

## GAB1 : un adaptateur protéique multifonctionnel

Les associations protéines-protéines jouent un rôle fondamental dans la régulation des processus de signalisation intracellulaire en contrôlant les activités des enzymes effectrices de ces relais. Ce contrôle peut s'effectuer, d'une part, en permettant la localisation de l'enzyme à proximité de son substrat : ainsi, l'activité de la phosphatidylinositol 3-kinase est contrôlée en partie par son transfert à proximité de la membrane plasmique où se trouvent localisés ses substrats, les phospho-inositides [1]; d'autre part, l'activité de l'enzyme peut être modifiée par un processus de type allostérique par l'association à une autre protéine. Ainsi, l'activité de la phosphotyrosine phosphatase SHP-1 est considérablement augmentée lorsqu'elle est liée à une protéine par ses domaines SH2 [2]. Ces interactions peuvent être réalisées directement entre les récepteurs qui déclenchent ces processus de transmission intracellulaire du signal et les enzymes effectrices mais, dans de nombreux cas, des adaptateurs moléculaires permettent de coupler ces protéines. La notion d'adaptateur moléculaire n'est pas sans ambiguïté. On définit généralement un adaptateur moléculaire comme une molécule sans activité enzymatique, composée d'au moins deux modules permettant chacun une interaction avec une autre protéine. On sait toutefois depuis quelque temps que des effecteurs enzymatiques peuvent se comporter comme des adaptateurs moléculaires dans des associations où leur activité enzymatique n'est pas impliquée : ainsi la phosphotyrosine phosphatase SHP-2 constitue un adaptateur moléculaire susceptible de lier le récepteur

du PDGF à Grb2 [3]. Des récepteurs eux-mêmes peuvent quelquefois jouer le rôle d'adaptateurs moléculaires comme le récepteur de l'EGF qui semble coupler l'activation du récepteur de l'hormone de croissance à la voie MAP kinase [4]. Toutefois, contrairement à ces enzymes et à ces récepteurs dont la fonction est évidemment plus large, le rôle de certaines protéines semble limité à celui d'adaptateur moléculaire c'est-à-dire d'intermédiaire dans la réalisation de complexes multiprotéiques ; les protéines SHC, Grb2, IRS1 et IRS2 constituent de bons exemples d'adaptateurs moléculaires *stricto sensu* (voir [5] pour une revue récente concernant les adaptateurs moléculaires de type IRS). On a récemment cloné l'ADNc d'un nou-

vel adaptateur proche d'IRS1, la protéine GAB1.

GAB1 a été cloné par le groupe d'A. Wong qui recherchait des protéines interagissant avec Grb2 dans une banque d'expression construite à partir des ARN messagers d'une tumeur gliale [6]. La protéine GAB1 (figure 1) comprend 694 acides aminés. Elle possède une masse moléculaire théorique de 77 kDa mais migre en électrophorèse sur gel de polyacrylamide comme une protéine de 115 kDa. Cette différence est, au moins en partie, due à un fort contenu de la protéine en résidus proline. Une forme de 95 kDa est aussi présente dans de nombreux tissus. La relation entre ces deux protéines (épissage alternatif, coupure protéolytique, second gène) n'est pas établie

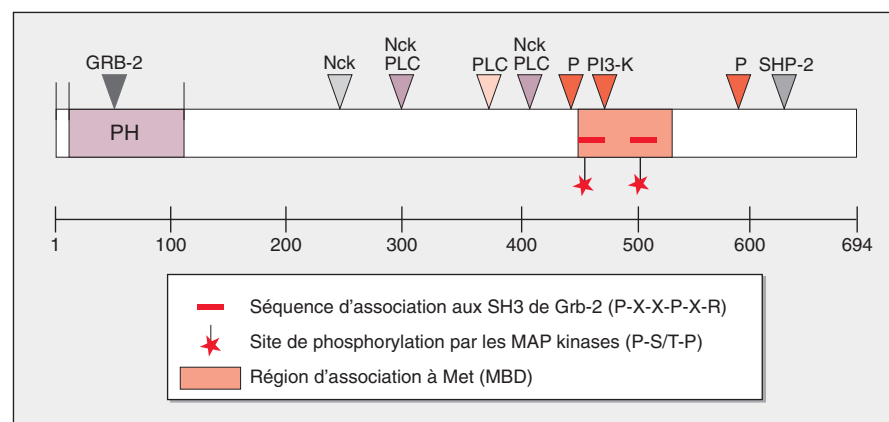


Figure 1. **Structure de la protéine GAB1.** Le domaine d'association à Met déterminé par la méthode du double-hybride en levures [10] est indiqué. Cette région contient aussi deux séquences consensus de fixation pour les domaines SH3 de Grb2 (traits épais rouges) dont une partie constitue un site de phosphorylation potentielle par les MAP kinases. Les triangles disposés au-dessus du schéma indiquent des sites de fixation potentielle pour les domaines SH2 des protéines de signalisation indiquées (P : phosphatidylinositol 3-kinase).

mais les deux protéines sont probablement très proches puisqu'elles sont reconnues par les mêmes anticorps et présentent des profils de digestion par la protéase V8 partiellement identiques [7]. La partie amino-terminale de la molécule est constituée par un domaine PH (*pleckstrin homology*). Le rôle de ce domaine est actuellement inconnu bien que des expériences récentes aient montré que des formes de GAB1 délétées de ce domaine n'étaient plus phosphorylées sur tyrosine en réponse à l'insuline [8]. Les domaines PH sont connus pour interagir avec les phospholipides [9]. Cependant, nous ignorons actuellement quels phospholipides sont reconnus par le domaine PH de GAB1. Le reste de la molécule est formé d'une région riche en résidus proline et sérine contenant plusieurs résidus tyrosine phosphorylables. Cette région est homologue de la région carboxy-terminale d'IRS1 mais est environ deux fois plus courte, bien que le nombre de résidus Tyr, Ser ou Thr soit sensiblement le même dans cette région des deux molécules. Pour cette raison, GAB1 est quelquefois considérée comme une forme compressée d'IRS1. Toutefois, contrairement à IRS1, GAB1 ne possède pas de domaine de type PTB (*phosphotyrosine binding*). Un nouveau domaine capable de fixer les tyrosines phosphorylées pourrait toutefois être présent sur GAB1 ([10], voir ci-dessous). L'analyse des séquences peptidiques suivant les 20 résidus tyrosine présents dans la molécule GAB1 révèle la présence de sites de liaison possibles pour les domaines SH2 de Grb2 (1 site), de Nck (3 sites), de la phospholipase C- $\gamma$  (3 sites), de la tyrosine phosphatase SHP-2 (1 site) et de la phosphatidylinositol 3-kinase (3 sites). Deux séquences riches en proline et constituant des sites consensus parfaits pour la fixation des domaines SH3 de Grb2 sont présents dans la molécule [11]. De façon intéressante, ces deux sites incluent une séquence potentielle de phosphorylation par les MAP kinases laissant supposer une régulation possible de la fixation de Grb2 à GAB1 par ces kinases. La protéine Grb2 pourrait donc s'associer à GAB1, soit par son domaine SH2, soit par ses domaines SH3. Les deux associations

ne sont, bien sûr, pas équivalentes; dans le premier cas, les domaines SH3 de Grb2 demeureraient libres et pourraient interagir avec des effecteurs intracellulaires comme SOS [9]. Cette possibilité est actuellement théorique car ce type d'association n'a jusqu'à présent pas été mis en évidence et nous ignorons si la tyrosine de GAB1 susceptible de fixer Grb2, curieusement située dans le domaine PH, est phosphorylée. Dans le second cas, le SH2 de Grb2 reste libre et permet l'association de Grb2 à des protéines phosphorylées sur tyrosine. Ce mécanisme joue un rôle important dans l'association de GAB1 à Met (voir ci-dessous). La protéine GAB1 possède de très nombreux résidus Ser et Thr potentiellement phosphorylables; 47 sites présentant des consensus pour la phosphorylation par la PKA, les PKC, la caséine kinase II, les MAP kinases et la kinase Cdc2 ont ainsi été recensés dans la séquence primaire de GAB1. La protéine GAB1 extraite de cellules stimulées par différents facteurs de croissance présente un important retard électrophorétique qui s'explique probablement par la phosphorylation de plusieurs de ces sites ([6] et travaux non publiés dans notre laboratoire). Une étude succincte des ARN messagers (par *Northern blot*) montre que l'expression de GAB1 est ubiquitaire dans des tissus humains à l'exception du foie, du poumon et du rein [6]. Toutefois, une étude ultérieure a révélé la présence de la protéine GAB1 dans des cellules de rein de chien de type Madin-Darby et dans des extraits de poumon et de rein de souris [7]. De toute évidence, l'analyse de l'expression de GAB1 reste à faire. La phosphorylation sur tyrosine de GAB1 est induite par l'activation de plusieurs récepteurs de facteurs de croissance; le récepteur de l'insuline [6], celui de l'EGF activé par son propre ligand [6] ou transactivé par des récepteurs couplés à G $_q$  ou G $_i$  [12], le récepteur du NGF [13], celui de l'*hepatocyte growth factor* (Met) [7, 10, 14] et plusieurs récepteurs de cytokines dont ceux des interleukines-3 et -6 [15], de l'érythropoïétine et de la thrombopoïétine (travaux non publiés de notre laboratoire). Le mécanisme par lequel la protéine Met induit la phos-

phorylation de GAB1 commence à être partiellement compris (*figure 2*). La transmission intracellulaire du signal de Met met en jeu un site de liaison multiple situé près de l'extrémité carboxy-terminale de la molécule. Ce site, constitué de deux tyrosines phosphorylables (séquence YpVHVNATYpVNV)\* fixe et active plusieurs molécules participant à la transmission du signal, dont le complexe Grb2/SOS, la phosphatidylinositol 3-kinase et la phospholipase C- $\gamma$ . Sa délétion abolit la majorité des réponses relayées par Met. Trois groupes viennent de montrer que cette séquence de Met qui fixe GAB1 semble, en outre, indispensable à la transmission intracellulaire du signal émis par ce récepteur. La fixation de GAB1 à Met paraît mettre en jeu deux mécanismes probablement coopératifs. Le premier de ces mécanismes implique un autre adaptateur moléculaire, Grb2, et la seconde tyrosine (Y<sup>1356</sup>) du site de liaison multiple de Met. Ce résidu tyrosine est dans un contexte peptidique favorable à une association avec le domaine SH2 de Grb2 qui, par ailleurs, peut former des liaisons avec les séquences riches en prolines de GAB1 par le biais de ses domaines SH3 [6]. Le domaine SH3 carboxy-terminal de Grb2 semble plus particulièrement impliqué dans l'association avec GAB1 [7]. Un second mécanisme met en jeu le premier résidu tyrosine (Y<sup>1349</sup>) du site de liaison multiple de Met qui, après phosphorylation, semble s'associer directement avec la région 450-532 de GAB1 (région MBD) [10]. La séquence peptidique de cette région de GAB1 ne révèle pas la présence de domaine SH2 ou PTB. GAB1 pourrait donc contenir un nouveau domaine de reconnaissance des résidus phosphotyrosine. Ces deux processus d'association entre GAB1 et Met semblent agir de façon synergique plus qu'additive [7]. Toutefois, le mécanisme mettant en jeu Grb2 semble le plus important. Après association avec Met, GAB1 est phosphorylé sur tyrosine par Met [7] et présente des points d'ancrage pour les domaines SH2 de la PI 3-kinase, de la phospho-

\* A: Ala; H: His; N: Asn; T: Thr; V: Val; Y: Tyr.

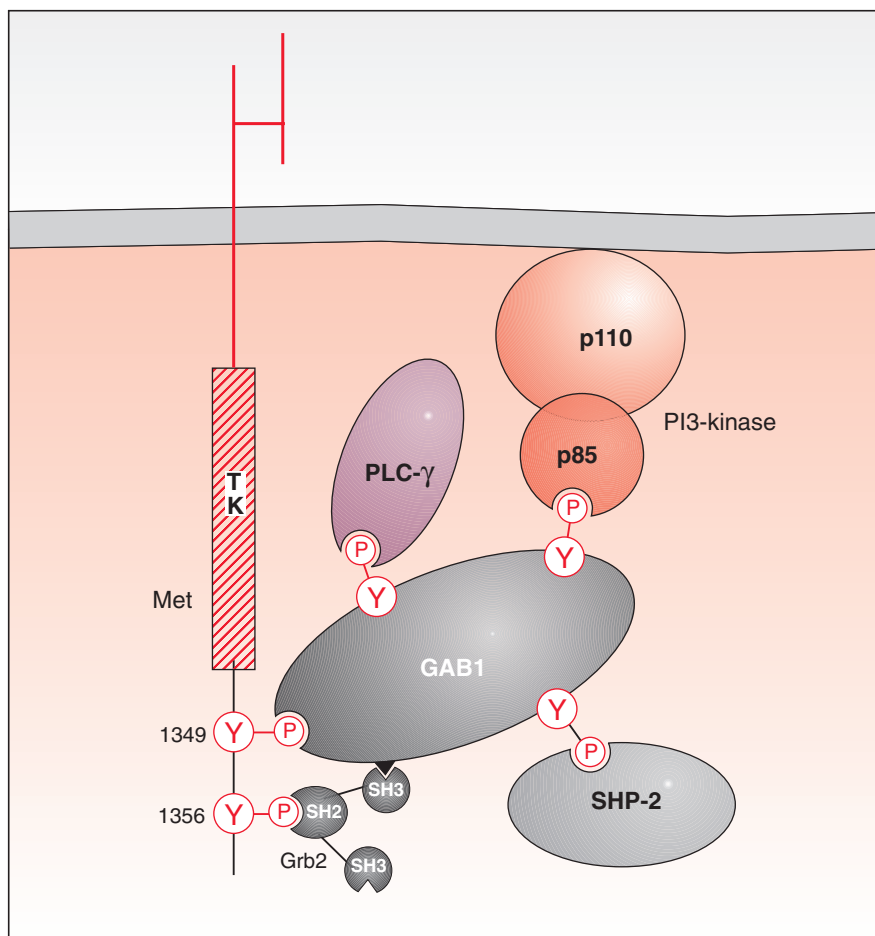


Figure 2. **Formation d'un complexe de signalisation multimoléculaire autour de GAB1 et de Met.** L'activation de Met, le récepteur de l'hépatocyte growth factor, provoque la phosphorylation des tyrosines 1349 et 1356 du récepteur. La tyrosine 1349 fixe GAB1 directement et la tyrosine 1356 fixe Grb2 par son domaine SH2 laissant la possibilité aux domaines SH3 de Grb2 de s'associer aux motifs riches en proline de GAB1. GAB1 est alors phosphorylé par Met. Les tyrosines phosphorylées de GAB1 constituent alors des points d'ancrage pour les domaines SH2 de plusieurs protéines de signalisation comme SHP-2, PLC- $\gamma$  ou la sous-unité régulatrice (p85) de la PI 3-kinase.

lipase C- $\gamma$  et de SHP-2 [7, 14]. L'activation des récepteurs de cytokines induit la phosphorylation de GAB1 et son association avec la PI 3-kinase, SHP-2, SHC, Grb2 et SHIP [15] (et travaux non publiés de notre laboratoire). Cependant, l'association entre GAB1 et les récepteurs de cytokines n'a pas pu être mise en évidence et les tyrosines de ces récepteurs ne sont pas nécessaires à l'induction de la phosphorylation de GAB1 [15]. Le processus d'activation de GAB1 par les récepteurs de cytokines est donc différent de celui utilisé par Met.

L'association de GAB1 aux récepteurs de l'EGF, de l'insuline, du NGF et des cytokines n'a pas été rapportée et le mécanisme utilisé par ces récepteurs pour induire la phosphorylation de GAB1 n'est pas encore connu.

La surexpression de GAB1 dans les cellules fibroblastiques de type NIH 3T3 augmente leur prolifération en milieu pauvre en sérum et permet leur prolifération avec perte de l'inhibition de contact. Ce phénomène est généralement considéré comme une indication de transformation tumorale. Toutefois, la proli-

fération de ces cellules reste dépendante de la présence d'un facteur de croissance [6]. La surexpression de GAB1 dans les cellules nerveuses de type PC12 protège ces cellules de l'apoptose. Cet effet nécessite la fixation de la PI 3-kinase à GAB1 [7]. L'activation de Met dans les cellules épithéliales provoque la dissociation des cellules et stimule leur mobilité (l'un des noms portés par le ligand de Met est *scatter factor*) [16]. Ces cellules peuvent alors former des tubules ramifiés lorsqu'elles sont cultivées sur des structures tridimensionnelles de collagène (action « morphogénétique »). La surexpression de GAB1 dans des cellules épithéliales de rein de singe reproduit les effets d'une activation de Met. En revanche, la surproduction d'une forme de type « dominant-négatif » de GAB1 constituée de la seule région d'association à Met, bloque l'action morphogénétique de Met [10].

Les résultats dont nous disposons actuellement montrent que la protéine GAB1 joue donc un rôle très important dans le processus de transmission intracellulaire du signal de Met et qu'elle est impliquée dans la transmission intracellulaire du signal d'autres récepteurs (EGF, insuline, NGF, interleukines-3 et -6, érythropoïétine, thrombopoïétine). Il est probable que cette liste de récepteurs est aujourd'hui très incomplète. En effet, l'expression de GAB1 semble ubiquitaire et le mécanisme d'activation de GAB1 par Met suggère que les récepteurs susceptibles de fixer Grb2, directement ou par l'intermédiaire de Shc, sont potentiellement capables de fixer GAB1. L'identification des relais activés *via* GAB1 est encore très incomplète. La *figure 1* montre la présence de nombreux sites de fixation potentielle pour différentes protéines de transmission intracellulaire du signal. Les fixations de la phosphatidylinositol 3-kinase et de la PLC- $\gamma$  à GAB1 ont déjà été démontrées, indiquant que GAB1 joue un rôle important dans le métabolisme d'une molécule-clé de la transmission intracellulaire du signal, le phosphatidylinositol 4-5 bisphosphate. Une question importante à régler concerne l'activation de la voie

Ras *via* GAB1. La protéine GAB1 possède au moins deux sites de fixation possible pour le domaine SH2 de Grb2; il existe une tyrosine incluse dans une séquence consensus de fixation de Grb2 dans la partie aminoterminale de GAB1 (figure 1) et Grb2 peut s'associer à la forme phosphorylée de SHP-2 fixée à GAB1 [3]. Ces deux types d'association permettraient le recrutement du facteur d'échange de Ras, SOS, dans le complexe multiprotéique formé autour de GAB1. La présence de SOS dans ce complexe n'a pas encore été rapportée. Enfin, il n'est pas certain que le recrutement de GAB1 par différents récepteurs mène à l'engagement des mêmes relais de transmission intracellulaire du signal dans la mesure où la spécificité des tyrosine kinases de ces récepteurs pourrait conduire à la phosphorylation préférentielle de différentes tyrosines de GAB1 ■

## RÉFÉRENCES

1. Kapeller R, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* 1994; 16: 565-76.
2. Pei D, Lorenz U, Klingmuller U, Neel BG, Walsh CT. Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains. *Biochemistry* 1994; 33: 15483-93.
3. Bennett AM, Tang TL, Sugimoto S, Walsh CT, Neel BG. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7335-9.
4. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, et al. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 1997; 390: 91-6.
5. Yenush L, White MF. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* 1997; 19: 491-500.
6. Holgado-Madruga M, Emler DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 1996; 379: 560-4.
7. Nguyen L, Holgado-Madruga M, Maroun C, Fixman ED, Kamikura D, Fournier T, Charest A, Tremblay ML, Wong AJ, Park M. Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J Biol Chem* 1997; 272: 20811-9.
8. Rocchi S, Tartare-Deckert S, Murdaca J, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Van Obberghen E. Determination of Gab1 (Grb2-associated binder-1) interaction with insulin receptor-signaling molecules. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 914-23.
9. Boivin P, Lecomte M. Les domaines homologues de la pleckstrine. *Med Sci* 1997; 13: 639-46.
10. Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 1996; 384: 173-6.
11. Chardin P. Domaines SH2 et SH3 : un nouveau paradigme pour la transmission du signal. *Med Sci* 1994; 10: 709-12.
12. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 1997; 16: 7032-44.
13. Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emler DR, Dieterich R, Wong AJ. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12419-24.
14. Bardelli A, Longati P, Gramaglia D, Stella MC, Comoglio PM. Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* 1997; 15: 3103-11.
15. Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 4109-17.
16. Wicker R, Guillermo Suarez H. Le facteur de croissance des hépatocytes HGF-SF et son récepteur c-Met: fonctions biologiques et activation oncogénique. *Med Sci* 1996; 12: 313-22.
17. Borg J, Fournier E, Birnbaum D, Margolis B. PTB, un domaine d'interaction protéine-protéine important dans le jeu de dominos de la transduction du signal. *Med Sci* 1997; 13: 647-56.

### Carinne Lecoq-Lafon

Interne des hôpitaux de Paris, Inserm U. 363, hôpital Cochin.

### Catherine Lacombe

Maître de conférence, praticien hospitalier, Laboratoire d'hématologie et Inserm U. 363, hôpital Cochin.

### Patrick Mayeux

Directeur de recherche au Cnrs, Inserm U. 363, Inserm U. 363, ICGM, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

### TIRÉS À PART

C. Lecocq-Lafon.

