini-Allocatelli, K. Engstrom, P. Jemth, A conserved folding mechanism for PDZ domains. *FEBS Lett* **581**, 1109-1113 (2007).
69. D. A. Doyle, A. Lee, J. Lewis, E. Kim, M. Sheng, R. MacKinnon, Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **85**, 1067-1076 (1996).
70. Z. Songyang, A. S. Fanning, C. Fu, J. Xu, S. M. Marfatia, A. H. Chishti, A. Crompton, A. C. Chan, J. M. Anderson, L. C. Cantley, Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**, 73-77 (1997).

71. J. Yanagisawa, M. Takahashi, H. Kanki, H. Yano-Yanagisawa, T. Tazunoki, E. Sawa, T. Nishitoba, M. Kamishohara, E. Kobayashi, S. Kataoka, T. Sato, The molecular interaction of Fas and FAP-1. A tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 8539-8545 (1997).
72. C. Nourry, S. G. Grant, J. P. Borg, PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE* **2003**, RE7 (2003).
73. B. A. Appleton, Y. Zhang, P. Wu, J. P. Yin, W. Hunziker, N. J. Skelton, S. S. Sidhu, C. Wiesmann, 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 (2006).
74. B. S. Kang, D. R. Cooper, Y. Devedjiev, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, Molecular roots of degenerate specificity in syntenin's PDZ2 domain: reassessment of the PDZ recognition paradigm. *Structure* **11**, 845-853 (2003).
75. N. J. Skelton, M. F. Koehler, K. Zobel, W. L. Wong, S. Yeh, M. T. Pisabarro, J. P. Yin, L. A. Lasky, S. S. Sidhu, Origins of PDZ domain ligand specificity. Structure determination and mutagenesis of the Erbin PDZ domain. *J Biol Chem* **278**, 7645-7654 (2003).
76. G. Birrane, J. Chung, J. A. Ladas, Novel mode of ligand recognition by the Erbin PDZ domain. *J Biol Chem* **278**, 1399-1402 (2003).
77. R. Tonikian, Y. Zhang, S. L. Sazinsky, B. Currell, J. H. Yeh, B. Reva, H. A. Held, B. A. Appleton, M. Evangelista, Y. Wu, X. Xin, A. C. Chan, S. Seshagiri, L. A. Lasky, C. Sander, C. Boone, G. D. Bader, S. S. Sidhu, A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS biology* **6**, e239 (2008).
78. J. Zhang, X. Yan, C. Shi, X. Yang, Y. Guo, C. Tian, J. Long, Y. Shen, Structural basis of beta-catenin recognition by Tax-interacting protein-1. *J Mol Biol* **384**, 255-263 (2008).
79. Y. Zhang, S. Yeh, B. A. Appleton, H. A. Held, P. J. Kausalya, D. C. Phua, W. L. Wong, L. A. Lasky, C. Wiesmann, W. Hunziker, S. S. Sidhu, Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families. *J Biol Chem* **281**, 22299-22311 (2006).
80. I. Bezprozvanny, A. Maximov, Classification of PDZ domains. *FEBS Lett* **509**, 457-462 (2001).
81. M. A. Stiffler, J. R. Chen, V. P. Grantcharova, Y. Lei, D. Fuchs, J. E. Allen, L. A. Zaslavskaya, G. MacBeath, PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science* **317**, 364-369 (2007).
82. S. Kalyoncu, O. Keskin, A. Gursoy, Interaction prediction and classification of PDZ domains. *BMC bioinformatics* **11**, 357 (2010).
83. N. E. Davey, G. Trave, T. J. Gibson, How viruses hijack cell regulation. *Trends Biochem Sci* **36**, 159-169 (2011).
84. K. Luck, G. Trave, Phage display can select over-hydrophobic sequences that may impair prediction of natural domain-peptide interactions. *Bioinformatics* **27**, 899-902 (2011).
85. T. Sugi, T. Oyama, T. Muto, S. Nakanishi, K. Morikawa, H. Jingami, Crystal structures of autoinhibitory PDZ domain of Tamalin: implications for metabotropic glutamate receptor trafficking regulation. *EMBO J* **26**, 2192-2205 (2007).
86. S. Maudsley, A. M. Zamah, N. Rahman, J. T. Blitzer, L. M. Luttrell, R. J. Lefkowitz, R. A. Hall, Platelet-derived growth factor receptor association with

- Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor potentiates receptor activity. *Mol Cell Biol* **20**, 8352-8363 (2000).
87. B. H. Chang, T. S. Gujral, E. S. Karp, R. BuKhalid, V. P. Grantcharova, G. MacBeath, A systematic family-wide investigation reveals that ~30% of mammalian PDZ domains engage in PDZ-PDZ interactions. *Chem Biol* **18**, 1143-1152 (2011).
 88. A. S. Fanning, M. F. Lye, J. M. Anderson, A. Lavie, Domain swapping within PDZ2 is responsible for dimerization of ZO proteins. *J Biol Chem* **282**, 37710-37716 (2007).
 89. R. R. Penkert, H. M. DiVittorio, K. E. Prehoda, Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex. *Nature structural & molecular biology* **11**, 1122-1127 (2004).
 90. B. J. Hillier, K. S. Christopherson, K. E. Prehoda, D. S. Brett, W. A. Lim, Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* **284**, 812-815 (1999).
 91. R. Gallardo, Y. Ivarsson, J. Schymkowitz, F. Rousseau, P. Zimmermann, Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem* **11**, 456-467 (2010).
 92. P. Zimmermann, K. Meerschaert, G. Reekmans, I. Leenaerts, J. V. Small, J. Vandekerckhove, G. David, J. Gettemans, PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell* **9**, 1215-1225 (2002).
 93. H. Wu, W. Feng, J. Chen, L. N. Chan, S. Huang, M. Zhang, PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol Cell* **28**, 886-898 (2007).
 94. E. J. Fuentes, S. A. Gilmore, R. V. Mauldin, A. L. Lee, Evaluation of energetic and dynamic coupling networks in a PDZ domain protein. *J Mol Biol* **364**, 337-351 (2006).
 95. B. S. Kang, D. R. Cooper, F. Jelen, Y. Devedjiev, U. Derewenda, Z. Dauter, J. Otlewski, Z. S. Derewenda, PDZ tandem of human syntenin: crystal structure and functional properties. *Structure* **11**, 459-468 (2003).
 96. G. Kozlov, D. Banville, K. Gehring, I. Ekiel, Solution structure of the PDZ2 domain from cytosolic human phosphatase hPTP1E complexed with a peptide reveals contribution of the beta2-beta3 loop to PDZ domain-ligand interactions. *J Mol Biol* **320**, 813-820 (2002).
 97. B. Z. Harris, F. W. Lau, N. Fujii, R. K. Guy, W. A. Lim, Role of electrostatic interactions in PDZ domain ligand recognition. *Biochemistry* **42**, 2797-2805 (2003).
 98. H. J. Chung, Y. H. Huang, L. F. Lau, R. L. Huganir, Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* **24**, 10248-10259 (2004).
 99. Q. B. Tian, T. Suzuki, T. Yamauchi, H. Sakagami, Y. Yoshimura, S. Miyazawa, K. Nakayama, F. Saitoh, J. P. Zhang, Y. Lu, H. Kondo, S. Endo, 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. *The European journal of neuroscience* **23**, 2864-2876 (2006).
 100. J. Chen, L. Pan, Z. Wei, Y. Zhao, M. Zhang, Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J* **27**, 2113-2123 (2008).

101. T. Hegedus, T. Sessler, R. Scott, W. Thelin, E. Bakos, A. Varadi, K. Szabo, L. Homolya, S. L. Milgram, B. Sarkadi, C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 454-461 (2003).
102. P. Mishra, M. Socolich, M. A. Wall, J. Graves, Z. Wang, R. Ranganathan, Dynamic scaffolding in a G protein-coupled signaling system. *Cell* **131**, 80-92 (2007).
103. J. W. Voltz, M. Brush, S. Sikes, D. Steplock, E. J. Weinman, S. Shenolikar, Phosphorylation of PDZ1 domain attenuates NHERF-1 binding to cellular targets. *J Biol Chem* **282**, 33879-33887 (2007).
104. V. Raghuram, H. Hormuth, J. K. Foskett, A kinase-regulated mechanism controls CFTR channel gating by disrupting bivalent PDZ domain interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9620-9625 (2003).
105. F. Gardoni, F. Polli, F. Cattabeni, M. Di Luca, Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors. *The European journal of neuroscience* **24**, 2694-2704 (2006).
106. H. J. Lee, J. J. Zheng, PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell communication and signaling : CCS* **8**, 8 (2010).
107. N. Ota, D. A. Agard, Intramolecular signaling pathways revealed by modeling anisotropic thermal diffusion. *J Mol Biol* **351**, 345-354 (2005).
108. Z. N. Gerek, S. B. Ozkan, Change in allosteric network affects binding affinities of PDZ domains: analysis through perturbation response scanning. *PLoS Comput Biol* **7**, e1002154 (2011).
109. P. De Los Rios, F. Cecconi, A. Pretre, G. Dietler, O. Michielin, F. Piazza, B. Juanico, Functional dynamics of PDZ binding domains: a normal-mode analysis. *Biophys J* **89**, 14-21 (2005).
110. K. A. Reynolds, R. N. McLaughlin, R. Ranganathan, Hot spots for allosteric regulation on protein surfaces. *Cell* **147**, 1564-1575 (2011).
111. J. Lee, M. Natarajan, V. C. Nashine, M. Socolich, T. Vo, W. P. Russ, S. J. Benkovic, R. Ranganathan, Surface sites for engineering allosteric control in proteins. *Science* **322**, 438-442 (2008).
112. C. M. Petit, J. Zhang, P. J. Sapienza, E. J. Fuentes, A. L. Lee, Hidden dynamic allostery in a PDZ domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18249-18254 (2009).
113. J. Zhang, C. M. Petit, D. S. King, A. L. Lee, 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 (2011).
114. K. Luck, S. Charbonnier, G. Trave, The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS Lett*, (2012).
115. Y. Qian, K. E. Prehoda, Interdomain interactions in the tumor suppressor discs large regulate binding to the synaptic protein GukHolder. *J Biol Chem* **281**, 35757-35763 (2006).
116. L. Pan, J. Chen, J. Yu, H. Yu, M. Zhang, 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 (2011).

117. K. Mukherjee, M. Sharma, H. Urlaub, G. P. Bourenkov, R. Jahn, T. C. Sudhof, M. C. Wahl, CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase. *Cell* **133**, 328-339 (2008).
118. C. Lumeng, S. Phelps, G. E. Crawford, P. D. Walden, K. Barald, J. S. Chamberlain, Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* **2**, 611-617 (1999).
119. R. Maddala, N. P. Skiba, R. Lalane, 3rd, D. L. Sherman, P. J. Brophy, P. V. Rao, Periaxin is required for hexagonal geometry and membrane organization of mature lens fibers. *Dev Biol* **357**, 179-190 (2011).
120. N. Okazaki, N. Takahashi, S. Kojima, Y. Masuho, H. Koga, Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis* **23**, 1139-1148 (2002).
121. N. C. Zachos, C. Hodson, O. Kovbasnjuk, X. Li, W. R. Thelin, B. Cha, S. Milgram, M. Donowitz, Elevated intracellular calcium stimulates NHE3 activity by an IKEPP (NHERF4) dependent mechanism. *Cell Physiol Biochem* **22**, 693-704 (2008).
122. R. Yano, C. C. Yap, Y. Yamazaki, Y. Muto, H. Kishida, D. Okada, T. Hashikawa, Sast124, a novel splice variant of syntrophin-associated serine/threonine kinase (SAST), is specifically localized in the restricted brain regions. *Neuroscience* **117**, 373-381 (2003).
123. J. M. Elkins, E. Papagrigoriou, G. Berridge, X. Yang, C. Phillips, C. Gileadi, P. Savitsky, D. A. Doyle, Structure of PICK1 and other PDZ domains obtained with the help of self-binding C-terminal extensions. *Protein Sci* **16**, 683-694 (2007).
124. D. R. Robinson, S. Kalyana-Sundaram, Y. M. Wu, S. Shankar, X. Cao, B. Ateeq, I. A. Asangani, M. Iyer, C. A. Maher, C. S. Grasso, R. J. Lonigro, M. Quist, J. Siddiqui, R. Mehra, X. Jing, T. J. Giordano, M. S. Sabel, C. G. Kleer, N. Palanisamy, R. Natrajan, M. B. Lambros, J. S. Reis-Filho, C. Kumar-Sinha, A. M. Chinnaiyan, Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer. *Nat Med* **17**, 1646-1651 (2011).
125. A. Baranova, S. Gowder, S. Naouar, S. King, K. Schlauch, M. Jarrar, Y. Ding, B. Cook, V. Chandhoke, A. Christensen, Expression profile of ovarian tumors: distinct signature of Sertoli-Leydig cell tumor. *Int J Gynecol Cancer* **16**, 1963-1972 (2006).
126. W. Wang, Y. Li, A. Hong, J. Wang, B. Lin, R. Li, NDRG3 is an androgen regulated and prostate enriched gene that promotes in vitro and in vivo prostate cancer cell growth. *Int J Cancer* **124**, 521-530 (2009).
127. J. R. Tollervey, Z. Wang, T. Hortobagyi, J. T. Witten, K. Zarnack, M. Kayikci, T. A. Clark, A. C. Schweitzer, G. Rot, T. Curk, B. Zupan, B. Rogelj, C. E. Shaw, J. Ule, Analysis of alternative splicing associated with aging and neurodegeneration in the human brain. *Genome Res* **21**, 1572-1582 (2011).
128. K. K. Park, K. Liu, Y. Hu, P. D. Smith, C. Wang, B. Cai, B. Xu, L. Connolly, I. Kramvis, M. Sahin, Z. He, Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* **322**, 963-966 (2008).
129. J. Li, C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliarensis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler, R. Parsons, PTEN, a putative

- protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947 (1997).
130. P. A. Steck, M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. K. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D. H. Teng, S. V. Tavtigian, Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**, 356-362 (1997).
 131. M. R. Nelen, G. W. Padberg, E. A. Peeters, A. Y. Lin, B. van den Helm, R. R. Frants, V. Coulon, A. M. Goldstein, M. M. van Reen, D. F. Easton, R. A. Eeles, S. Hodgson, J. J. Mulvihill, V. A. Murday, M. A. Tucker, E. C. Mariman, T. M. Starink, B. A. Ponder, H. H. Ropers, H. Kremer, M. Longy, C. Eng, Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* **13**, 114-116 (1996).
 132. D. Liaw, D. J. Marsh, J. Li, P. L. Dahia, S. I. Wang, Z. Zheng, S. Bose, K. M. Call, H. C. Tsou, M. Peacocke, C. Eng, R. Parsons, Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* **16**, 64-67 (1997).
 133. K. I. Patterson, T. Brummer, P. M. O'Brien, R. J. Daly, Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* **418**, 475-489 (2009).
 134. A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711 (2004).
 135. S. Klumpp, J. Krieglstein, Reversible phosphorylation of histidine residues in vertebrate proteins. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 291-295 (2005).
 136. J. E. Coleman, Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 441-483 (1992).
 137. Y. Shi, Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139**, 468-484 (2009).
 138. P. W. Majerus, J. D. York, Phosphoinositide phosphatases and disease. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S249-254 (2009).
 139. S. Pyne, J. S. Long, N. T. Ktistakis, N. J. Pyne, Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem Soc Trans* **33**, 1370-1374 (2005).
 140. G. Raugei, G. Ramponi, P. Chiarugi, Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell Mol Life Sci* **59**, 941-949 (2002).
 141. M. S. Bennett, Z. Guan, M. Laurberg, X. D. Su, Bacillus subtilis arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13577-13582 (2001).
 142. N. Bottini, E. Bottini, F. Gloria-Bottini, T. Mustelin, Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **50**, 95-104 (2002).
 143. D. Bordo, P. Bork, The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep* **3**, 741-746 (2002).
 144. D. Ray, H. Kiyokawa, CDC25A phosphatase: a rate-limiting oncogene that determines genomic stability. *Cancer Res* **68**, 1251-1253 (2008).
 145. A. M. Burroughs, K. N. Allen, D. Dunaway-Mariano, L. Aravind, 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 (2006).

146. J. P. Rayapureddi, C. Kattamuri, B. D. Steinmetz, B. J. Frankfort, E. J. Ostrin, G. Mardon, R. S. Hegde, Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* **426**, 295-298 (2003).
147. T. Maehama, J. E. Dixon, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378 (1998).
148. M. P. Myers, I. Pass, I. H. Batty, J. Van der Kaay, J. P. Stolarov, B. A. Hemmings, M. H. Wigler, C. P. Downes, N. K. Tonks, The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13513-13518 (1998).
149. D. A. Fruman, R. E. Meyers, L. C. Cantley, Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**, 481-507 (1998).
150. Y. Liu, V. A. Bankaitis, Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog Lipid Res* **49**, 201-217.
151. J. O. Lee, H. Yang, M. M. Georgescu, A. Di Cristofano, T. Maehama, Y. Shi, J. E. Dixon, P. Pandolfi, N. P. Pavletich, Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323-334 (1999).
152. N. K. Tonks, H. Charbonneau, C. D. Diltz, E. H. Fischer, K. A. Walsh, Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* **27**, 8695-8701 (1988).
153. T. Rowe, C. Hale, A. Zhou, R. J. Kurzeja, A. Ali, A. Menjares, M. Wang, J. D. McCarter, A high-throughput microfluidic assay for SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 2. *Assay Drug Dev Technol* **4**, 175-183 (2006).
154. M. P. Myers, J. P. Stolarov, C. Eng, J. Li, S. I. Wang, M. H. Wigler, R. Parsons, N. K. Tonks, P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9052-9057 (1997).
155. D. J. Pagliarini, C. A. Worby, J. E. Dixon, A PTEN-like phosphatase with a novel substrate specificity. *J Biol Chem* **279**, 38590-38596 (2004).
156. M. Tamura, J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons, K. M. Yamada, Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**, 1614-1617 (1998).
157. D. Maier, G. Jones, X. Li, A. H. Schonthal, O. Gratzl, E. G. Van Meir, A. Merlo, The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res* **59**, 5479-5482 (1999).
158. J. Haier, G. L. Nicolson, PTEN regulates tumor cell adhesion of colon carcinoma cells under dynamic conditions of fluid flow. *Oncogene* **21**, 1450-1460 (2002).
159. T. Gu, Z. Zhang, J. Wang, J. Guo, W. H. Shen, Y. Yin, CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. *Cancer Res* **71**, 2821-2825.
160. M. Raftopoulou, S. Etienne-Manneville, A. Self, S. Nicholls, A. Hall, Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* **303**, 1179-1181 (2004).
161. X. C. Zhang, A. Piccini, N. P. Myers, L. Van Aelst, N. K. Tonks, Functional Analysis of the Protein Phosphatase Activity of PTEN. *biochemical journal*, (2012).
162. A. J. Barr, E. Ugochukwu, W. H. Lee, O. N. King, P. Filippakopoulos, I. Alfano, P. Savitsky, N. A. Burgess-Brown, S. Muller, S. Knapp, Large-scale structural

- analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. *Cell* **136**, 352-363 (2009).
163. D. Zhang, L. Aravind, Identification of novel families and classification of the C2 domain superfamily elucidate the origin and evolution of membrane targeting activities in eukaryotes. *Gene* **469**, 18-30.
 164. J. C. Young, J. M. Barral, F. Ulrich Hartl, More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* **28**, 541-547 (2003).
 165. D. W. Lee, X. Wu, E. Eisenberg, L. E. Greene, Recruitment dynamics of GAK and auxilin to clathrin-coated pits during endocytosis. *J Cell Sci* **119**, 3502-3512 (2006).
 166. S. M. Walker, C. P. Downes, N. R. Leslie, TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase. *Biochem J* **360**, 277-283 (2001).
 167. D. Martuszczyńska, B. Ljungberg, M. Johansson, G. Landberg, C. Oslakovic, B. Dahlback, S. Hafizi, Tensin3 is a negative regulator of cell migration and all four Tensin family members are downregulated in human kidney cancer. *PLoS One* **4**, e4350 (2009).
 168. M. M. Georgescu, K. H. Kirsch, P. Kaloudis, H. Yang, N. P. Pavletich, H. Hanafusa, Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res* **60**, 7033-7038 (2000).
 169. S. Das, J. E. Dixon, W. Cho, Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7491-7496 (2003).
 170. D. Murray, B. Honig, Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. *Mol Cell* **9**, 145-154 (2002).
 171. R. E. Redfern, D. Redfern, M. L. Furgason, M. Munson, A. H. Ross, A. Gericke, PTEN phosphatase selectively binds phosphoinositides and undergoes structural changes. *Biochemistry* **47**, 2162-2171 (2008).
 172. H. J. Dyson, P. E. Wright, Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 197-208 (2005).
 173. J. Torres, R. Pulido, The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* **276**, 993-998 (2001).
 174. A. M. Al-Khouri, Y. Ma, S. H. Togo, S. Williams, T. Mustelin, Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem* **280**, 35195-35202 (2005).
 175. H. Mehenni, N. Lin-Marq, K. Buchet-Poyau, A. Reymond, M. A. Collart, D. Picard, S. E. Antonarakis, LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes. *Hum Mol Genet* **14**, 2209-2219 (2005).
 176. A. Gil, A. Andres-Pons, R. Pulido, Nuclear PTEN: a tale of many tails. *Cell Death Differ* **14**, 395-399 (2007).
 177. J. Torres, J. Rodriguez, M. P. Myers, M. Valiente, J. D. Graves, N. K. Tonks, R. Pulido, Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem* **278**, 30652-30660 (2003).
 178. X. Wu, K. Hepner, S. Castelino-Prabhu, D. Do, M. B. Kaye, X. J. Yuan, J. Wood, C. Ross, C. L. Sawyers, Y. E. Whang, Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4233-4238 (2000).

179. Y. Wu, D. Dowbenko, S. Spencer, R. Laura, J. Lee, Q. Gu, L. A. Lasky, Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem* **275**, 21477-21485 (2000).
180. T. Tolkacheva, M. Boddapati, A. Sanfiz, K. Tsuchida, A. C. Kimmelman, A. M. Chan, Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383. *Cancer Res* **61**, 4985-4989 (2001).
181. H. Maccario, N. M. Perera, L. Davidson, C. P. Downes, N. R. Leslie, PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *Biochem J* **405**, 439-444 (2007).
182. A. Gil, A. Andres-Pons, E. Fernandez, M. Valiente, J. Torres, J. Cervera, R. Pulido, Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: Involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Mol Biol Cell* **17**, 4002-4013 (2006).
183. F. Vazquez, S. Ramaswamy, N. Nakamura, W. R. Sellers, Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* **20**, 5010-5018 (2000).
184. F. Vazquez, S. R. Grossman, Y. Takahashi, M. V. Rokas, N. Nakamura, W. R. Sellers, Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* **276**, 48627-48630 (2001).
185. M. Rahdar, T. Inoue, T. Meyer, J. Zhang, F. Vazquez, P. N. Devreotes, A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 480-485 (2009).
186. V. Stambolic, D. MacPherson, D. Sas, Y. Lin, B. Snow, Y. Jang, S. Benchimol, T. W. Mak, Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* **8**, 317-325 (2001).
187. L. Salmena, A. Carracedo, P. P. Pandolfi, Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* **133**, 403-414 (2008).
188. R. E. Teresi, S. M. Planchon, K. A. Waite, C. Eng, Regulation of the PTEN promoter by statins and SREBP. *Hum Mol Genet* **17**, 919-928 (2008).
189. F. Meng, R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, T. Patel, MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **133**, 647-658 (2007).
190. L. Poliseno, L. Salmena, J. Zhang, B. Carver, W. J. Haveman, P. P. Pandolfi, A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* **465**, 1033-1038 (2010).
191. L. Salmena, L. Poliseno, Y. Tay, L. Kats, P. P. Pandolfi, A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* **146**, 353-358 (2011).
192. A. Gericke, M. Munson, A. H. Ross, Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene* **374**, 1-9 (2006).
193. C. L. Bonifant, J. S. Kim, T. Waldman, NHERFs, NEP, MAGUKs, and more: interactions that regulate PTEN. *J Cell Biochem* **102**, 878-885 (2007).
194. M. T. van Diepen, M. Parsons, C. P. Downes, N. R. Leslie, R. Hindges, B. J. Eickholt, MyosinV controls PTEN function and neuronal cell size. *Nat Cell Biol* **11**, 1191-1196 (2009).
195. M. S. Song, A. Carracedo, L. Salmena, S. J. Song, A. Egia, M. Malumbres, P. P. Pandolfi, Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* **144**, 187-199.

196. D. K. Crockett, G. C. Fillmore, K. S. Elenitoba-Johnson, M. S. Lim, Analysis of phosphatase and tensin homolog tumor suppressor interacting proteins by in vitro and in silico proteomics. *Proteomics* **5**, 1250-1262 (2005).
197. W. Droge, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95 (2002).
198. J. Kwon, S. R. Lee, K. S. Yang, Y. Ahn, Y. J. Kim, E. R. Stadtman, S. G. Rhee, Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16419-16424 (2004).
199. S. H. Ross, Y. Lindsay, S. T. Safrany, O. Lorenzo, F. Villa, R. Toth, M. J. Clague, C. P. Downes, N. R. Leslie, Differential redox regulation within the PTP superfamily. *Cell Signal* **19**, 1521-1530 (2007).
200. N. R. Leslie, D. Bennett, Y. E. Lindsay, H. Stewart, A. Gray, C. P. Downes, Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J* **22**, 5501-5510 (2003).
201. K. Okumura, M. Mendoza, R. M. Bachoo, R. A. DePinho, W. K. Cavenee, F. B. Furnari, PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem* **281**, 26562-26568 (2006).
202. T. Ikenoue, K. Inoki, B. Zhao, K. L. Guan, PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res* **68**, 6908-6912 (2008).
203. M. E. Ginn-Pease, C. Eng, Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res* **63**, 282-286 (2003).
204. S. J. Miller, D. Y. Lou, D. C. Seldin, W. S. Lane, B. G. Neel, Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS Lett* **528**, 145-153 (2002).
205. F. Meggio, O. Marin, L. A. Pinna, Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* **40**, 401-409 (1994).
206. M. A. Pagano, L. Cesaro, F. Meggio, L. A. Pinna, Protein kinase CK2: a newcomer in the 'druggable kinome'. *Biochem Soc Trans* **34**, 1303-1306 (2006).
207. F. Okahara, H. Ikawa, Y. Kanaho, T. Maehama, Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. *J Biol Chem* **279**, 45300-45303 (2004).
208. Z. Li, X. Dong, Z. Wang, W. Liu, N. Deng, Y. Ding, L. Tang, T. Hla, R. Zeng, L. Li, D. Wu, Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* **7**, 399-404 (2005).
209. D. Koul, S. A. Jasser, Y. Lu, M. A. Davies, R. Shen, Y. Shi, G. B. Mills, W. K. Yung, Motif analysis of the tumor suppressor gene MMAC/PTEN identifies tyrosines critical for tumor suppression and lipid phosphatase activity. *Oncogene* **21**, 2357-2364 (2002).
210. X. Wang, L. C. Trotman, T. Koppie, A. Alimonti, Z. Chen, Z. Gao, J. Wang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. Cordon-Cardo, P. P. Pandolfi, X. Jiang, NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* **128**, 129-139 (2007).
211. M. H. Glickman, A. Ciechanover, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428 (2002).
212. H. Maccario, N. M. Perera, A. Gray, C. P. Downes, N. R. Leslie, Ubiquitination of PTEN (phosphatase and tensin homolog) inhibits phosphatase activity and

- is enhanced by membrane targeting and hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **285**, 12620-12628.
213. M. S. Song, L. Salmena, A. Carracedo, A. Egia, F. Lo-Coco, J. Teruya-Feldstein, P. P. Pandolfi, The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature* **455**, 813-817 (2008).
 214. L. C. Trotman, X. Wang, A. Alimonti, Z. Chen, J. Teruya-Feldstein, H. Yang, N. P. Pavletich, B. S. Carver, C. Cordon-Cardo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. G. Chi, H. J. Kim, T. Misteli, X. Jiang, P. P. Pandolfi, Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* **128**, 141-156 (2007).
 215. J. M. Kavran, D. E. Klein, A. Lee, M. Falasca, S. J. Isakoff, E. Y. Skolnik, M. A. Lemmon, Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **273**, 30497-30508 (1998).
 216. A. Klippel, W. M. Kavanaugh, D. Pot, L. T. Williams, A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* **17**, 338-344 (1997).
 217. Y. Wang, C. L. Chen, M. Iijima, Signaling mechanisms for chemotaxis. *Dev Growth Differ* **53**, 495-502.
 218. K. F. Swaney, C. H. Huang, P. N. Devreotes, Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. *Annu Rev Biophys* **39**, 265-289.
 219. W. H. Shen, A. S. Balajee, J. Wang, H. Wu, C. Eng, P. P. Pandolfi, Y. Yin, Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**, 157-170 (2007).
 220. S. C. Lo, X. Li, M. T. Henzl, L. J. Beamer, M. Hannink, Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J* **25**, 3605-3617 (2006).
 221. M. Deichmann, M. Thome, A. Benner, U. Egner, W. Hartschuh, H. Naher, PTEN/MMAC1 expression in melanoma resection specimens. *Br J Cancer* **87**, 1431-1436 (2002).
 222. M. E. McMenamin, P. Soung, S. Perera, I. Kaplan, M. Loda, W. R. Sellers, Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* **59**, 4291-4296 (1999).
 223. M. B. Lachyankar, N. Sultana, C. M. Schonhoff, P. Mitra, W. Poluha, S. Lambert, P. J. Quesenberry, N. S. Litofsky, L. D. Recht, R. Nabi, S. J. Miller, S. Ohta, B. G. Neel, A. H. Ross, A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci* **20**, 1404-1413 (2000).
 224. T. Sano, H. Lin, X. Chen, L. A. Langford, D. Koul, M. L. Bondy, K. R. Hess, J. N. Myers, Y. K. Hong, W. K. Yung, P. A. Steck, Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res* **59**, 1820-1824 (1999).
 225. O. Gimm, A. Perren, L. P. Weng, D. J. Marsh, J. J. Yeh, U. Ziebold, E. Gil, R. Hinze, L. Delbridge, J. A. Lees, G. L. Mutter, B. G. Robinson, P. Komminoth, H. Dralle, C. Eng, Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* **156**, 1693-1700 (2000).
 226. N. Chalhoub, S. J. Baker, PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* **4**, 127-150 (2009).

227. R. J. Griffin, A. Moloney, M. Kelliher, J. A. Johnston, R. Ravid, P. Dockery, R. O'Connor, C. O'Neill, Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *Journal of neurochemistry* **93**, 105-117 (2005).
228. P. M. Dahia, O. Gimm, H. Chi, D. J. Marsh, P. R. Reynolds, C. Eng, Absence of germline mutations in MINPP1, a phosphatase encoding gene centromeric of PTEN, in patients with Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome without germline PTEN mutations. *J Med Genet* **37**, 715-717 (2000).
229. M. G. Butler, M. J. Dasouki, X. P. Zhou, Z. Talebizadeh, M. Brown, T. N. Takahashi, J. H. Miles, C. H. Wang, R. Stratton, R. Pilarski, C. Eng, Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet* **42**, 318-321 (2005).
230. K. L. McBride, E. A. Varga, M. T. Pastore, T. W. Prior, K. Manickam, J. F. Atkin, G. E. Herman, Confirmation study of PTEN mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly. *Autism Res* **3**, 137-141 (2010).
231. Y. Sonoda, H. Mukai, K. Matsuo, M. Takahashi, Y. Ono, K. Maeda, H. Akiyama, T. Kawamata, Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett* **471**, 20-24 (2010).
232. A. Rickle, N. Bogdanovic, I. Volkmann, X. Zhou, J. J. Pei, B. Winblad, R. F. Cowburn, PTEN levels in Alzheimer's disease medial temporal cortex. *Neurochem Int* **48**, 114-123 (2006).
233. L. M. Chow, S. J. Baker, PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett* **241**, 184-196 (2006).
234. C. H. Kwon, D. Zhao, J. Chen, S. Alcantara, Y. Li, D. K. Burns, R. P. Mason, E. Y. Lee, H. Wu, L. F. Parada, Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer Res* **68**, 3286-3294 (2008).
235. C. Garcia-Echeverria, W. R. Sellers, Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* **27**, 5511-5526 (2008).
236. E. Terrien, C. Simenel, C. Prehaud, H. Buc, M. Delepierre, M. Lafon, N. Wolff, ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the PDZ of microtubule-associated serine/threonine kinase 205 (MAST205) in complex with the C-terminal motif from the rabies virus glycoprotein. *Biomol NMR Assign* **3**, 45-48 (2009).
237. C. A. Royer, W. R. Smith, J. M. Beechem, Analysis of binding in macromolecular complexes: a generalized numerical approach. *Anal Biochem* **191**, 287-294 (1990).
238. C. Chothia, J. Janin, Principles of protein-protein recognition. *Nature* **256**, 705-708 (1975).
239. J. D. Scott, T. Pawson, Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* **326**, 1220-1224 (2009).