

## Les domaines homologues de la pleckstrine

Pierre Boivin  
Marie-Christine Lecomte

La pleckstrine est le principal substrat de la protéine kinase C dans les plaquettes. Elle possède deux segments homologues, d'environ 100 acides aminés chacun, dénommés domaines homologues de la pleckstrine (PH). Ces domaines ont une structure secondaire composée de sept segments en plis  $\beta$  antiparallèles et d'une hélice  $\alpha$  qui forment un « sandwich » dans la structure tridimensionnelle. On retrouve des domaines homologues de la pleckstrine dans un grand nombre de protéines dont le seul point commun est qu'elles sont ou doivent être liées à la membrane cellulaire pour exercer leur fonction : le domaine PH peut reconnaître particulièrement les phosphoinositides membranaires et les chaînes  $\beta\gamma$  des protéines G trimériques. Les protéines à domaine PH peuvent aussi recruter d'autres protéines cytosoliques qui ne sont actives que liées à la membrane ou rapprochées de leurs ligands. De très nombreuses protéines impliquées dans la transmission du signal portent un domaine PH souvent associé aux domaines homologues de Dbl ou aux domaines SH2 et SH3, ce qui évoque la possibilité d'une coopération fonctionnelle.

Lorsque les plaquettes sont soumises à un agoniste tel que la thrombine, plusieurs protéines sont phosphorylées par activation de la protéine-kinase C. La principale d'entre elles est une protéine de 40 à 47 kDa, primitivement appelée p47, présente également dans les leucocytes et rebaptisée pleckstrine (*platelet and leucocyte C kinase substrate*) [1].

La séquence de la pleckstrine a été établie à partir d'un ADNc. La molécule possède à ses deux extrémités carboxy et amino-terminales deux segments homologues d'environ 100 acides aminés chacun, dénommés domaines homologues de la pleckstrine (*pleckstrin homology domain*, PH)

A partir de l'analyse de bases de données des séquences protéiques, deux groupes d'auteurs ont montré, en 1993, que des motifs analogues à ceux de la pleckstrine étaient présents dans un nombre important de protéines, n'ayant apparemment aucun lien fonctionnel commun [2, 3]. L'extension de ces recherches a conduit à retrouver, en moins de deux années, des domaines PH dans plus de 90 protéines [4] ; la liste n'est probablement pas close, les analogies de séquence étant souvent faibles et très différentes d'une protéine à l'autre : par exemple, on ne trouve que 10 % de séquences identiques à celle de la pleckstrine dans la phospholipase C $\delta$ 1 [5], 20 % à 25 % dans

### ADRESSE

P. Boivin : professeur émérite. M.C. Lecomte : chargée de recherche à l'Inserm. Inserm U. 409, Faculté de médecine Xavier-Bichat, 16, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France.

## RÉFÉRENCES

1. Tyers M, Haslam RJ, Rachubinski RA, Harley CB. Molecular analysis of pleckstrin: the major protein kinase C substrate of platelets. *J Cell Biochem* 1989; 40: 133-45.
  2. Haslam RJ, Kolde HB, Hemmings GA. Pleckstrin domain homology. *Nature* 1993; 363: 309-10.
  3. Mayer BJ, Ren R, Clark KL, Baltimore D. A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 1993; 73: 629-30.
  4. Saraste M, Hyvonen M. Pleckstrin homology domain: a fact file. *Curr Op Struct Biol* 1995; 5: 403-8.
  5. Ferguson KM, Lemmon MA, Sigler PB, Schlessinger J. Scratching the surface with the PH domain. *Struct Biol* 1995; 2: 715-8.
  6. Parker PJ, Hemmings BA, Gierschik P. The PH domains and phospholipases: a meaningful relation ship? *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 54-5.
  7. Fukami K, Sawadan, Endo T, Takenawa T. Identification of a phosphatidylinositol 4-5-Bis phosphate-binding site in chicken skeletal muscle  $\alpha$  actinin. *J Biol Chem* 1996; 271: 2646-50.
  8. Yang B, Ibraghimov-Beskrovaia O, Moorman CR, Slaughter CA, Campbel KP. Heterogeneity of the 59-kDa dystrophin-associated proteins revealed by a cDNA cloning and expression. *J Biol Chem* 1994; 269: 6040-4.
  9. Cerione RA, Zheng YI. The Dbl family of oncogenes. *Curr Op Cell Biol* 1996; 8: 216-22.
  10. Abrams CS, Zhaou W, Belmonte E, Brass LF. Protein kinase C regulates pleckstrin by phosphorylation of sites adjacent to the N-terminal pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 1995; 270: 23317-21.
- la dynamine [5] ou la spectrine [4], ce qui rend difficile l'identification certaine des domaines PH. Seul paraît constant dans tous les domaines PH, un tryptophane qui occupe toujours la même position-clé définie par la structure tridimensionnelle des domaines PH. Une liste de protéines portant des domaines PH établie en 1995 [4] rassemble 71 protéines, humaines, animales ou de levures; d'autres éléments y ont été plus récemment ajoutés. Parmi ces protéines on trouve: (1) des sérine thréonine kinases telles que  $\beta$ ARK (kinase du récepteur  $\beta$  adrénergique), Akt (sérine thréonine kinase homologue de la protéine kinase C des lymphocytes (*m/s n° 4, vol. 13, p. 608*)), Rac (protéine kinase homologue des protéine kinases A et C), des isozymes de la protéine-kinase C, quelques tyrosine kinases, dont Btk (*Bruton tyrosine kinase*) impliquée dans les déficits en gammaglobulines liés au sexe, et les autres membres de la famille Tec, dont TSK, des cellules lymphoïdes T; (2) les phospholipases PLC $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\delta$ 1 et  $\delta$ 4 [6]; (3) des protéines de membranes plasmiques ou d'organites intracellulaires: la  $\beta$ 2 spectrine ou fodrine, l'isozyme  $\beta$ IS2 de la spectrine érythroïde retrouvée dans le muscle, la dynamine (une GTPase liée aux microtubules), l' $\alpha$  actinine musculaire [7], les syntrophines (protéines associées à la dystrophine musculaire) [8]; (4) un grand nombre de protéines impliquées dans les phénomènes de transmission du signal cellulaire: Ras-GAP (*Ras-guanine activating protein*), Ras-GRF (*Ras-guanine releasing factor*), GEF (*guanine exchange factor*), d'autres facteurs d'échange des nucléotides: Dbl (*Rho-guanine nucleotide exchange factor*) voisin de Cdc24 et Cdc25, Bcl2, Vav (médiateur d'interaction avec les tyrosine kinases spécifiques des lignées hématopoïétiques), Sos (*son of sevenless*) un facteur de transfert de guanine nucléotides pour Ras et son homologue humain,  $\beta$ BP2 (une *SH3 binding protein*), Grb7 (protéine liant des récepteurs de facteurs de croissance), IRS1 (substrat du récepteur I de l'insuline), des protéines de la famille WD (porteuse de la séquence tryptophane-acide aspartique répétée), etc. La plupart de ces protéines ne possèdent qu'un seul domaine PH. Quelques-unes en ont deux, comme la pleckstrine elle-même, Ras-GRF, les syntrophines, les phospholipases PLC $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2. Les domaines PH occupent des positions variables, spécifiques de chaque protéine. Certains domaines, tels ceux de Ras-GAP ou Sos sont analogues au domaine PH situé du côté carboxy-terminal de la pleckstrine; d'autres ont plus d'analogie avec la région amino-terminale, ceux de la spectrine et de la dynamine par exemple. Beaucoup de protéines porteuses de domaine PH possèdent, en outre, d'autres domaines analogues (figure 1). La plus fréquente de ces analogies associées est celle du domaine Dbl, analogue du Cdc24 (*cell division cycle protein 24*) de *Saccharomyces cerevisiae*, agissant comme un facteur d'échange de nucléotides avec une petite *GTP-binding protein* de la famille Rho. Une telle association de domaines homologues se rencontre essentiellement dans les protéines impliquées dans la transmission du signal; elle est particulière par la juxtaposition des domaines Dbl et PH alors que les autres types de domaines homologues n'ont pas de position privilégiée par rapport au domaine PH [9]. D'autres associations d'homologies peuvent être présentes [4] mais les interactions fonctionnelles possibles entre ces domaines homologues sont encore inconnues. Dans les protéines douées d'activité enzymatique, le domaine PH est généralement indépendant du site enzymatique. Dans les protéines phosphorylées, les sites de phosphorylation sont en dehors des domaines PH même s'ils en sont proches, comme dans la pleckstrine [10].

## Structure des domaines PH

Malgré de notables différences dans les structures primaires, les domaines PH possèdent des structures tridimensionnelles fortement analogues. Ces structures ont été établies par RMN et/ou cristallographie pour les domaines PH de la pleckstrine (domaine du côté amino-terminal) [11], de la spectrine [5, 11, 12], de la dynamine [13-15], de la phospholipase PLC $\delta$ 1 [16] et de la tyrosine

## RÉFÉRENCES

11. Yoon HS, Hajduk PJ, Petros AM, Olesniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. Solution structure of a pleckstrin homology domain. *Nature* 1994; 369: 672-5.
12. Macias MJ, Musacchio A, Ponnstigl H, Nilges M, Saraste M, Oschkina TH. Structure of the pleckstrin homology domain from  $\beta$  spectrin. *Nature* 1994; 369: 675-7.
13. Downing K, Priscoll PC, Gout I, Salim K, Sverilbil MJ, Waterfield MD. Three dimensional structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. *Curr Biol* 1994; 4: 884-91.
14. Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell* 1994; 79: 199-210.
15. Fuschman D, Cahill S, Lemmon MA, Schlessinger J, Cowburn D. Solution structure of pleckstrin homology domain of dynamin by heteronuclear NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 816-20.
16. Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB. Structure of the high affinity complex of inositol triphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 1995; 83: 1037-45.
17. Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol 4-5 biphosphate. *Nature* 1994; 371: 168-70.
18. Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trub T, Nolte RT, Shoelson SE. Structure of the IRS1-PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* 1996; 85: 695-705.
19. Cifuentes ME, Honkanen L, Rebecchi MJ. Proteolytic fragments of phosphoinositide-specific phospholipase C $\delta$ 1. Catalytic and membrane binding properties. *J Biol Chem* 1993; 268: 11586-93.
20. Cifuentes ME, Delaney T, Rebecchi M. D-myo-inositol 1,4,5 triphosphate inhibits binding of phospholipase C $\delta$ 1 to bilayer membranes. *J Biol Chem* 1994; 269: 1945-8.

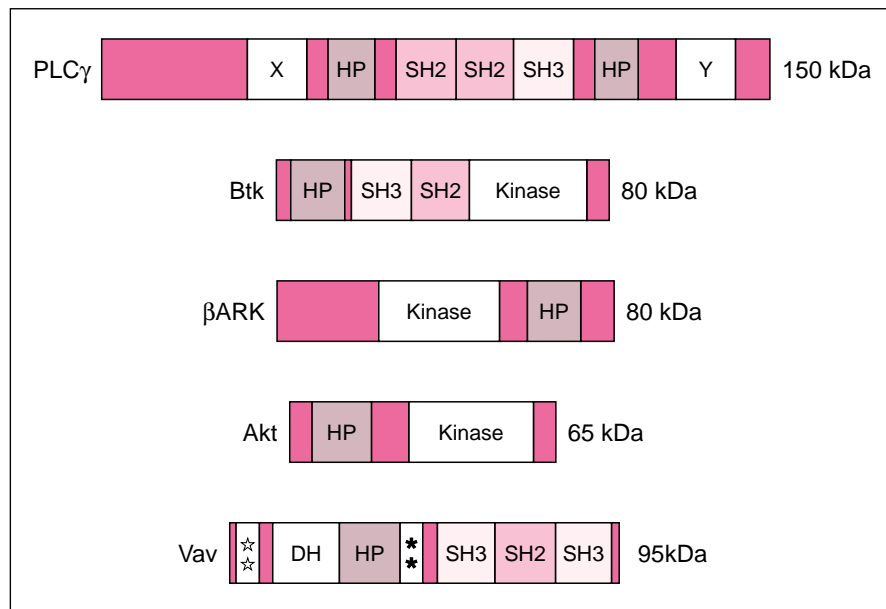


Figure 1. **Représentation schématique de quelques protéines porteuses du domaine HP.** Dans la PLC $\gamma$ , le domaine PH est divisé en deux parties par l'association de deux domaines SH2 et d'un domaine SH3, X et Y sont des régions nécessaires à l'activité enzymatique. Dans les trois protéines kinases Btk,  $\beta$ ARK et AKT les domaines PH sont distants des régions d'activité enzymatique et en situation différente selon la protéine. Dans Vav, le domaine PH est contigu au domaine Dbl homologue (DH) comme cela est le cas dans la plupart des protéines intervenant dans la transmission du signal et, en particulier, dans celles échangeuses de nucléotides. Vav comporte en outre un segment HLH (helix-loop-helix) ☆ ☆ et un segment DAG\*\* (glycérol fixant le zinc).

kinase de Bruton (Btk). Dans le modèle de la pleckstrine, la structure secondaire se compose de sept segments en plis  $\beta$  antiparallèles et d'une hélice  $\alpha$  du côté carboxy-terminal. Dans la structure tridimensionnelle, les sept segments  $\beta$  sont séparés par des boucles et l'ensemble est replié sur lui-même en deux feuillets sensiblement orthogonaux formant un « sandwich » fermé par l'hélice  $\alpha$ . De courtes boucles de séquence similaire connectent les brins  $\beta$ 2 à  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 à  $\beta$ 5 et  $\beta$ 7 à l'hélice portant le côté carboxy-terminal. Les autres boucles ont des séquences et des structures variables. Le tryptophane, constant dans les différents domaines PH, est situé au début ou au milieu de l'hélice  $\alpha$  et joue un rôle essentiel dans la liaison entre les feuillets  $\beta$  et cette hélice (figure 2).

La même forme générale est conservée dans les domaines PH de la spectrine, de la dynamine et de la phospholipase C $\delta$ 1 avec des variations dues à la présence d'insertions, localisées principalement sur les boucles

qui ont la plus grande variabilité de séquence [5]. De telles insertions figurent notamment dans les domaines PH de la spectrine, de l'IRS 1, de la tyrosine kinase de Bruton. Dans la phospholipase C $\gamma$ , une longue insertion formée de trois domaines SH2 et SH3 partage le domaine PH en deux parties.

Les domaines PH ont une charge électrique localisée à une région de potentiel positif de la surface de la molécule du côté opposé à l'hélice  $\alpha$  carboxy-terminale et qui inclut la surface des boucles ayant les séquences les plus variables [12, 16]. Ce potentiel positif est dû à la présence de lysines et d'arginines, conservées dans les divers domaines PH et situées dans les boucles  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 et  $\beta$ 5/ $\beta$ 6 pour le domaine PH de la spectrine [16],  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 et  $\beta$ 3/ $\beta$ 4 pour celui de la pleckstrine,  $\beta$ 1/ $\beta$ 2,  $\beta$ 3/ $\beta$ 4 et  $\beta$ 6/ $\beta$ 7 pour la dynamine.

La présence de ces régions positivement chargées suggère la possibilité de liaisons avec des domaines chargés négativement leur faisant face,

## RÉFÉRENCES

21. Lemmon MA, Ferguson KM, O'Brien R, Sigler PB, Schlessinger J. Specific and high affinity binding of inositol phosphates to an insolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10472-6.

22. Hirata M, Kanematsu T, Sakuma K, Koga T, Watanabe Y, Osaki S, Yagisawa H. D-myo-inositol 1,4,5 trisphosphate binding domain of phospholipase C- $\delta$ 1. *Biochim Biophys Res Commun* 1994; 205: 1563-71.

23. Yagisawa H, Hirata M, Kanematsu T, Watanabe Y, Ozaki S, Sakuma K, Tanaka H, Yabuta N, Kamato H, Hirata H, Nosima H. Expression and characterization of an inositol 1, 4-5 triphosphate binding domain of phosphatidylinositol specific phospholipase C $\delta$ 1. *J Biol Chem* 1994; 269: 20179-88.

24. Hyvonen M, Macias MJ, Nilges M, Oschnat H, Saraste M, Wilmanns M. Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J* 1995; 14: 4676-85.

25. Voliovitich H, Schindler DG, Hadari YR, Taylor SI, Accili D, Zick Y. Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 *in vivo* depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J Biol Chem* 1995; 270: 18083-7.

26. Myers MG, Grammer TC, Brooks J, Glaesheim EM, Wang LM, Scin XJ, Blenis J, Pierce JH, White MF. The pleckstrin homology domain in insulin receptor substrat 1 sensitizes insulin signaling. *J Biol Chem* 1995; 270: 11715-8.

27. Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Role of  $\beta$  subunits of G proteins in targeting the  $\beta$  adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 1992; 257: 1264-7.

28. Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. The binding site of the  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G-proteins on the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 1993; 268: 8256-60.

29. Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Schaw G, Lefkowitz RJ. Binding of G protein  $\beta\gamma$  subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 1994; 269: 10217-20.

30. Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G $\beta\gamma$  activation of p21Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12706-10.

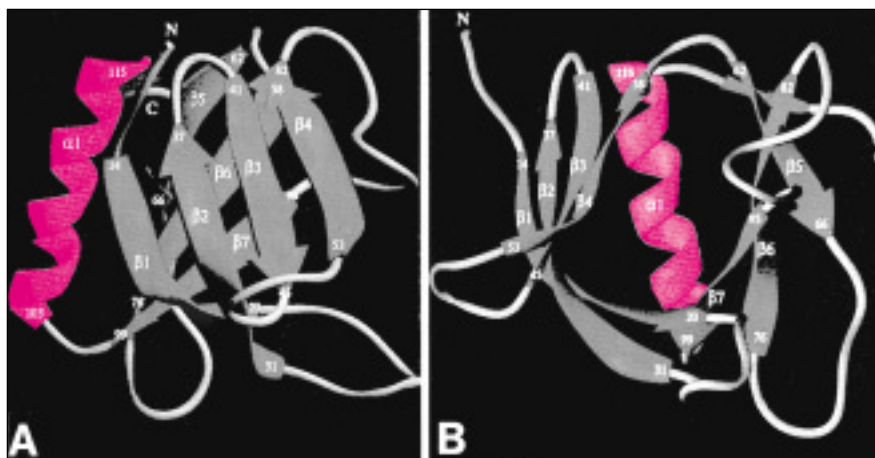


Figure 2. **Structure tridimensionnelle du domaine HP de la dynamine schématisée en rubans et boucles.** A. Vue perpendiculaire au plan des deux feuillets  $\beta$ . B. Vue entre les feuillets  $\beta$  après rotation de la molécule de  $90^\circ$  autour d'un axe vertical par rapport à la partie A [14]. Selon la structure secondaire le « ruban »  $\beta 1$  va des résidus AA 14 à 20,  $\beta 2$  de 31 à 37,  $\beta 3$  de 41 à 45,  $\beta 4$  de 53 à 58,  $\beta 5$  de 62 à 66,  $\beta 6$  de 76 à 82,  $\beta 7$  de 95 à 99, l'hélice  $\alpha$  de 103 à 115. Le tryptophane invariable est ici en position 108 au milieu de l'hélice  $\alpha$ . À quelques différences près, la même structure est retrouvée dans tous les domaines PH étudiés jusqu'ici à présent.

tels ceux des lipides membranaires. Beaucoup de domaines PH fixent effectivement des lipides porteurs de charges négatives et l'importance des lysines est confirmée par le fait que leur acétylation abolit la fixation aux phospholipides [17].

La connaissance de la structure tridimensionnelle des domaines PH a fait rechercher la possibilité d'analogies structurales avec d'autres protéines. Des ressemblances lointaines ont été décelées avec les lipocalines, en particulier, le *retinal-binding protein* (RBP), des protéines fixant les acides gras, la streptavidine et la protéine fixant le FK 506 un immunodépresseur (FK BP pour *FK 506 binding protein*). En revanche, une analogie de structure frappante existe avec un domaine fixant les phosphotyrosines (*PTB domain*) présent dans IRS 1 [18]. Ce domaine est formé de sept segments  $\beta$  coiffés par une hélice  $\alpha$  exactement comme les domaines PH. Il partage avec les domaines PH une même structure générale, mais il n'a pas d'analogie de séquence avec eux, ne possède pas le tryptophane constant des domaines PH, n'a pas de polarisation électrostatique, ne se fixe pas aux inositol phosphates mais à une séquence protéique spécifique NPXY(p) (asparagine, proline, X et

phosphotyrosine); l'analogie structurale des domaines PTB et PH peut évoquer une communauté d'évolution à partir d'une origine commune. Surtout, une telle similitude montre la primauté de la structure sur la séquence et conduit à définir les domaines PH non par une analogie de séquence, qui peut être des plus limitées, mais uniquement par un modèle commun de structure tridimensionnelle. Les différences de séquence auront pour conséquence une multiplicité de ligands possibles. Le domaine PTB peut dès lors être considéré comme un variant, membre de la famille des domaines PH possédant un ligand spécifique.

### Interaction des domaines PH avec les inositol phosphates

Confirmant des résultats antérieurs, la notion de domaine PH n'étant pas encore établie, Cifuentes *et al.* [19] montraient que le domaine aminoterminal de la phospholipase C $\delta$ 1 se fixait au phosphatidylinositol diphosphate (PtdIns(4,5)P $_2$ ). Comme les autres phospholipases, la phospholipase C $\delta$ 1 est une enzyme cytosolique qui doit être liée à la membrane pour que l'activité catalytique se réa-

lise. En liant l'enzyme à la membrane, le domaine amino-terminal de PLC $\delta$ 1, ultérieurement identifié à un domaine PH, permet l'hydrolyse enzymatique du substrat. Le D-myoinositol 1,4,5 trisphosphate inhibe la fixation de PLC $\delta$ 1, ce qui, joint à la liaison au PtdIns(4,5)P $_2$ , conduit à envisager que la fixation de PLC $\delta$ 1 et son activité enzymatique nécessitent la reconnaissance spécifique de phosphates en position 4 et 5 du cycle de l'inositol [20].

Ces données, obtenues à partir de la PLC $\delta$ 1, ont été confirmées par la fixation d'un domaine PH isolé de la pleckstrine à des vésicules lipidiques chargées en PtdIns(4,5)P $_2$  et étendues à d'autres protéines portant un domaine PH: la spectrine, les deux domaines PH de la pleckstrine, la dynamine,  $\beta$ ARK, Ras-GAP, Btk, Tsk, Sos, etc.

Il reste deux questions à poser avant de proposer une généralisation fonctionnelle de la fixation des domaines PH aux inositol-phosphates: la spécificité et l'affinité de ces liaisons. Sur ces deux points on considère, d'une part, la phospholipase C $\delta$ 1 et, d'autre part, les autres protéines possédant un domaine PH. L'affinité de la PLC $\delta$ 1 (et/ou celle de son domaine PH isolé) pour le PtdIns(4,5)P $_2$  est de l'ordre de 1 à 2  $\mu$ M [21]; l'inositol triphosphate Ins(1,4,5)P $_3$  se fixe au domaine PH de PLC $\delta$ 1 avec une constante de dissociation de l'ordre de 0,15  $\mu$ M [22]. Cette fixation inhibe celle du PtdIns(4,5)P $_2$  et l'activité enzymatique [22]. Parmi les autres inositol phosphates, le 1-( $\alpha$ -glycérophosphoryl) inositol 4,5-biphosphate est le seul composé qui se fixe au domaine PH de PLC $\delta$ 1 avec une affinité voisine de celle de l'Ins(1,4,5)P $_3$ .

La liaison du domaine PH de la PLC $\delta$ 1 aux inositol phosphates assure le fonctionnement de l'enzyme: grâce à son domaine PH, la PLC $\delta$ 1 se lie à la membrane directement par l'intermédiaire de son substrat le PtdIns(4,5)P $_2$ , liaison qui permet l'activité catalytique et l'hydrolyse du substrat. Celle-ci libère l'Ins(1,4,5)P $_3$  dont l'affinité pour le domaine PH est très grande et qui, lorsqu'il atteint une certaine concentration déplace le PtdIns(4,5)P $_2$  par compétition et inhibe l'activité enzymatique. Ainsi, le domaine PH de PLC $\delta$ 1 est directe-

ment impliqué dans la régulation de l'activité enzymatique.

Les autres protéines possédant un domaine PH se lient aux phospholipases membranaires avec une spécificité et une affinité très inférieures à celles de la PLC $\delta$ 1. La spectrine se fixe à des vésicules lipidiques chargées en PtdIns(4,5)P $_2$  avec une constante de dissociation d'environ 30  $\mu$ M [17] mais se lie aussi à des vésicules chargées en PtdIns(4)P, en PtdIns(3)P, en phosphatidyl sérine ou en acide phosphatidique avec une affinité très faible. L'inositol triphosphate Ins(1,4,5)P $_3$ , qui inhibe la fixation des domaines PH lorsqu'il est ajouté aux vésicules en excès molaire, se fixe au domaine PH de la spectrine avec une constante de dissociation d'environ 40  $\mu$ M. Le domaine PH de la pleckstrine a des affinités 10 à 20 fois plus faibles pour le PtdIns(4,5)P $_2$  et 200 fois plus faibles pour l'Ins(1,4,5)P $_3$  que les affinités respectives du domaine PH de la PLC $\delta$ 1 [16], le domaine PH de la dynamine ne se liant pas aux vésicules chargées de PtdIns(4,5)P $_2$ . Cela montre que la fixation des domaines PH aux inositol phosphates n'est pas identique pour toutes les protéines porteuses d'un tel domaine.

Les sites de liaison des domaines PH aux inositol phosphates ont été déterminés pour quelques protéines: La région du domaine PH de la PLC $\delta$ 1 qui se lie aux inositol phosphates a été précisée sur la structure tridimensionnelle. Les acides aminés qui réagissent avec l'Ins(1,4,5)P $_3$  sont localisés dans les bandes  $\beta$ 1 $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 $\beta$ 4. Les deux lysines K30 et K57 fixent les phosphates en position 4 et 5 de l'inositol. Des interactions complémentaires se font avec les chaînes latérales de R40, S55, R56 et un pont hydrogène en E54 et entre le phosphate en position 1 et la chaîne latérale de W36 [16, 23].

Pour le domaine PH de la spectrine, les acides aminés intervenant dans la liaison avec les inositol phosphates sont principalement K8, R21, S22, W23 et K71 (figures 3 et 4); la substitution de K8 et R21 par des glutamines abolit la fixation, celle de K71 la diminue sans l'abolir [24]. Les sites de liaison aux inositol phosphates des domaines PH de la spectrine et de la dynamine correspondent approximativement au site défini pour PLC $\delta$ 1,



Figure 3. **Structure tridimensionnelle en rubans et boucles du domaine PH de la BII spectrine avec les principaux AA impliqués dans la liaison avec l'Ins(1,4,5)P $_3$ : K8, R21, R22, W23, K71 [24].**

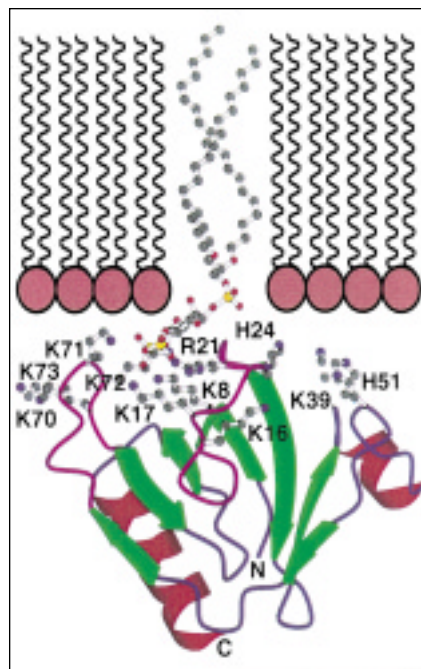


Figure 4. **Représentation schématique du complexe formé par le domaine PH de la spectrine et le PtdIns(4,5)P $_2$  [24].**

au milieu de la zone électriquement polarisée se situant principalement dans les boucles  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 et  $\beta$ 3/ $\beta$ 4 [11]. Quels qu'en soient les sites de liaison, la fixation des domaines PH aux inositol phosphates n'a pas, pour la plupart des protéines, un rôle physiologique démontré semblable à celui de la PLC $\delta$ 1. Pour la plupart de ces protéines les affinités et les spécifici-

## RÉFÉRENCES

31. Clapham DE, Neer EJ. New roles of G-protein  $\beta\gamma$  dimers in transmembrane signaling. *Nature* 1993; 365: 403-6.
32. Inglese J, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ.  $G\beta\gamma$  interactions with PH domains and RAS-MAPK signaling pathways. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 151-5.
33. Ingley E, Hemmings BA. Pleckstrin homology (PH) domain in signal transduction. *J Cell Biochem* 1994; 56: 436-43.
34. Crespo P, Xu N, Simmonds WF, Gutkind JS. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 1994; 369: 418-20.
35. Mc Collam L, Bonfini L, Karlovich CA, Conway BR, Kozma LM, Banerjee U, Czech MD. Functional roles of the pleckstrin and Dbl homology regions in the Ras exchange factor Son of Sevenless. *J Biol Chem* 1995; 270: 15954-7.
36. Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the  $\beta$  adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with  $G\beta\gamma$  subunits and lipid. *J Biol Chem* 1995; 270: 11707-10.
37. Hawes BE, Touhara K, Kurose H, Lefkowitz RJ, Inglese J. Determination of the  $G\beta\gamma$  binding domain of phosphoinositide 3-kinase. A regulatable modulator of  $G\beta\gamma$  signaling. *J Biol Chem* 1994; 269: 29825-30.
38. Rawlings DJ, Saffran DC, Tsukada S, Larges-Pada DA, Grimaldi JC, Cohen L, Mohr RN, Bazan JP, Howard M, Copeland NG, Jenkins NA, Witte ON. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient Xid mice. *Science* 1993; 261: 358-61.
39. De Weers M, Mensing BGJ, Kraakman MEM, Schuurman RKB, Hendriks RW. Mutation analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene in X linked agammaglobulinemia: identification of a mutation which affects the same codon as is altered in immunodeficient Xid mice. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 161-6.
40. Vihinen M, Zvelbil MJM, Zhu Q, Brooimans RA, Ochs HD, Zegers BJM, Nilsson L, Waterfield MD, Smith CIE. Structural basis for pleckstrin homology domain mutations in X-linked agammaglobulinemia. *Biochemistry* 1995; 34: 1475-81.
41. Li T, Tsukada S, Satterthwaite A, Havlick MH, Park H, Takatsu K, Witte ON. Activation of Bruton's tyrosine kinase by a point mutation in its pleckstrin homology domain. *Immunity* 1995; 2: 451-60.
- tés de liaison ne sont pas connues et demeurent faibles lorsqu'elles ont été étudiées.
- L'exemple de la spectrine est particulièrement démonstratif: son domaine PH peut se lier aux inositol phosphates mais sans spécificité rigoureuse et surtout avec une affinité faible par rapport à celle de la liaison spectrine-ankyrine qui est la principale modalité d'ancrage de la spectrine à la membrane plasmique. Il est probable que l'interaction directe de la spectrine avec les inositol phosphates constitue un complément de l'interaction indirecte spectrine-ankyrine-bande 3. Des ligands spécifiques, autres que les inositol phosphates, peuvent interagir avec les domaines PH de diverses protéines, que ces ligands soient de nature lipidique ou protéique.
- L'exemple en est donné par la protéine substrat du récepteur I de l'insuline (IRS1) [25]. Lorsque le récepteur est stimulé, le substrat du récepteur est phosphorylé sur résidu tyrosine par l'activité tyrosine kinase du récepteur: l'IRS1 fixe alors plusieurs protéines de transmission du signal par leur domaine SH2, ce qui entraîne la cascade des signaux en aval [26].
- Le domaine PH n'est pas le seul site d'interaction entre le récepteur et son substrat: au moins deux régions de l'IRS1 sont impliquées dans cette interaction, le domaine PH à l'extrémité amino-terminale et le domaine PTB à l'extrémité carboxy-terminale [18]. Ces deux domaines sont conjointement nécessaires: le domaine PH seul n'est pas directement impliqué dans l'engagement de la transmission du signal en aval et ne semble pas être le site d'interaction principal. Si l'on considère le domaine PTB comme une variante des domaines PH, IRS1 posséderait deux domaines PH de structure identique mais différents dans leurs séquences et leurs ligands.

### Interactions des domaines PH avec les protéines G trimériques

Les protéines G sont liées à la membrane par des liaisons myristoyl ou palmitoyl pour les  $G\alpha$  et isoprénoides pour le complexe  $\beta\gamma$ . Celui-ci

comprend une sous-unité  $\beta$  de 35 kDa faisant partie de la famille des protéines portant un motif WD répétitif et une sous-unité  $\gamma$  de 8 kDa liée à la membrane par un isoprénolide géranyl-géranyl. Les protéines G sont étroitement liées à de nombreux récepteurs membranaires. Ces liaisons activent les protéines G lorsque le récepteur reçoit son ligand et dissocie le complexe trimérique en  $G\alpha$  et  $G\beta$ . Les récepteurs sont soumis à l'action spécifique de sérine thréonine kinases qui, lorsqu'elles sont cytosoliques, doivent être transportées et liées à la membrane, directement ou indirectement, pour atteindre les substrats-récepteurs et les phosphoryler. Après phosphorylation des récepteurs, les protéines arrestines se lient aux récepteurs phosphorylés, bloquent l'activation des protéines G, ce qui provoque la désensibilisation du récepteur. Le nombre des kinases des récepteurs liés aux protéines G (GRKS pour *G-protein coupled receptor kinase*) est encore limité, les mieux connues étant la rhodopsine kinase et la  $\beta$ ARK kinase du récepteur  $\beta$  adrénergique.

La protéine  $\beta$ ARK est recrutée du cytosol par fixation au complexe  $\beta\gamma$  [27, 28], via la sous-unité  $\gamma$  qui se lie à un domaine de 125 acides aminés proches du domaine carboxy-terminal de  $\beta$ ARK. La délétion expérimentale de ce domaine annule la fixation et inhibe l'activité enzymatique; le remplacement du domaine carboxy-terminal délété par un signal  $\gamma$  d'isoprénylation dirigeant une géranyl-géranylrestaura l'activité enzymatique en permettant la fixation de  $\beta$ ARK à la membrane. Le domaine de 125 acides aminés a été ultérieurement identifié à un domaine PH [29]; un peptide synthétique de 28 résidus correspondant à la séquence entre Trp<sup>643</sup> et Ser<sup>670</sup> du domaine PH inhibe l'activation de  $\beta$ ARK.

La liaison  $\beta$ ARK- $G\gamma$  étant démontrée,  $\beta$ ARK, son domaine PH et des peptides dérivés sont capables, d'une part, d'inhiber par compétition la fixation à  $G\gamma$  des domaines PH d'autres protéines et, d'autre part, d'être utilisé comme témoin dans des expériences visant à rechercher les liaisons de  $G\gamma$  à d'autres protéines portant un domaine PH. A partir de

protéines de fusion de domaines PH avec la glutathion-S-transférase mises au contact d'un complexe  $\beta\gamma$ , il a été montré que les régions carboxy-terminales des domaines PH de Ras-GRF, PLC $\gamma$ , Ras-GAP, Atk (ou Btk), Rac,  $\beta$ -spectrine, OSBP, IRS, se liaient à  $\beta\gamma$  avec des affinités différentes, surtout fortes pour PLC $\gamma$ , Akt et OSBP [29]. Il en est probablement de même pour la PLC $\beta$ 2 qui se lie aux protéines G.

Des liaisons à  $\gamma$  intéressent donc aussi des éléments de transmission du signal [31-34], mais les liaisons fonctionnelles entre les éléments de transmission du signal qui portent un domaine PH sont peu connues, et le rôle des domaines PH reste à déterminer. Certaines de ces protéines semblent être des cibles pour des kinases, elles-mêmes activées par fixation d'un ligand à son récepteur. Par ailleurs, le complexe formé par les domaines homologues respectifs de Dbl et de PH semble intervenir indirectement dans les relations Sos-Ras, en positionnant Sos à proximité de Ras alors que ni Dbl ni PH ne sont directement impliqués dans la liaison Sos-Ras [35].

Tous les domaines PH ne se fixent pas au complexe  $\beta\gamma$  et cette liaison n'exclut pas celle aux inositol phosphates, les premières liant le domaine carboxy-terminal de PH, les secondes utilisant l'extrémité aminoterminal. La double fixation de  $\beta$ ARK, à la fois au complexe  $\beta\gamma$  et au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, a une action synergique sur la phosphorylation du récepteur adrénergique [36]. Il peut en être de même pour d'autres domaines PH [37].

Le siège et la nature des liaisons entre les domaines PH et les inositol phosphates sont connus, mais il n'en est pas de même pour ceux impliquant les complexes  $\beta\gamma$  qui n'ont pas été localisés sur la structure tridimensionnelle des domaines PH. Diverses hypothèses ont été proposées et discutées mais d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer le rôle exact et les modalités des liaisons avec  $\beta\gamma$ .

### **Agammaglobulinémie liée au chromosome X et domaine PH**

L'agammaglobulinémie liée au sexe ou maladie de Bruton est due à

l'absence de développement de la lignée des cellules lymphoïdes B dans la moelle. Le gène responsable est situé sur le bras long du chromosome X humain en Xq22. Le produit de ce gène est une tyrosine kinase appartenant à une sous-famille de Src et nommée Atk (*agammaglobulinemia tyrosine kinase*), BPK (*B cell precursor kinase*) ou Btk (*Bruton tyrosine kinase*). Btk est une protéine cytosolique qui possède des domaines TH (*Tec homology*), SH2 et SH3 et un domaine PH dans la région amino-terminale en amont du SH3, à l'opposé du domaine catalytique (*figure 1*).

Le déficit en Btk est responsable de l'agammaglobulinémie liée au sexe chez l'homme et de l'immunodéficience liée à l'X chez la souris (Xid). De nombreuses mutations différentes ont été décrites, localisées, soit dans le domaine kinasique, soit dans les domaines SH2 et SH3. Une mutation ponctuelle R28C (arginine remplacée par une cystéine) dans le domaine PH a été décrite comme responsable de l'immunodéficience de la souris Xid [38] et une mutation analogue R28H a été rapportée dans l'agammaglobulinémie liée au sexe chez l'homme [39]. Ultérieurement, d'autres mutations ont été décrites : F25S, V113D, T33P et V64F. Quatre des dix mutations identifiées portent sur R28 au milieu d'un groupement de six lysines du domaine PH, correspondant, dans la structure tridimensionnelle, aux régions analogues des autres domaines PH chargées positivement ; d'autres mutations sont localisées ailleurs, probablement dans des zones hydrophobes (F25S, V113D, V64F).

Les mutations du domaine PH de Btk sont à ce jour les seules mutations connues des domaines PH ayant pour conséquence une maladie humaine. Le mécanisme par lequel telle ou telle de ces mutations aboutit à l'arrêt de production des cellules B n'est pas déterminé [40].

Les ligands du domaine PH de Btk sont incertains. La région carboxy-terminale interagit avec le complexe  $\beta\gamma$  des protéines G ; le tryptophane invariable, qui est ici en position 124, à l'entrée de l'hélice  $\alpha$  terminale, est impliqué dans cette interaction puisque une mutation induite W124G empêche la liaison au complexe  $\beta\gamma$ . Mais le rôle de cette liaison

dans les fonctions de transmission du signal de Btk est inconnu. D'éventuelles interactions avec les inositol phosphates n'ont pas été démontrées.

Une mutation induite dans le domaine PH, G41K produit une forme hyperactive de Btk, hyperphosphorylée sur tyrosine et qui se fixe à la membrane trois à cinq fois plus que l'enzyme normal, ce qui suggère que le fonctionnement de Btk nécessiterait son association à la membrane [41]. Les relations possibles de Btk avec les récepteurs de la membrane lymphocytaire, notamment celui de l'interleukine-5, ont été suggérées mais restent à prouver.

### **Rôle des domaines homologues de la pleckstrine**

Les domaines homologues de la pleckstrine sont connus depuis trois ans environ. Ils existent dans un grand nombre de protéines aux fonctions très différentes et dont le seul point commun est qu'elles sont ou doivent être liées à la membrane cellulaire pour exercer leur fonction. Le rôle commun des domaines PH semble donc d'assurer ces liaisons, soit en association avec d'autres sites d'ancrage comme cela est le cas pour la spectrine, soit en recrutant des protéines cytosoliques qui ne sont actives que liées à la membrane ou rapprochées de leurs ligands, eux-mêmes membranaires, comme cela se produit pour la phospholipase C $\delta$ 1. Deux types de ligands membranaires semblent assurer les liaisons PH-membranes : les inositols polyphosphates d'une part, le complexe  $\beta\gamma$  des protéines G trimériques de l'autre, soit isolément, soit en synergie. Mise à part la phospholipase C $\delta$ 1 dont l'affinité pour les inositols polyphosphates et en particulier pour son substrat, est très importante, la plupart des autres « ancrages » se font avec des affinités et des spécificités faibles (du moins lorsque ces deux éléments ont été étudiés). Des ligands, autres que ceux décrits jusqu'ici, réagissent avec les domaines PH : le domaine PTB en est un exemple.

On ne peut manquer d'être frappé par le nombre de protéines impliquées dans les processus de transmis-

sion du signal qui portent un domaine PH souvent associé aux domaines homologues de Dbl de SH2 et SH3. Ces associations évoquent la possibilité d'une coopération fonctionnelle mais celle-ci suppose préalablement la connaissance des ligands des domaines PH, ce qui n'est encore que partiellement réalisé. Les travaux en cours apporteront la solution de ces problèmes, mais à quelle échéance? ■

#### Remerciements

Les auteurs adressent leurs remerciements à Mesdames Cl. Pichard, N. Lemaire et T. Richard pour la préparation et la dactylographie du présent manuscrit.

#### TIRÉS À PART

P. Boivin.

## Summary

### Protein domains homologous to pleckstrin repeats

Pleckstrin is the major substrate of protein kinase C in platelets. Expression cloning of pleckstrin yielded a cDNA encoding a protein with two internal repeats of about 120 aminoacids located at the N and C terminal extremities of the molecule. Database screening led to discover the presence of domains homologous to the pleckstrin repeats in more than 90 proteins devoid of common physiological function such as serine-threonine or tyrosine protein kinases, phospholipases, membrane and cytoskeletal proteins and many signaling proteins including activators and inhibitors of small G-protein. Some of them, especially the signaling proteins contain other homology domains such as SH2, SH3 and Dbl. All PH domains share a common tridimensional structure characterized by a seven-stranded anti-parallel  $\beta$ -sheet and a strong bend forming an orthogonal sandwich which is closed by a C-terminal  $\alpha$ -helix. The PH structures differ most in the loop regions between  $\beta$  strands where more or less large insertions may be present. All PH domains contain a positively charged region towards the N-terminal of the domain. Most of the PH-containing proteins should be bound or approached to the cell membrane for assuming their function. The PH domains can be bound to the membrane through interaction of the positively charged region with the negatively charged phosphoinositides. Phospholipase C $\delta$  1 (PLC  $\delta$ 1) binds its membrane substrate (PdIns 4,5)P<sub>2</sub> through its PH domain with high specificity. Phosphoinositides are the main ligands of the PH domains. However C-terminal region of some PH domains binds the  $\gamma$  component of the trimeric G proteins. PH Domains could be anchored to the membrane by both phosphoinositols and G $\gamma$  proteins. Very probably other as yet unidentified ligands interact with the PH domains. Several different mutations in the PH domain of the Bruton tyrosine kinase are responsible of some cases of X-linked agammaglobulinemia in man and mice. At the present day they are the sole PH domain mutations associated with diseased state.