



Domaines structuraux et signalisation

**Isabelle Broutin
Arnaud Ducruix**

I. Broutin, A. Ducruix : Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques, Cnrs EP 2075, Faculté de pharmacie/université René-Descartes, Paris V, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France.

► Les adaptateurs moléculaires, protéines de la transduction du signal, n'ont pas d'activité enzymatique propre, mais sont constitués d'une succession de domaines d'interaction protéine-protéine. Parmi ces domaines, les plus fréquents sont SH2, PTB, PH, SH3 et WW. Les domaines SH2 et PTB reconnaissent des peptides contenant une tyrosine phosphorylée; les domaines SH3 et WW se lient à des peptides riches en proline. Ils jouent ainsi un rôle très important dans la distribution du signal au niveau des molécules effectrices. Les adaptateurs moléculaires permettent de moduler le signal en fonction du type cellulaire et de la voie de signalisation à activer. ◀

La communication entre cellules est d'une importance cruciale pour les organismes multicellulaires. Leur croissance, leur migration, leur différenciation dans l'embryon puis leur organisation en tissus spécifiques dépend de signaux spécifiques transmis d'une cellule à une autre. Lorsque cette signalisation est en dysfonctionnement, cela peut conduire au cancer ou à certains troubles, par exemple cardiovasculaires ou immunitaires. La communication cellulaire peut être schématiquement représentée par deux étapes. Tout d'abord, un signal extracellulaire se fixe sur un récepteur situé à la surface de la cellule et active le récepteur. Ce dernier stimule ensuite une série de signaux intracellulaires en cascade vers le noyau pour aboutir à une réponse cellulaire (par exemple: prolifération ou différenciation). On distingue trois classes de protéines parmi les acteurs de la transduction du signal: les récepteurs qui reçoivent le signal, les adaptateurs qui le distribuent, et les effecteurs qui induisent la réponse cellulaire.

Les adaptateurs moléculaires – protéines de la transduction du signal – n'ont pas d'activité enzymatique

propre mais sont constitués d'une succession de domaines d'interaction protéine-protéine (*figure 1*). Ils jouent ainsi un rôle très important dans la distribution du signal au niveau des molécules effectrices. Les adaptateurs moléculaires permettent de moduler le signal en fonction du type cellulaire et de la voie de signalisation à activer.

Dans cet article, nous montrerons l'apport de la biologie structurale à la compréhension des modules les plus couramment impliqués dans des structures d'adaptateurs et de l'assemblage tridimensionnel de ces modules.

Les domaines liant des pTyr

Jusqu'à présent, deux domaines protéiques ont été décrits pour leur capacité de reconnaître des séquences peptidiques contenant une tyrosine phosphorylée: il s'agit des domaines SH2 et PTB.

SH2

Le domaine SH2 (*Src homology domain 2*) a été découvert en 1986 dans une grande variété de protéines à

TIRÉS À PART

A. Ducruix.

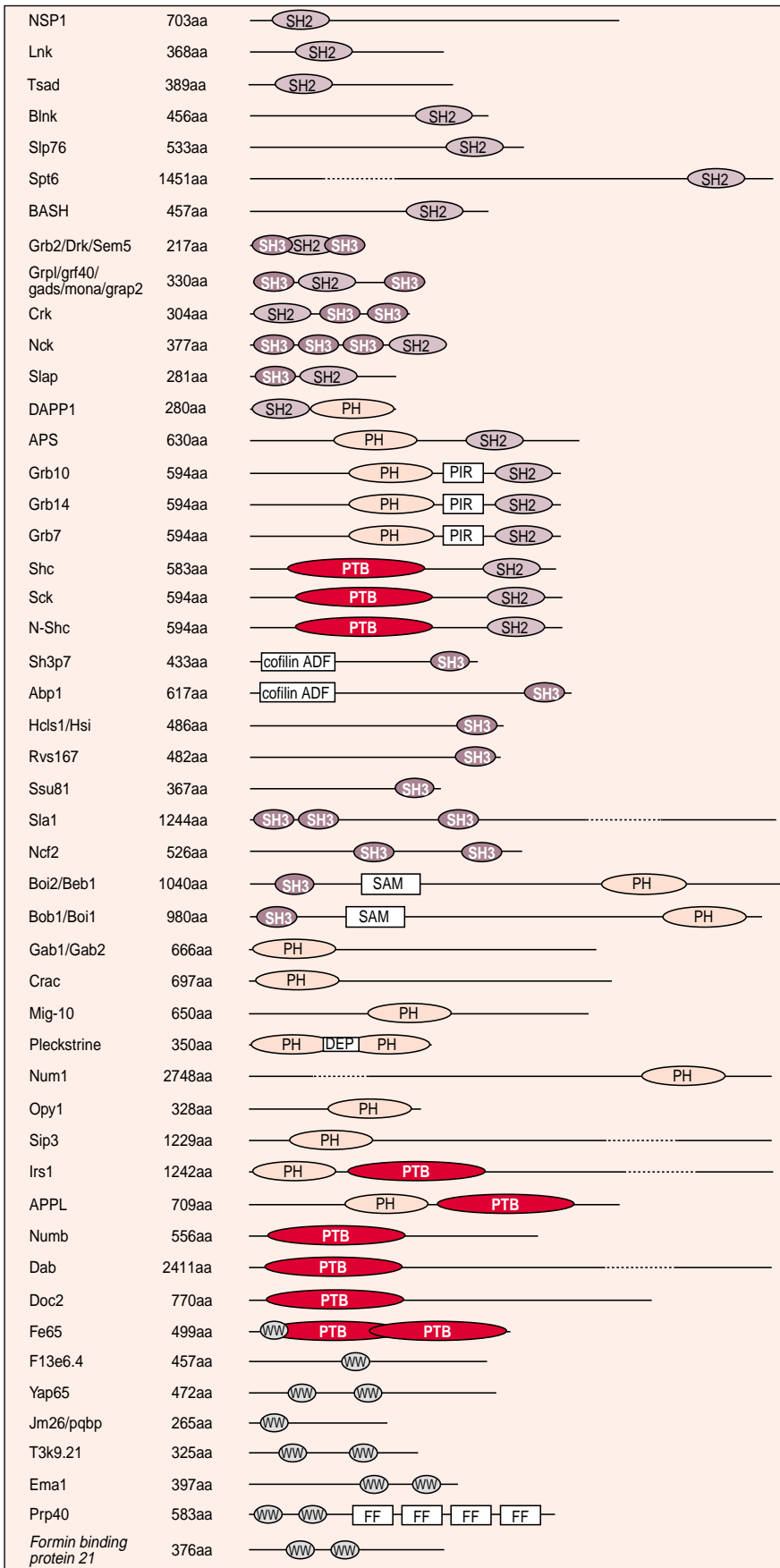


Figure 1. Représentation en domaines de protéines adaptatrices. SH2: Src homology domain 2; SH3: Src homology domain 3; PH: pleckstrin homology domain; PTB: phospho-tyrosine binding domain; WW: domaine contenant deux tryptophanes invariants; PIR: phosphorylated insulin receptor interacting region; Cofilin-ADF: actin dissociation factor de la cofiline; SAM: sterile motif; DEP: domaine mis en évidence chez dishevelled, Egl-10 et pleckstrin; FF: domaine contenant deux phénylalanines invariants.

activité tyrosine kinase (PTK) impliquées dans la transduction du signal, où il semblait moduler l'activité de ces protéines [1]. Cinq ans plus tard, sa fonction propre – la reconnaissance spécifique de séquences peptidiques contenant une tyrosine phosphorylée – a été mise en évidence [2]. Il permet ainsi à une protéine d'en reconnaître une autre lorsque cette dernière a été modifiée.

Ces domaines, d'une centaine d'acides aminés [3, 4], sont constitués de deux hélices α qui encadrent un feuillet β formé de cinq brins β antiparallèles dont la forme générale est $\beta\alpha\beta\beta\beta\beta\alpha\beta$. La tyrosine phosphorylée interagit avec l'arginine $\beta B5$ située au fond de la poche de fixation, conservée dans tous les domaines SH2. Cette poche est trop profonde pour permettre la fixation de phosphosérines ou de phosphothréonines. La spécificité des domaines SH2 pour des peptides ou protéines phosphotyrosylées est régie par les acides aminés situés en aval de la tyrosine phosphorylée en position +2 ou +3 suivant les domaines SH2 (figure 2A). Les analyses de dynamique moléculaire montrent que la plus grande partie de l'énergie de liaison est due à ces résidus [5]. L'affinité d'un domaine SH2 pour un peptide phosphotyrosylé est de l'ordre de 0,1-1 μM .

Inserés dans une protéine multidomaine, les domaines SH2 peuvent jouer un rôle de régulateur. Ainsi, associés en tandem, ils peuvent fonctionner comme un domaine isolé ou de façon coopérative comme dans la protéine-kinase Zap70 [6]. Dans le cas des protéines de la famille Src [7], le domaine SH2 joue le rôle de régula-

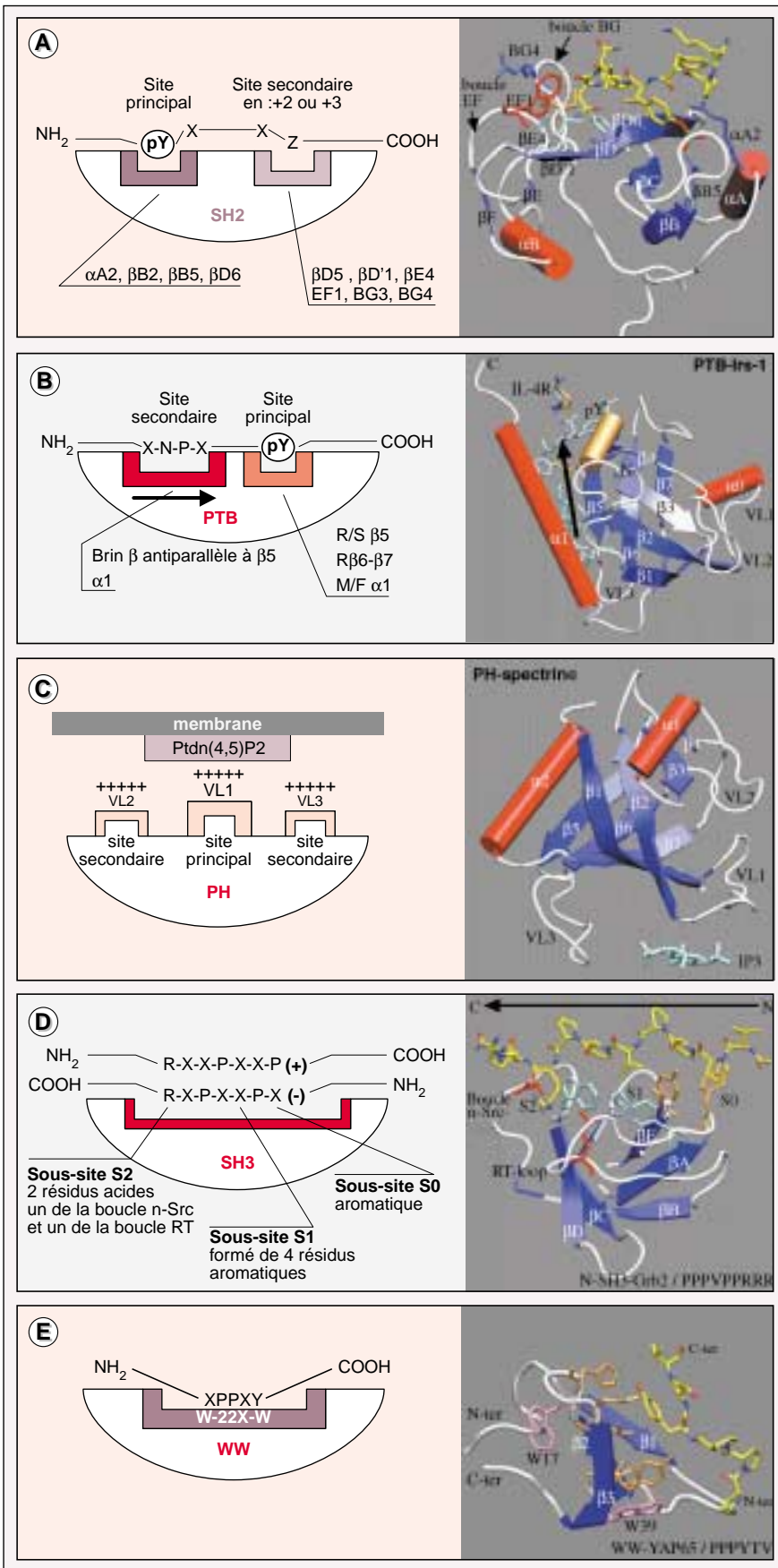


Figure 2. **Structure schématique et tridimensionnelle des différents domaines structuraux.** Les hélices α sont représentées par un cylindre rouge et les feuillettes β par des flèches bleues. Les chaînes latérales impliquées dans le processus de reconnaissance sont indiquées. **A. Domaine SH2:** le peptide pTyr est en jaune. **B. Domaine PTB:** le peptide pTyr est représenté par une flèche noire qui schématise un brin β antiparallèle au brin $\beta 5$. **C. Domaine PH:** la position de la molécule d'IP3 est située entre les boucles variables VL1 et VL3. **D. Domaine SH3:** le peptide riche en proline est en jaune. Ce peptide peut se « lire » de droite à gauche ou de gauche à droite. Dans le sens (+) R est en position amino-terminale, et dans le sens (-), en position carboxy-terminale. **E. Domaine WW:** le peptide riche en proline est en jaune.

teur positif et négatif en synergie avec le domaine SH3. Il se fixe sur une tyrosine phosphorylée (Y527) de la partie carboxy-terminale, entraînant un mouvement du domaine SH3, impliquant une réorientation des deux modules du domaine kinase (*m/s* 1994, n°6/7, p. 709). Cela empêche la phosphorylation de la tyrosine Y416, maintenant ainsi la protéine sous sa forme inactive. La séquence consensus reconnue par le domaine SH2 de Src est pYEEI, dans laquelle pY et l'isoleucine forment l'équivalent des fiches d'une prise électrique qui vont s'insérer dans les sites spécifiques. Or la séquence carboxy-terminale de Src ne contient pas une isoleucine en position +3 mais une glycine. Dans ce cas, seul le sous-site pY est occupé, comme le montre la structure cristallographique [8]. Dans le cas de la protéine Hck, le résidu en position +3 est une glutamine, résidu trop encombrant pour se loger dans le site secondaire. La structure cristallographique de Hck montre que le site secondaire n'est pas vide mais rempli par la proline située en position +4. Cela entraîne un moins bon ajustement du peptide phosphotyrosylé à la surface du domaine SH2 et donc une affinité peu élevée [9]. Ce « défaut d'appariement » du domaine SH2 au sein des

protéines de la famille Src permet à ces dernières de passer facilement sous leur forme active.

Les domaines SH2 étant principalement impliqués dans la transduction d'un signal d'une protéine à une autre, cela fait de ces domaines une cible pharmaceutique privilégiée. La recherche de nouveaux peptides ou peptidomimétiques se poursuit activement et certaines molécules synthétisées [10, 11] présentent d'ores et déjà des affinités nanomolaires.

PTB

Le deuxième domaine structural capable de se fixer sur des protéines phosphotyrosylées est le domaine PTB (*phospho-tyrosine binding domain*) qui, contrairement aux domaines SH2, se lie avec une spécificité amino-terminale en amont de la tyrosine phosphorylée (*figure 2B*). La constante de dissociation moyenne observée est de l'ordre du micromolaire.

Découvert en 1994 [12], il est de taille plus importante que les domaines SH2 avec environ 200 acides aminés. Sa structure tridimensionnelle est constituée de 7 brins β et 3 hélices α qui forment un sandwich de 3 et 4 feuillettes avec une hélice carboxy-terminale.

De même que pour les domaines SH2, des résidus arginines sont impliqués dans la fixation de la phosphotyrosine. Les domaines PTB se lient à leur cible en formant un feuillet β intermoléculaire antiparallèle. Quatre structures ont été résolues. Celle de Shc est intéressante puisque cette protéine, qui contient un domaine PTB et un domaine SH2, lie le récepteur à la fois du côté PTB et du côté SH2.

Les domaines PH

En fait si les domaines PTB sont très éloignés structuralement des domaines SH2, ils sont très proches de la structure des domaines de type PH (*pleckstrin homology*), observé pour la première fois dans la pleckstrine, principal substrat de la protéine-kinase C. Cette analogie structurale des domaines PTB et PH peut évoquer une communauté d'évolution à partir d'une origine commune. Ce type de domaine, d'une centaine d'acides aminés, se retrouve déjà

dans plus de 90 protéines dont de nombreuses impliquées dans la transduction telles que des facteurs d'échanges (Sos), des GTPases (Dynamine), des sérine/thréonine kinase (Bcr), des adaptateurs (IRS1) ou encore des protéines associées aux lipides (PI3K) [13].

Plusieurs structures de domaine PH sont maintenant connues. Ces domaines contiennent une région positivement chargée au niveau des trois boucles variables et un résidu tryptophane conservé situé au milieu de l'hélice α carboxy-terminale (*figure 2C*). Il est maintenant admis que les domaines PH servent à recruter leur protéine hôte vers la membrane plasmique *via* des interactions entre la région positivement chargée et des phospholipides spécifiques. La constante de dissociation pour l'inositol phosphate varie de 0,2 μ M à 1 mM. Les domaines PH peuvent également se lier aux protéines G trimériques.

Dans les protéines de la signalisation, certains domaines jouxtent systématiquement un domaine PH. C'est le cas pour les domaines DH (*Dbl homology*) et Btk (*bruton tyrosine kinase domain*). Des structures cristallographiques de ces domaines en tandem avec leur domaine PH ont été résolues [14, 15], mettant en évidence la flexibilité des régions charnières. A ce jour, Btk est l'unique cas connu dans lequel des mutations dans le domaine PH sont à l'origine d'une maladie humaine. Le déficit en Btk conduit à une aglobulinémie liée au sexe chez l'homme.

Les domaines liant les régions riches en proline

Les domaines SH3

Les domaines SH3 (*Src homology 3*) sont constitués d'environ 60 acides aminés et se retrouvent dans une grande variété de protéines de la signalisation cellulaire, du cytosquelette ou encore de la réponse immunitaire. Le rôle des domaines SH3 dans la cellule est varié: localisation cellulaire, régulation, recrutement. Le mécanisme d'interaction des domaines SH3 n'a été élucidé que tardivement [16], mettant en évi-

dence la spécificité du domaine pour des peptides riches en proline de motif général PXXP. Les meilleures affinités observées sont de l'ordre du micromolaire.

La topologie des domaines SH3 est la même pour toutes les structures: un tour d'hélice 3_{10} et un tonneau β constitué de cinq brins antiparallèles qui forment 2 feuillettes perpendiculaires. La structure de complexes montre que le peptide riche en proline se lie au domaine en adoptant une conformation d'hélice polyproline de type II (PPII). Structuralement, cela revient à enrouler un peptide autour d'un prisme, soit 3 résidus par tour d'hélice. Trois sous-sites assurent la liaison au peptide (*figure 2D*). Une face de ce prisme entre en contact avec le domaine SH3 pour réaliser la liaison et deux acides aminés du peptide sur trois sont donc en contact avec le site de fixation.

Il est apparu qu'il existait deux classes de domaines SH3. Les domaines SH3 de la première classe lient les peptides dans le sens «+» (RXXPPXXP: arginine amino-terminale dans le sous-site S2) et ceux de la seconde classe, dont Grb2 fait partie, les lient dans le sens «-» (XPXXPR: arginine carboxy-terminale dans le sous-site S2) [17]. Cela est rendu possible par le fait que l'hélice PPII est pratiquement symétrique et présente au domaine SH3 les chaînes latérales dans une position similaire quelle que soit l'orientation du peptide. L'arginine amino- ou carboxy-terminale semble cruciale pour l'interaction peptide-SH3 et définit l'orientation du peptide sur le site [18]. Un article récent de l'équipe de Lim [19] a montré que la reconnaissance de la séquence signature par les domaines SH3 ne se fait pas suivant un mécanisme « clé-serrure » mais par une discrimination de la proline qui est le seul acide aminé naturel qui présente une substitution sur l'azote peptidique. Des peptidomimétiques N-alkylés synthétisés présentent des affinités très supérieures à celles des peptides non modifiés et cette sélectivité pourrait faire de ces molécules des « inhibiteurs » de domaines SH3.

Les domaines WW

Les domaines WW sont de taille réduite (une quarantaine d'acides aminés) et présentent toujours deux trypto-

phanes conservés, le deuxième étant impliqué dans la reconnaissance (figure 2E). On les retrouve souvent dans les protéines de la signalisation sous forme de copie multiple. Ils pourraient servir de régulateurs aux domaines SH3. Les domaines WW sont formés d'un feuillet β à 3 brins. Comme les domaines SH3, ils lient les peptides riches en proline qui adoptent une conformation de type PPII avec une préférence pour le motif XPPXY. Les constantes de dissociation sont de l'ordre de la dizaine de micromolaires. Il a été proposé que les domaines WW soient impliqués dans des maladies humaines mais seul le cas du syndrome de Liddle semble démontré [20].

Un exemple d'assemblage de domaines pour l'adaptateur Grb2

L'adaptateur Grb2 (25 kDa) est constitué d'un domaine SH2 relié à deux domaines SH3 amino- et carboxy-terminaux par des jonctions de respectivement 4 et 7 acides aminés. La structure cristallographique [21] montre que les structures des domaines isolés faites par RMN sont en bon accord avec la structure cristallographique (*m/s* 1999, n°5, p.736). Le domaine SH2 repose sans interagir directement sur les domaines SH3 qui eux-mêmes ont une interface commune. Étant donné leur rôle important, les connexions entre les différents domaines constituent une partie de la structure à elles seules. En effet, elles maintiennent les domaines SH3 loin du domaine SH2 et empêchent ainsi toute interaction. On peut se demander si ces deux longues chaînes ne pourraient pas se mouvoir et faire de Grb2 un adaptateur flexible.

L'affinité de Grb2 pour Sos est de quelques nanomolaires ce qui est bien meilleur que l'affinité de chaque domaine SH3. La combinaison de la liaison des deux domaines SH3 doit en être la raison. La connaissance de la position relative des deux domaines SH3 dans la structure a permis à l'équipe de C. Garbay de modéliser un peptide dimère [22] dont l'affinité est de quelques nanomolaires.

Les adaptateurs ont de multiples partenaires

Les adaptateurs sont en général impliqués dans de nombreuses interactions

protéine-protéine. Par exemple, on retrouve Grb2 de la voie des facteurs de croissance jusqu'à la réponse au stress induit par irradiation, en passant par l'endocytose au niveau des synapses. Le plus étonnant avec les adaptateurs est le nombre de partenaires qu'on leur suppose. Effectivement, dans le cas de Grb2 plus de 25 protéines semblent se fixer tant sur son domaine SH2 que sur ses domaines SH3. Cependant, toutes ces protéines n'interagissent pas en même temps avec Grb2, puisque la plupart d'entre elles n'existe que dans des types cellulaires précis. Il faut également signaler que Grb2 n'est pas le seul partenaire connu pour chacune de ces protéines, ce qui donne une idée sur la complexité et les ramifications de la signalisation cellulaire. Il semblerait donc que cet adaptateur moléculaire soit capable de recevoir un signal de multiples façons mais qu'il ne le redistribue que dans quelques directions dépendantes du type de cellule. Dans plusieurs cas de transduction de signal (récepteur à l'insuline, PDGF...), Grb2 ne se lie pas directement au récepteur mais à Shc, une autre molécule adaptatrice. D'autres adaptateurs tel que Grap2 sont très voisins de Grb2 en succession de domaines mais ils appartiennent à des voies de signalisation différentes.

De nouveaux adaptateurs ont été récemment caractérisés et on peut s'attendre à ce que leur nombre s'accroisse dans les années à venir. Ainsi, Grb14 est un nouvel adaptateur multidomaine spécifique de la voie de la transduction du signal de l'insuline. Il possède un domaine SH2 mais également un nouveau domaine, PIR (*phosphorylated insulin receptor interacting region*) également connu sous le nom de BPS (*between PH and SH2 domains*) [23], qui tous deux lient le récepteur de l'insuline [24].

Les adaptateurs ont-ils d'autres fonctions ?

Récemment, il a été proposé [25] que Grb2 puisse être un activateur de N-WASP et augmenter son affinité pour le complexe Arp2/3, conduisant ainsi à une stimulation de la polymérisation de l'actine. Cette action se ferait *via* le domaine SH3 carboxy-terminal qui se lierait à la région riche en pro-

line de WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) ou à N-WASP (homologue neuronal de WASP). Ces protéines jouent un rôle-clé dans la connexion entre les voies de signalisation et la motilité.

Conclusions

On observe que de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation, en particulier presque toutes celles de grande taille, sont constituées de domaines structuraux que l'on retrouve dans plusieurs protéines et qui présentent des analogies de séquence. Il faut noter que les extrémités amino- et carboxy-terminales sont proches l'une de l'autre et il semble que cette caractéristique soit propre à tous les modules structuraux. Cela permet en effet d'isoler un domaine dans une protéine de grand poids moléculaire et de lui garder son repliement, ce qui avait amené Pierre Chardin à écrire dans un article de *médecine/sciences* [26]: « Dieu ne joue pas aux dés, il préfère le légo. » Ces domaines structuraux sont remarquablement conservés au cours de l'évolution (nématode, drosophile, mammifère). Ainsi, l'évolution semble puiser dans un répertoire limité de domaines ayant chacun une fonction simple. La position relative de chacun de ces domaines l'un par rapport à l'autre a permis de créer des assemblages de plus grande taille, ce qui permet d'acquérir des fonctions plus complexes ■

Remerciements

Les auteurs remercient l'ARC, la Ligue nationale contre le cancer et le Cnrs pour leur soutien financier. Les coordonnées du domaine WW nous ont été gracieusement fournies avant dépôt à la Protein Data Bank par le Dr M. Sudol. Nous remercions les arbitres de *médecine/sciences* pour leurs remarques judicieuses.

RÉFÉRENCES

1. Sadowski I, Stone JC, Pawson T. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of fujinami virus P130^{gag-1p5}. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 4396-408.

RÉFÉRENCES

2. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991; 252: 668-74.
3. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995; 373: 573-80.
4. Kuriyan J, Cowburn D. Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 1997; 26: 259-88.
5. Kay LE, Muhandiram DR, Shoelson SE, Forman-Kay JD. Correlation between binding and dynamics at SH2 domain interface. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 156-63.
6. Hatada MH, Lu X, Laird ER, et al. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 1995; 377: 32-8.
7. Williams JC, Wierenga RK, Saraste M. Insights into Src kinase functions: structural comparisons. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 179-84.
8. Xu W, Harrison SC, Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 1997; 385: 595-602.
9. Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 1997; 385: 602-9.
10. Gay B, Suarez S, Caravatti G, Furet P, Meyer T, Schoepfer J. Selective Grb2 SH2 inhibitors as anti-ras therapy. *Int J Cancer* 1999; 83: 235-41.
11. Liu WQ, Vidal M, Gresh N, Roques BP, Garbay C. Small peptides containing phosphotyrosine and adjacent α Me-phosphotyrosine or its mimetics as highly potent inhibitors of Grb2 SH2. *J Med Chem* 1999; 42: 3737-41.
12. Borg JP, Fournier E, Margolis B, Birnbaum D. PTB, un domaine d'interaction protéine-protéine important dans le « jeu de dominos » de la transmission du signal. *Med Sci* 1997; 13: 647-56.
13. Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 1996; 85: 621-4.
14. Soisson SM, Nimnual AS, Uy M, Bar-Sagi D, Kuriyan J. Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human Son of Sevenless protein. *Cell* 1998; 95: 259-68.
15. Hyvönen M, Saraste M. Structure of the PH domain and Btk motif from Bruton's tyrosine kinase: molecular explanations for X-linked agammaglobulinaemia. *EMBO J* 1997; 16: 3396-404.
16. Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G, Baltibore D. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and Gap-rho. *Science* 1992; 257: 803-6.
17. Saraste M, Musacchio A. Backwards and forwards binding. *Struct Biol* 1994; 12: 835-7.
18. Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 1994; 266: 1241-7.
19. Nguyen JT, Turck CW, Cohen FE, Zuckermann RN, Lim WA. Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors. *Science* 1998; 282: 2088-92.
20. Sudol M. Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol* 1996; 65: 113-32.
21. Maignan S, Guilloteau J, Fromage N, Arnoux B, Becquart J, Ducruix A. Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* 1995; 268: 291-3.
22. Cussac D, Vidal M, Leprince C, et al. A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB J* 1999; 13: 31-9.
23. He WM, Rose DW, Olefsky JM, Gustafson TA. Grb10 interacts differentially with the insulin receptor, insulin-like growth factor I receptor, and epidermal growth factor receptor via the Grb10 Src homology 2 (SH2) domain and a second novel domain located between the Pleckstrin homology and SH2 domains. *J Biol Chem* 1998; 273: 6860-7.
24. Burnol AF. rGrb14, premier inhibiteur endogène de l'insuline. *Med Sci* 1999; 15: 284.
25. Carlier MF, Nioche P, Broutin I, et al. Grb2 links signalling to actin assembly by enhancing N-WASP interaction with ARP2/3 complex. *J Biol Chem* 2000 (sous presse).
26. Chardin P. Dieu ne joue pas aux dés, il préfère le légo. *Med Sci* 1997; 13: 627-8.

ms2000

Summary

Structural domains and signaling networks

The adaptor proteins play an important role in many transduction pathways by coupling directly or not transmembrane receptors. They are composed of several domains, the most common being SH2, PTB, PH, SH3 and WW. These domains are found in many signal transduction proteins because they allow specific protein-protein recognition. The SH2 and PTB domains recognize tyrosine phosphorylated peptides whereas SH3 and WW domain specifically bind to proline rich peptides in the type II helical polyproline conformation. The present review aims at presenting a structural biology point of view of some of the domains involved in adaptors and the role of the three dimensional assembly of these domains to gain functionality.