

## **PTB, un domaine d'interaction protéine-protéine important dans le « jeu de dominos » de la transmission du signal**

**Jean-Paul Borg  
Emmanuel Fournier  
Ben Margolis  
Daniel Birnbaum**

Les domaines d'interaction protéine-protéine jouent un rôle majeur dans la transmission du signal émanant des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le domaine SH2 a été le premier décrit, et sa spécificité d'association dépend des acides aminés situés juste en aval de la tyrosine phosphorylée lors de l'activation du récepteur. Un deuxième domaine se fixant à une tyrosine phosphorylée a été caractérisé récemment et appelé domaine PTB (*phosphotyrosine binding*) ou PI (*phosphotyrosine interaction*); sa spécificité de liaison est dictée par des résidus situés juste en amont de la tyrosine. Ce domaine, décrit pour la première fois dans les protéines SHC et IRS-1, est aussi impliqué dans la transmission du signal des récepteurs de l'*epidermal growth factor* et de l'insuline. De multiples molécules cytoplasmiques possèdent également ce domaine : en particulier, FE65 et X11 s'associent à la protéine amyloïde  $\beta$ APP par cet intermédiaire; dans ce cas, la phosphorylation de la tyrosine n'est plus nécessaire. Ce type d'interaction pourrait se retrouver dans de nombreuses protéines et intervenir dans leur métabolisme, leur régulation et leur fonction.

### ADRESSES

J.P. Borg : *pharmacien biologiste*. Howard Hughes Medical Institute, Ann Arbor, MI, États-Unis. E. Fournier : *étudiant en thèse*. Inserm U. 119, 27, boulevard Leï-Roure, 13009 Marseille, France. B. Margolis : *professeur de médecine interne et de biochimie, clinical investigator*. Howard Hughes Medical Institute, Ann Arbor, MI, États-Unis. D. Birnbaum : *directeur de recherche à l'Inserm*. Inserm U. 119, 27, boulevard Leï-Roure, 13009 Marseille, France.

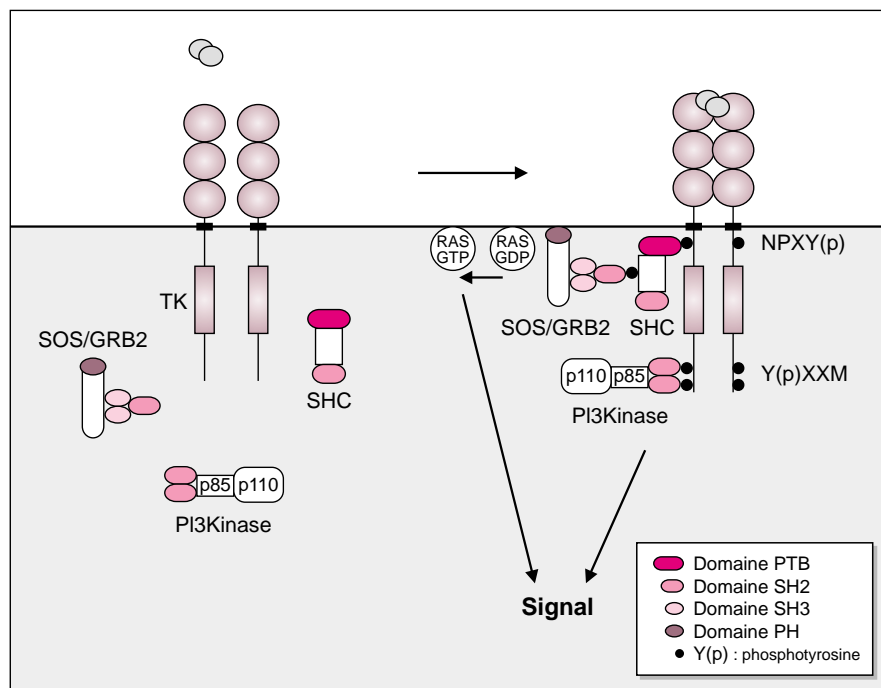
m/s n° 5, vol. 13, mai 97

Les interactions entre protéines conditionnent la transmission d'un signal de la membrane cellulaire vers le noyau pour aboutir à une réponse cellulaire (prolifération ou différenciation cellulaire par exemple). Les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase constituent une famille de protéines dont la cascade de transmission

du signal a été particulièrement bien étudiée durant ces dernières années. Ces récepteurs sont constitués d'une région extracellulaire capable de fixer un ligand, d'une région transmembranaire et d'une région cytoplasmique contenant un domaine catalytique à activité tyrosine kinase (*figure 1*). A la suite de la fixation du ligand, ces récepteurs se dimérisent et se trans-

## RÉFÉRENCES

1. Pawson T. Protein modules and signaling networks. *Nature* 1995; 373: 573-9.
2. Chardin P. Domaines SH2 et SH3: un nouveau paradigme pour la transmission du signal. *Med Sci* 1994; 10: 709-12.
3. Blaikie P, Immanuel D, Wu J, Li N, Yajnik V, Margolis B. A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J Biol Chem* 1994; 269: 32031-4.
4. Kavanaugh WM, Williams LT. An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* 1994; 266: 1862-5.
5. Gustafson T, He W, Craparo A, Schaub C, O'Neill T. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor *via* a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2500-8.
6. Batzer AG, Blaikie P, Nelson K, Schlessinger J, Margolis B. The phosphotyrosine interaction domain of Shc binds an LXXNPXY motif on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4403-9.
7. Dikic I, Batzer AG, Blaikie P, Obermeier A, Ullrich A, Schlessinger J, Margolis B. Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain. *J Biol Chem* 1995; 270: 15125-9.
8. Zhou MM, Ravichandran KS, Olejniczak ET, Petros AM, Meadows RP, Sattler M, Harlan JE, Wade WS, Burakoff SJ, Fesik SW. Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* 1995; 378: 584-92.
9. Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Pawson T, Pelicci PG. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 1992; 70: 93-104.
10. Fournier E, Rosnet O, Marchetto S, Turck CW, Rottapel R, Pelicci PG, Birnbaum D, Borg JP. Interaction with the phosphotyrosine binding domain/phosphotyrosine interacting domain of SHC is required for the transforming activity of the FLT4/VEGFR3 receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 12956-63.
11. Tartare-Deckert S, Sawka-Verhelle D, Murdaca J, Van Obberghen E. Evidence for a differential interaction of SHC and IRS-1 with the IGF-IR in the yeast two-hybrid system. *J Biol Chem* 1995; 270: 23456-60.
12. Pratt JC, Weiss M, Sieff CA, Shoelson SE, Burakoff SJ, Ravichandran KS. Evidence for a physical association between the Shc-PTB domain and the bc chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 12137.



**Figure 1. Transmission du signal par les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase.** Les récepteurs à domaine tyrosine kinase sont présents sous forme de monomères à la surface de la cellule. À la suite de la fixation du ligand, les récepteurs s'oligomérisent et sont phosphorylés sur résidus tyrosine par transphosphorylation. Ces résidus peuvent alors être complexés par les domaines PTB ou SH2 de protéines adaptatrices telles que SHC ou p85 PI3 kinase. La protéine SHC est à son tour phosphorylée sur la tyrosine 317, permettant au complexe GRB2/SOS de se fixer et d'activer la voie RAS. TK représente le domaine tyrosine kinase du récepteur. N: Asn; P: Pro; X: acide aminé quelconque; Y: Tyr; M: Met.

phosphorylent sur des résidus tyrosine cytoplasmiques. Les sites phosphorylés représentent des points d'ancrage pour des protéines cytoplasmiques douées d'activité enzymatique (PLC $\gamma$ 1, GAP, phosphatases) ou dénuées de cette activité et appelées alors adaptatrices (SHC, IRS-1, p85, GRB2), c'est-à-dire capables de mettre en contact différentes protéines grâce à leurs multiples domaines d'interaction (*figure 1*) [1]. Ces interactions, réglées par phosphorylation/déphosphorylation, permettent la mise en place d'un réseau d'interactions protéiques indispensables à la transmission du signal. Jusqu'à présent, deux domaines protéiques ont été décrits pour leur capacité de se fixer sur des protéines phosphorylées sur résidu tyrosine : les domaines SH2 et PTB. Les domaines SH2 (*SRC homology 2*) ont été caractérisés à la fin des années 1980 par les groupes de Pawson (Toronto, Ontario, Canada) et

Hanafusa (New York, USA). Ce sont des domaines protéiques, d'environ 100 acides aminés, présents dans de nombreuses protéines cytoplasmiques impliquées dans la transmission du signal relayé par des protéines à activité tyrosine kinase. La fixation d'un domaine SH2 sur une séquence peptidique est conditionnée par la présence d'une tyrosine phosphorylée et la spécificité de l'interaction est dictée par la nature des acides aminés en position carboxy-terminale par rapport à cette tyrosine [2]. Ainsi, le domaine SH2 de la sous-unité p85 de la PI3 kinase se fixe sur un motif Y(p)XXM (où X est un acide aminé quelconque et M une méthionine) (*figure 2*). Les domaines SH2 constituent un élément fondamental du réseau d'interactions protéiques mis en place lors de l'activation des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. Ils permettent la localisation membra-

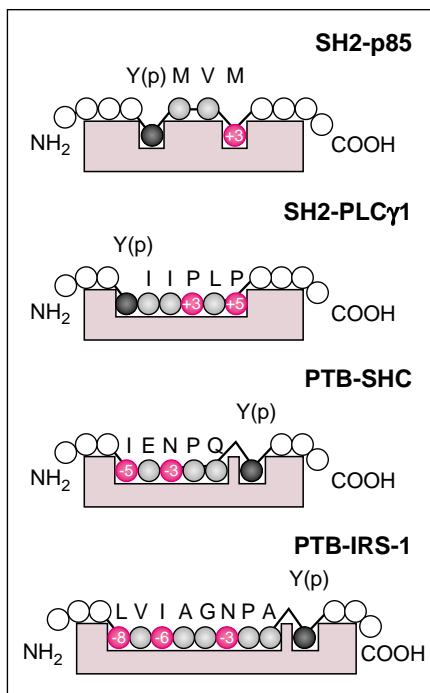


Figure 2. **Spécificité de reconnaissance des domaines SH2 et PTB.** Les domaines SH2 complexent la tyrosine phosphorylée et les acides aminés en position carboxy-terminale par rapport à celle-ci, en particulier en position +3 pour la sous-unité p85 de la PI3 kinase et +3 et +5 pour la PLC $\gamma$ 1. Les domaines PTB reconnaissent les acides aminés en position amino-terminale par rapport à la tyrosine : positions -3 et -5 pour SHC et -8, -6 et -3 pour IRS-1. Code à une lettre des acides aminés : A : Ala ; C : Cys ; D : Asp ; E : Glu ; F : Phe ; G : Gly ; H : His ; I : Ile ; K : Lys ; L : Leu ; M : Met ; N : Asn ; P : Pro ; Q : Gln ; R : Arg ; S : Ser ; T : Thr ; V : Val ; W : Trp ; Y : Tyr.

naire d'activités enzymatiques cytosoliques, le contact entre enzymes et substrats et enfin, la modulation d'activités enzymatiques [1].

### Les domaines PTB de SHC et d'IRS-1

#### Un nouveau domaine d'interaction pour les phosphotyrosines

De taille plus importante que les domaines SH2 (environ 200 acides aminés), les domaines PTB peuvent également former un complexe avec un peptide phosphorylé sur résidu tyrosine. Le domaine PTB de SHC

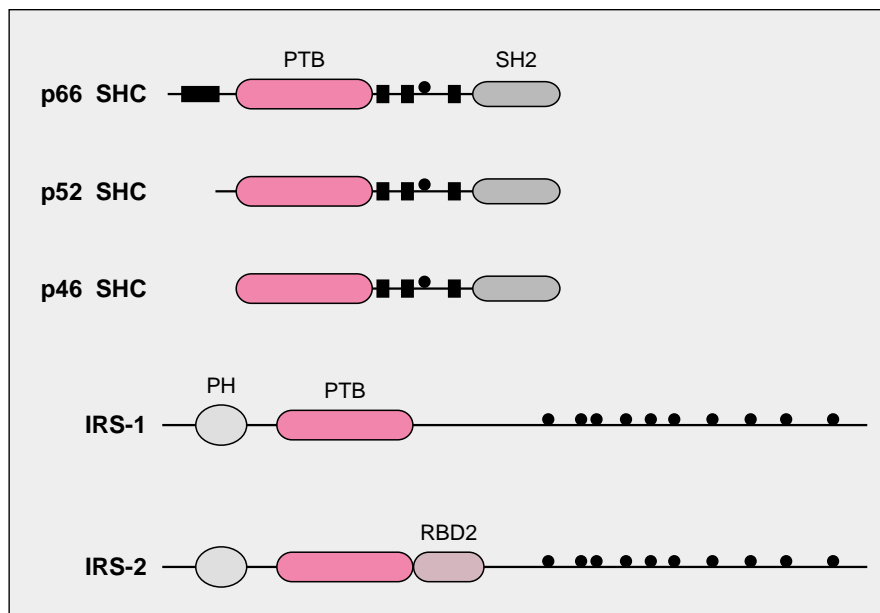


Figure 3. **Structure de SHC et d'IRS-1.** Le gène SHC code pour trois protéines de 66, 52 et 46 kDa (p66, p52 et p46) qui diffèrent uniquement par leur région amino-terminale. La protéine p66 possède une région riche en résidus proline (rectangle noir). Le principal site de phosphorylation (Y317), site de fixation de GRB2, est représenté par un point noir. Les protéines IRS possèdent un domaine PH, un domaine PTB et un second domaine de fixation pour les résidus phosphorylés sur tyrosine (RBD2 ou receptor binding domain 2) seulement présent dans IRS-2. Plus d'une quinzaine de résidus tyrosine peuvent être phosphorylés, permettant ainsi l'ancrage de nombreuses protéines à domaines SH2 (p85, GRB2 et SYP). Les carrés et rectangles noirs représentent des régions riches en résidus proline.

fut le premier mis en évidence [3-8]. La protéine SHC est représentée par trois isoformes, p66, p52 et p46, codées par un gène unique (figure 3) [9]. En 1994, Kavanaugh et Williams (San Francisco, CA, USA) montraient que la partie amino-terminale de SHC pouvait fixer une protéine phosphorylée sur résidu tyrosine malgré l'absence d'un domaine SH2 [4]. Simultanément, une autre équipe confirmait que cette région interagissait avec le récepteur de l'EGF phosphorylé après activation [3]. Depuis, cette interaction a été mise en évidence avec d'autres récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, tels que TRKA (récepteur du *nerve growth factor*), FLT4/VEGFR3 (récepteur du *vascular endothelial growth factor-C*) et IGF1-R (récepteur de l'*insulin growth factor-I*), des récepteurs des cytokines (récepteurs du GM-CSF et de l'IL-2), l'antigène « moyen T » du virus du polyome et la protéine inositolpolyphosphate-5-phosphatase SHIP [7, 10-15]. Plusieurs sigles furent ini-

tialement proposés pour désigner ce nouveau domaine : PTB pour *phosphotyrosine binding* et PI pour *phosphotyrosine interaction* [3, 4]. Parallèlement, grâce à la technique du système à deux hybrides, l'équipe de Gustafson (Baltimore, MD, USA) montrait que la région amino-terminale d'IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*), une autre protéine adaptatrice de la transmission du signal, se fixait sur le récepteur de l'insuline de façon similaire au domaine PTB de SHC et nommaient ce domaine SAIN (pour *SHC and IRS-1 NPXY-binding*) [5]. Le terme de PTB est généralement préféré pour désigner ce domaine.

#### Une spécificité de fixation différente des domaines SH2

A la différence des domaines SH2, le site de fixation des domaines PTB de SHC et IRS-1 comprend une tyrosine phosphorylée, et des acides aminés en position amino-terminale par rapport à celle-ci. Ce motif est représenté par un

## RÉFÉRENCES

13. Ravichandran KS, Igras V, Shoelson SE, Fesik SW, Burakoff SJ. Evidence for a role for the phosphotyrosine-binding domain of Shc in interleukin 2 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5275-80.

14. Trüb T, Choi WE, Wolf G, Ottinger E, Chen Y, Weiss M, Shoelson SE. Specificity of the PTB domain of Shc for  $\beta$  turn-forming pentapeptide motifs amino-terminal to phosphotyrosine. *J Biol Chem* 1995; 270: 18205-8.

15. Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, Krystal G. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetraphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1689-93.

16. He W, O'Neill TJ, Gustafson TA. Distinct modes of interaction of SHC and IRS-1 with the insulin receptor NPEY region via non-SH2 domains. *J Biol Chem* 1995; 270: 23258-62.

17. Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trüb T, Nolte RT, Shoelson SE. Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* 1996; 85: 695-705.

18. Waksman G, Kominos D, Robertson SC, Pant N, Baltimore D, Birge RB, Cowburn D, Hanafusa H, Mayer BJ, Överduin M. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 1992; 358: 646-53.

19. Mayer BJ, Ren R, Clark KL, Baltimore D. A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 1993; 73: 629-30.

20. Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 1994; 371: 168-70.

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

22. 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.

23. Rameh LE, Chen CS, Cantley LC. Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* 1995; 83: 821-30.

24. Fournier E, Dubreuil P, Birnbaum D, Borg JP. Mutation at tyrosine residue 1337 abrogates ligand-dependent transforming capacity of the FLT4 receptor. *Oncogene* 1995; 11: 921-31.

tétrapeptide phosphorylé NPXY(p)\*, adoptant dans l'espace une structure en tour  $\beta$  [6, 7, 16]. La présence de résidus hydrophobes ( $\Psi$ ) en position amino-terminale par rapport à l'asparagine, règle la spécificité de fixation des domaines PTB: ainsi le domaine PTB d'IRS-1 se fixe sur une séquence  $\Psi X \Psi X X N P X Y(p)$  où les résidus -6 et -8, par rapport à la tyrosine phosphorylée, sont cruciaux. Le domaine PTB de SHC, quant à lui, a une préférence pour la séquence  $\Psi X N P X Y(p)$  où le résidu en position -5 est important (figure 2) [8, 16, 17]. Cette différence explique la fixation presque exclusive d'IRS-1 sur les récepteurs de l'insuline, de l'IGF-I et de l'IL-4.

### Une structure similaire aux domaines PH

Les domaines PTB de SHC et d'IRS-1 ne présentent que très peu de similitudes de séquence entre eux, mais ils s'organisent dans l'espace de façon identique en un « sandwich » dont les parois sont formées respectivement de trois ( $\beta 5$  à  $\beta 7$ ) et quatre feuillets  $\beta$  ( $\beta 1$  à  $\beta 4$ ). Une hélice  $\alpha$  ( $\alpha 3$ ) ferme un des côtés de la poche ainsi formée (figure 4). La tyrosine phosphorylée du peptide entre en contact avec le domaine PTB par des ponts hydrogènes, en particulier avec des résidus arginine (R67 et R175 dans le cas de SHC, R212 et R227 dans celui d'IRS-1) et sérine (S151 pour SHC et S228 pour IRS-1) du domaine d'interaction, les autres acides aminés du peptide multipliant les interactions hydrophobes et hydrogènes avec le domaine [8, 17]. De façon identique, l'arginine Arg $\beta 5$  des domaines SH2 joue un rôle central grâce à son interaction avec la tyrosine phosphorylée. Les domaines SH2 ne présentent toutefois aucune similitude de structure avec les domaines PTB [18]. Les domaines PTB de SHC et d'IRS-1 ont une structure tridimensionnelle très proche de celle des domaines PH (pleckstrin homology) bien qu'aucune analogie de séquence n'apparaisse entre ces types de domaines [17]. Le domaine PH (environ 120 acides aminés) a été défini pour la première fois dans la pleckstrine, le principal substrat de la protéine kinase C dans les

\* N: Asn, P: Pro, X: n'importe quel acide aminé, Y(p): tyrosine phosphorylée.

plaquettes sanguines. Ce domaine est non seulement présent dans des protéines impliquées dans la transmission du signal (protéine kinases, facteurs d'échange de nucléotides, GTPases, phospholipases, protéines adaptatrices), mais également dans des protéines du cytosquelette telles que la spectrine et la syntrophine [19] (voir aussi l'article de P. Boivin et M.C. Lecomte dans ce numéro, p. 639). Certains phospholipides, en particulier les phosphatidylinositols bis- et trisphosphates PtdIns(4,5)P2 et PtdIns(1,4,5)P3, ainsi que les protéines G $\beta\gamma$ , peuvent interagir avec ces domaines [20, 21]. Le domaine PTB de SHC peut également se complexer avec des phospholipides *in vitro* [8]. Le modèle d'interaction de ces deux domaines avec des phospholipides et des phosphopeptides est renforcé par les données de localisation cellulaire: les protéines à domaines PH ou PTB sont en effet fréquemment localisées au niveau des membranes cellulaires où co-existent lipides et récepteurs phosphorylés [22]. Cette double spécificité de reconnaissance caractérise également le domaine SH2 de la sous-unité p85 de la PI3 kinase qui peut fixer en alternance des lipides et des protéines phosphorylés [23]. Le domaine PTB d'IRS-1 ne présente aucune affinité pour les phospholipides, mais la présence d'un domaine PH dans cette protéine pourrait lui permettre de complexer ce type de ligands (figure 3).

Du fait de leur communauté de structure et de fonction, il est possible de proposer une classification structurale dans laquelle les domaines PTB ne représentent qu'une sous-classe des domaines d'interaction PH [22].

### Les domaines PTB et la transmission du signal

Les protéines SHC et IRS-1 sont les substrats privilégiés des protéines à activité tyrosine kinase. La protéine IRS-1 est essentiellement phosphorylée par les récepteurs de l'insuline et de l'IGF-I et par les protéine kinases associées au récepteur de l'IL-4; à l'inverse, SHC est le substrat d'une pléiade de protéine kinases membranaires ou cytoplasmiques comprenant des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, des protéine kinases couplées aux récepteurs de cytokines ou aux protéines G [9, 13, 24-26]. La

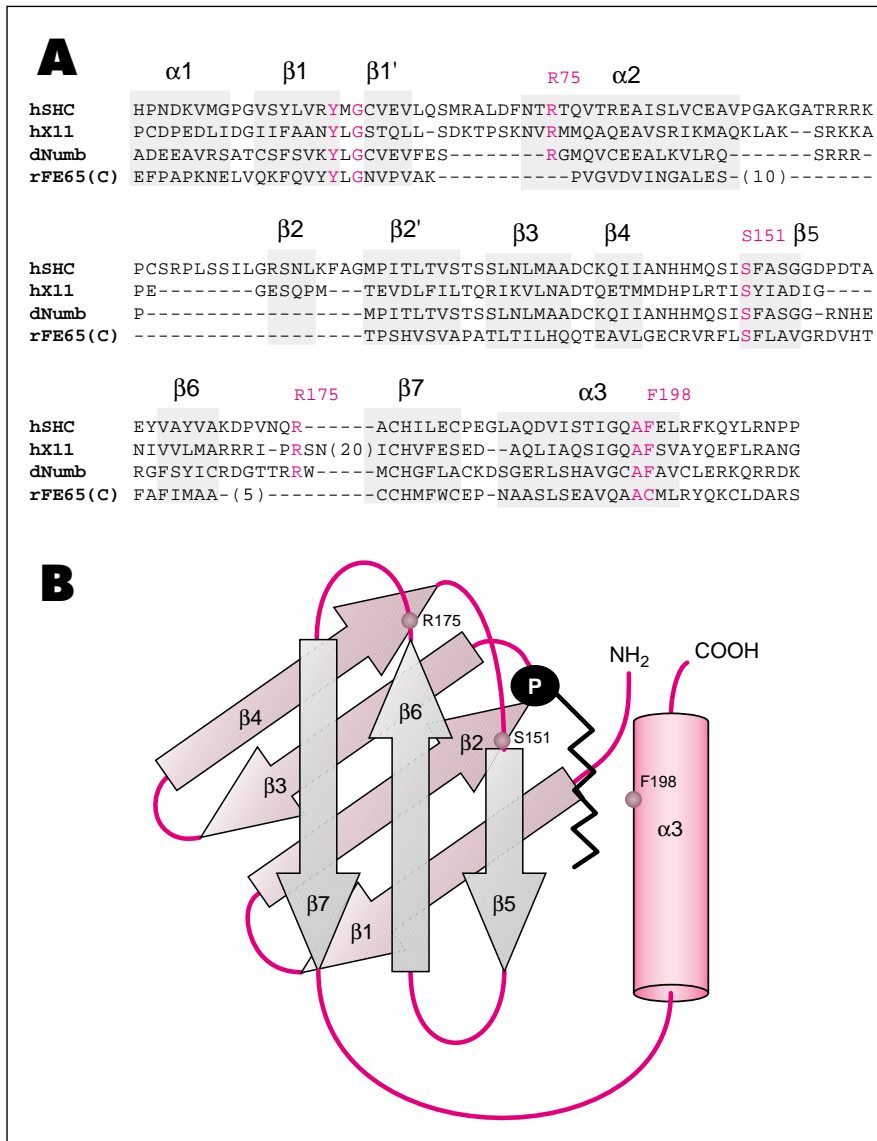


Figure 4. **Organisation des domaines PTB.** **A.** Alignement des séquences d'acides aminés des domaines PTB de SHC (résidus 40 à 210 de SHC humain, hSHC), X11 (résidus 268 à 429 de X11 humain), Numb (résidus 71 à 207 de Numb *Drosophile*) et du domaine carboxy-terminal de FE65 (résidus 320 à 455 de FE65 rat). Le domaine se décompose en sept feuillets  $\beta$  ( $\beta 1$  à  $\beta 7$ ) et trois hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$  à  $\alpha 3$ ). Les acides aminés conservés sont représentés en rouge en suivant la numérotation de SHC humain. Il est à noter que FE65 contient une cystéine à la place de la phénylalanine correspondant à F198 de SHC. **B.** Structure tridimensionnelle du domaine PTB de SHC. Le domaine s'organise en deux parois à feuillets  $\beta$  antiparallèles ( $\beta 1$  à  $\beta 4$  et  $\beta 5$  à  $\beta 7$ ) formant une poche fermée par une hélice  $\alpha$  ( $\alpha 3$ ). Le peptide phosphorylé (en noir) est en contact avec le domaine PTB principalement grâce aux résidus S151, R175 et F198 (en rouge). Les domaines PTB d'IRS-1 et PH s'organisent de façon identique dans l'espace.

protéine IRS-2, partageant 35 % d'identité avec IRS-1, possède également des domaines PH et PTB, ainsi qu'un second domaine de fixation pour des tyrosines phosphorylées RBD2 (*receptor binding domain 2*) dont

la spécificité diffère cependant de celle des domaines PTB [27]. La phosphorylation de IR, IGFI-R ou IL-4R provoque le recrutement d'IRS-1 sur le motif NPXY(p) du récepteur et sa phosphorylation sur résidu tyrosine.

Ces sites représentent alors des sites d'ancrage des domaines SH2 de GRB2, SYP et de la sous-unité p85 de la PI3 kinase, des protéines probablement à l'origine des différents effets cellulaires de l'insuline (figure 5) [28]. La protéine SHC contient des domaines PTB et SH2 respectivement en position amino- et carboxy-terminale, lui permettant ainsi une double fixation à des protéines phosphorylées sur résidus tyrosine (figure 3). La même organisation est retrouvée dans SHC B et SHC C, deux protéines apparentées à SHC [9, 29]. La fixation du domaine PTB sur le récepteur semble être l'étape-clé de la phosphorylation de SHC ou d'IRS-1 [10, 13, 30]. La protéine SHC est principalement phosphorylée au niveau de la tyrosine 317, qui constitue un site d'ancrage du complexe SOS/GRB2 grâce au domaine SH2 de GRB2. La protéine SOS stimule la formation de GTP-RAS et est ainsi à l'origine de la cascade des protéines à activité sérine/thréonine kinase (MAPK) responsable de multiples effets cellulaires [31].

## De nouvelles protéines à domaines PTB

### Définition d'une nouvelle famille

Sur la base d'alignements de séquences avec le domaine PTB de SHC, on pense que d'autres protéines possèdent ce type de domaine en une ou plusieurs copies (figure 6) [4, 32]. Parmi celles-ci, X11 et FE65 sont des protéines à localisation restreinte au système nerveux dont les fonctions étaient jusqu'à présent mal définies [33, 34]. Récemment, Fiore *et al.* (Naples, Italie) ont mis en évidence une interaction entre le domaine PTB carboxy-terminal de FE65 et la région cytoplasmique de  $\beta$ APP ( *$\beta$  amyloid precursor protein*), une protéine membranaire de type I impliquée dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer [35]. La protéine X11 peut également se fixer à la région cytoplasmique de  $\beta$ APP grâce à son domaine PTB [36]. Cette interaction est spécifique, les domaines PTB d'autres molécules comme NUMB, p96 et SHC n'ont aucune affinité pour  $\beta$ APP. Les domaines PTB de FE65 et X11 se fixent indépendamment de toute phosphorylation de  $\beta$ APP [36]. En fait, le domaine PTB de SHC peut également se fixer sur un motif non phosphorylé

## RÉFÉRENCES

25. Chen YH, Grall D, Salcini AE, Pelicci PG, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J* 1996; 15: 1037-44.

26. Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G, Pelicci G, Daly R, Li W, Batzer A, Thomas S, Brugge J, Pelicci PG. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 1992; 360: 689-92.

27. He W, Craparo A, Zhu Y, O'Neill TJ, Wang LM, Pierce JH, Gustafson TA. Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. *J Biol Chem* 1996; 271: 11641-5.

28. Myers MGJr, Sun XJ, White MF. The IRS-1 signaling system. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 289-93.

29. O'Bryan JP, Songyang Z, Cantley L, Der CJ, Pawson T. A mammalian adaptor protein with conserved Src homology 2 and phosphotyrosine-binding domains is related to Shc and is specifically expressed in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2729-34.

30. Isakoff SJ, Yu YP, Su YC, Blaikie P, Yajnik V, Rose E, Weidner KM, Sachs M, Margolis B, Skolnik EY. The Shc PTB/PI domain is required for Shc tyrosine phosphorylation by the insulin receptor (IR) and recognizes an NPXY motif in the IR that is distinct from IRS-1 *in vivo*. *J Biol Chem* 1996; 271: 3959-62.

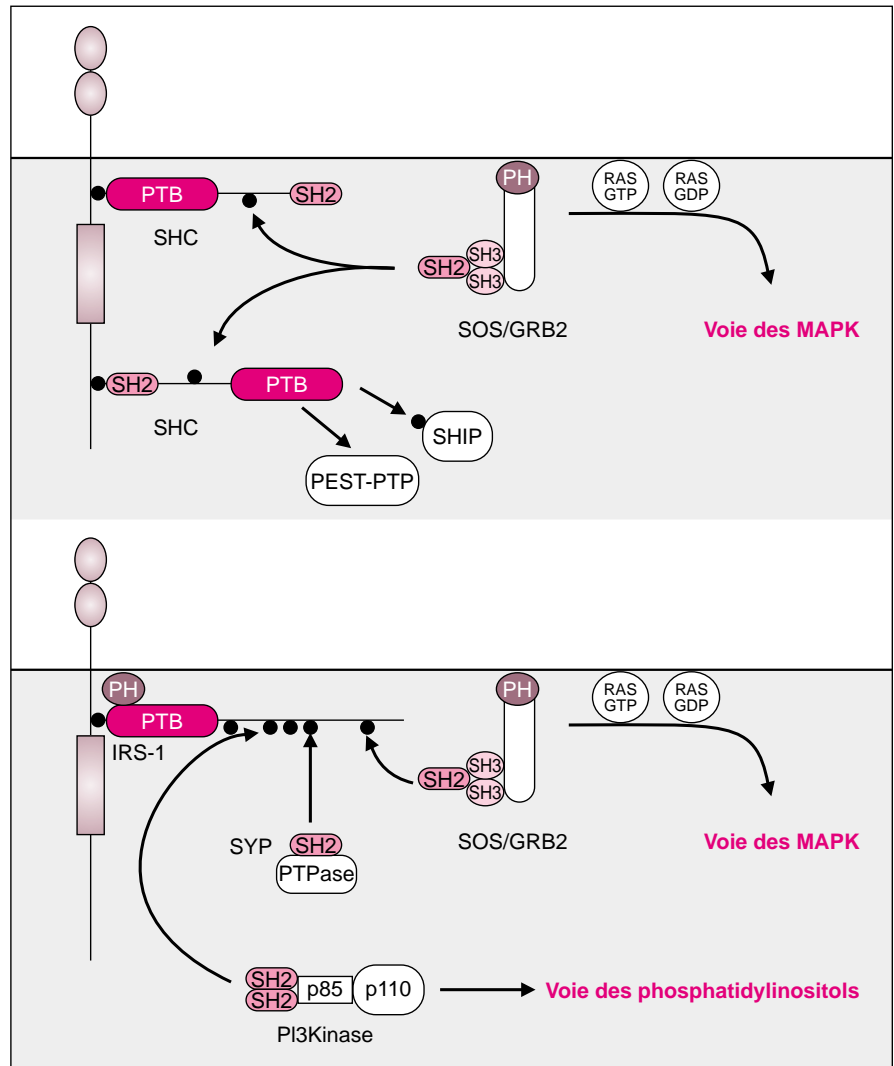
31. Chardin P. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *Med Sci* 1994; 10: 657-64.

32. Bork P, Margolis B. A phosphotyrosine interaction domain. *Cell* 1995; 80: 693-4.

33. Duclos F, Boschert U, Sirugo G, Mandel JL, Hen R, Koenig M. Gene in the region of the Friedreich ataxia locus encodes a putative transmembrane protein expressed in the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 109-13.

34. Duilio A, Zambrano N, Mogavero AR, Ammendola R, Cimino F, Russo T. A rat brain mRNA encoding a transcriptional activator homologous to the DNA binding domain of retroviral integrases. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5269-74.

35. Fiore F, Zambrano N, Minopoli G, Donini V, Duilio A, Russo T. The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1996; 270: 30853-6.



**Figure 5. SHC et IRS-1: deux plates-formes de la transmission du signal des protéines à activité tyrosine kinase.** La protéine SHC peut se fixer à un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase phosphorylé par ses domaines SH2 et PTB. Le domaine PTB de SHC peut, de plus, interagir avec des protéines phosphatases de façon dépendante (pour SHIP, une inositolpolyphosphate-5-phosphatase) ou non (pour PEST-PTP) de toute phosphorylation. Les protéines IRS-1 et IRS-2 peuvent être associées entre autres avec la phosphatase SYP, la p85 PI3 kinase et GRB2/SOS. PH : pleckstrin homology; MAPK : MAP-kinases; PTB : phosphotyrosine binding domain; PTPase : phosphotyrosine phosphatase.

[37]. Les termes de domaines *phosphotyrosine interaction* et *phosphotyrosine binding* semblent dès lors inappropriés pour X11 et FE65, trop restrictifs pour SHC puisque leurs cibles ne requièrent pas obligatoirement une phosphorylation, mais la pratique courante semble vouloir consacrer le terme PTB.

Le motif de fixation du domaine PTB de X11 est représenté par la séquence cytoplasmique YENPTY\* de  $\beta$ APP. Ce motif ressemble étonnamment au site

de fixation du domaine PTB de SHC  $\Psi$ XNXPXY(p). Il est à noter que le domaine PTB de X11 est le domaine possédant le plus d'identité avec celui de SHC [32]. Le site de fixation du domaine PTB de FE65 est différent de celui de X11 mais semble cependant dépendre de la présence du motif YENPTY de  $\beta$ APP [35, 36].

\* Tyr-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr.

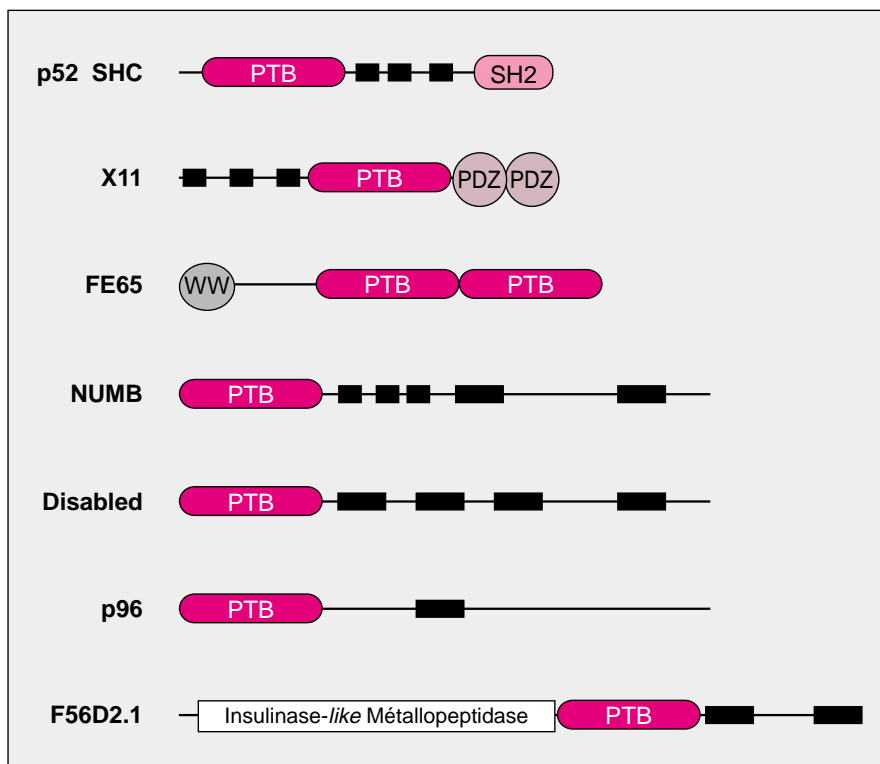


Figure 6. **Représentation schématique des protéines contenant un domaine PTB.** Les domaines PTB sont formés par 200 acides aminés alors que les domaines SH2 et PDZ contiennent 100 acides aminés et les domaines WW seulement 50 à 60 acides aminés. Les carrés et rectangles noirs représentent des régions riches en résidus proline. Les domaines PTB sont présents dans des protéines cytoplasmiques impliquées dans la transmission du signal de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase tels que le récepteur du CSF-1 pour p96 et les récepteurs du NGF et de l'EGF pour SHC. Les protéines X11 et FE65 se fixent à  $\beta$ APP et ont probablement un rôle dans le métabolisme ou la transmission du signal par la protéine. Les autres protéines ont des rôles moins bien définis mais semblent également participer à la transmission du signal de récepteurs membranaires [31].

### Structure des domaines PTB

L'alignement des séquences des domaines PTB met en évidence la conservation de plusieurs résidus importants pour leur fonction [32, 38]. Les résultats de la structure RMN du domaine PTB de SHC ont montré que la sérine S151, l'arginine R175 et la phénylalanine F198 sont indispensables à la fixation de ce domaine sur un peptide phosphorylé [8]. Ces données ont été confirmées par la mutagenèse du domaine PTB de SHC [38]. Le résidu F198 est conservé dans tous les domaines PTB à l'exception des protéines de la famille de FE65 où il est remplacé par une cystéine [38]. La mutation de cet acide aminé inhibe l'interaction de ces protéines avec  $\beta$ APP. Comme dans le cas de SHC, ce

résidu est probablement en contact avec les acides aminés en position -5 et -3 par rapport à la tyrosine carboxy-terminale du motif YENPTY. A l'inverse, la mutation de la sérine S417 du PTB de X11 correspondant au résidu S151 du PI/PTB de SHC (un résidu en contact avec le groupement phosphate de la phosphotyrosine) n'a aucun effet sur la fixation de  $\beta$ APP à X11 : cela confirme donc que la phosphorylation sur résidu tyrosine n'est pas indispensable à la formation de ce complexe [36].

### Domaine PTB : au centre d'interactions constitutives entre protéines

D'un point de vue fonctionnel, les domaines PTB de X11 et de FE65 peuvent être classés dans le groupe des

domaines d'interaction constitutive entre protéines, comprenant, d'une part, les domaines SH3 (*Src homology 3*) et WW (Trp-Trp), et d'autre part, des domaines récemment mis en évidence comme LIM (lin-11/Is1-1/Mec-3) et PDZ (PSD-95/DlgA/Zonula occludens 1) [2, 39-41]. Les domaines SH3 et WW se fixent sur des motifs riches en résidus proline, les domaines LIM semblent se fixer sur une séquence peptidique contenant une tyrosine, et les domaines PDZ sur un tripeptide de type S/TXV (où S est une sérine, T une thréonine et V une valine). Les protéines X11 et FE65 possèdent, comme cela est la règle pour les molécules impliquées dans la transmission du signal, un second type de domaine d'interaction outre leur domaine PTB : PDZ pour X11 et WW pour FE65 (figure 6). Dépourvues toutes les deux d'activité enzymatique, ces protéines sont donc susceptibles de jouer le rôle de protéines adaptatrices de la même manière que SHC, IRS-1 et GRB2. La protéine  $\beta$ APP possède les stigmates structuraux et fonctionnels d'un récepteur membranaire couplé aux protéines Go hétérotrimériques (*m/s n° 8/9, vol. 12, p. 980*); par analogie, X11 et FE65 pourraient représenter des cibles de ces activités enzymatiques (figure 7) [42].

### X11, FE65, $\beta$ APP et les autres

La mise en évidence des domaines d'interactions PTB et de leur rôle dans la formation de complexes protéiques ouvre des perspectives dans la compréhension d'un certain nombre de processus biologiques. Le cas de FE65 et de X11 est intéressant, ces deux protéines interagissant avec  $\beta$ APP, une protéine importante dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie neurodégénérative est caractérisée par la présence de plaques séniles et une sévère perte neuronale. La protéine  $\beta$ APP est membranaire et subit deux clivages protéolytiques physiologiques conduisant au relargage dans le milieu extracellulaire du domaine extracytoplasmique ( $\beta$ APP soluble) et d'un peptide de 40 à 42 acides aminés (A $\beta$ ) [43] (figure 8). Tous les cas sporadiques et génétiques de la maladie d'Alzheimer révèlent une production excessive du peptide A $\beta$  dans le cerveau des malades, et la formation de dépôts amyloïdes cérébraux insolubles, le signe

## RÉFÉRENCES

36. Borg JP, Ooi J, Levy E, Margolis B. The PI domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6229-41.

37. Charest A, Wagner J, Jacob S, McGlade CJ, Tremblay ML. Phosphotyrosine-independent binding of SH-C to the NPLH sequence of murine protein-tyrosine phosphatase-PEST. *J Biol Chem* 1996; 271: 8424-9.

38. Yajnik V, Blaikie P, Bork P, Margolis B. Identification of residues within the Shc phosphotyrosine binding/phosphotyrosine interaction domain crucial for phosphopeptide interaction. *J Biol Chem* 1996; 271: 1813-6.

39. Wu RY, Gill GN. LIM domain recognition of a tyrosine-containing tight turn. *J Biol Chem* 1994; 269: 25085-90.

40. Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P. Characterization of a novel protein-binding module - the WW domain. *FEBS Lett* 1995; 369: 67-71.

41. Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 1996; 85: 1067-76.

42. Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Surayama Y, Ogata E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein Go. *Nature* 1993; 362: 75-9.

43. Octave J, Macq A, Philippe B. Le pré-curseur du peptide amyloïde de la maladie d'Alzheimer. *Med Sci* 1995; 11: 1251-9.

44. Selkoe DJ. Amyloid  $\beta$  protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1996; 271: 18295.

45. Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1990; 265: 3116-23.

46. Filardo EJ, Brooks PC, Deming SL, Damsky C, Chersesh DA. Requirement of the NPXY motif in the integrin  $\beta 3$  subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Biol* 1995; 130: 441-50.

47. Tran Van Nhieu G, Krukons ES, Reszka AA, Horwitz AF, Isberg RR. Mutations in the cytoplasmic domain of the integrin  $\beta 1$  chain indicate a role for endocytosis factors in bacterial internalization. *J Biol Chem* 1996; 271: 7665-72.

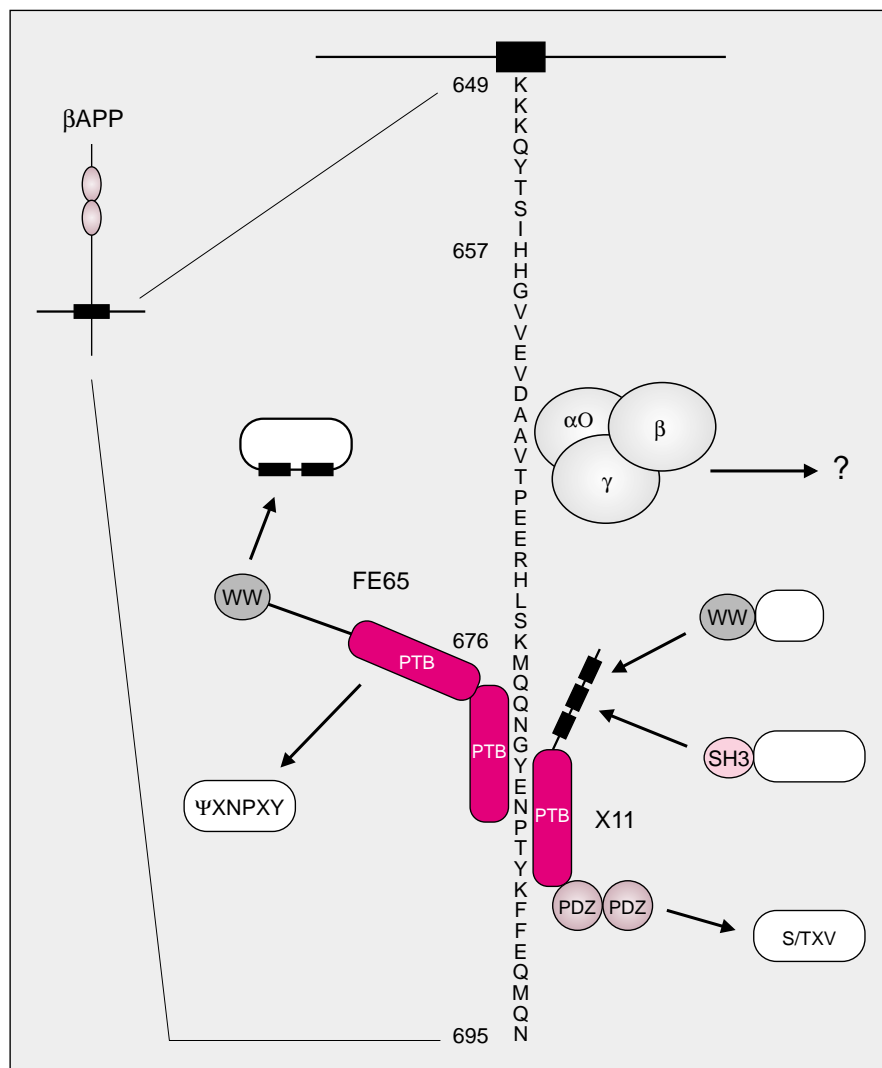


Figure 7. **Interactions de la région cytoplasmique de  $\beta$ APP avec les domaines PTB de X11 et FE65.** La protéine  $\beta$ APP est une protéine membranaire de type I (en haut à gauche). La séquence peptidique de la région cytoplasmique est détaillée et numérotée selon la nomenclature de l'isoforme humaine  $\beta$ APP<sub>695</sub>. La sous-unité  $\alpha$ o de la protéine G hétérotrimérique Go se fixe entre les résidus 657 et 676. Les domaines PTB de X11 et de FE65 (uniquement le domaine carboxy-terminal) se fixent au niveau de la séquence YENPTY avec des spécificités différentes. Les autres domaines d'interaction présents dans ces deux protéines peuvent complexer des partenaires contenant une séquence riche en résidus proline (rectangles noirs) pour le domaine WW de FE65,  $\Psi$ XNPXY pour le domaine PTB amino-terminal de FE65 et S/TXV pour les domaines PDZ de X11. La protéine X11 peut, de plus, interagir avec des domaines SH3 ou WW grâce à ses régions riches en résidus proline.  $\Psi$ : acide aminé hydrophobe. Code à une lettre des acides aminés: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr; X: n'importe quel acide aminé.

pathognomonique de la maladie. Le peptide A $\beta$  est sécrété dans le milieu extracellulaire après internalisation de  $\beta$ APP, un processus dépendant du motif cytoplasmique YENPTY de  $\beta$ APP [43, 44]. L'association de X11 et de FE65 avec ce motif incite donc à penser

que l'une de ces deux protéines est impliquée dans la localisation cellulaire de  $\beta$ APP. Cette hypothèse s'ajoute à celle évoquée plus haut concernant le rôle éventuel de X11 et FE65 dans la transmission du signal des protéines G, les deux possibilités n'étant pas mutuel-



Tableau I  
MOTIFS DE FIXATION DES DOMAINES PTB

| PTB <sup>1</sup>        | Site de fixation                        | Exemples  |
|-------------------------|---|---|
| IRS-1                   | -8    -6    -3<br>Ψ X Ψ X X N P X Y (P) | IR, IGF-IR, IL-4R                                   |
| SHC                     | -5    -3<br>X X X Ψ X N P X Y (P)       | MTAg, RTKs (EGFR, TRKA, FLT4), IL-2R, GM-CSFR, SHIP |
| X11                     | -5    -3<br>X X X Ψ X N P X Y           | βAPP  |
| Protéines <sup>2</sup>  | Motifs ΨXNPXY                           |   |
| βAPP                    | YENPTY                                  |   |
| LDLR                    | FDNPVY                                  |   |
| LRP                     | IGNPTY<br>FTNPVY                        |   |
| Mégaline/gp330          | FENPMY<br>IENPIY                        |   |
| Intégrine sous-unité β1 | ANNPLY<br>VVNPKY                        |   |
| Intégrine sous-unité β3 | ANNPLY<br>FTNITY                        |   |
| Intégrine sous-unité β5 | ASNPLY                                  |   |
| Intégrine sous-unité β6 | GTNPLY*                                 |   |
| Intégrine sous-unité β7 | DSNPLY*                                 |   |
| SAS                     | YDNPSY                                  |   |

<sup>1</sup> Représentation des sites de fixation des domaines de IRS-1, SHC et X11.

<sup>2</sup> Protéines contenant un site potentiel de fixation des domaines PTB.

\* Représente un site dont le résidu en position -5 n'est pas hydrophobe. SAS est la protéine codée par le gène stranded at second.

Code à une lettre des acides aminés: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr.

lement exclusives. La mise en évidence de partenaires pour les domaines PDZ et WW de ces protéines pourrait permettre de préciser leurs fonctions dans le métabolisme de βAPP.

### D'autres interactions à mettre en évidence

L'internalisation des protéines membranaires est fréquemment associée à la présence d'un térapeptide appelé « motif d'internalisation » dans leur région cytoplasmique. L'exemple du récepteur des LDL (LDLR) est le plus célèbre puisqu'il a permis, le premier, de définir le motif cytoplasmique NPXY impliqué dans l'internalisation du récepteur [44]. De façon presque systématique, ce motif possède une tyrosine et adopte une conformation en tour β [45-47]. La phosphorylation de cette tyrosine n'est pas indispensable à l'internalisation [46]. À la lumière des résultats concernant l'association des domaines PTB de X11 et de FE65 avec le motif NPXY de βAPP, il est tentant de suggérer que certains motifs d'internalisation « orphelins » (Tableau I) pourraient être des ligands pour ces nouveaux domaines d'interaction. Cette hypothèse a été testée sans succès avec les domaines PTB de X11, FE65, NUMB et p96 pour les motifs NPXY du LDLR et de récepteurs apparentés (gp330/mégaline, LRP) (J. Herz, J.P. Borg et B. Margolis, résultats non publiés). Ce résultat négatif met en tout cas en évidence la grande sélectivité de reconnaissance des domaines PTB pour des séquences pourtant très similaires.

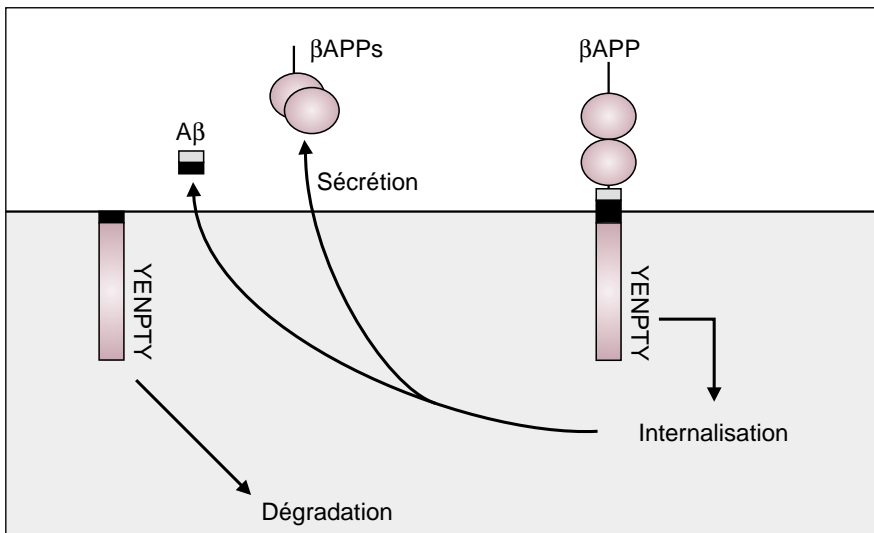


Figure 8. **Métabolisme de βAPP.** La protéine βAPP est internalisée grâce à la présence du motif YENPTY cytoplasmique et clivée par des enzymes (sécrétases) au niveau des régions extracellulaire et transmembranaire aboutissant au relargage du peptide amyloïde Aβ et de βAPPs (βAPP soluble). La région cytoplasmique est dégradée dans la cellule au niveau de compartiments lysosomiaux.

## Conclusion

La famille des protéines à domaines PTB a été définie par des identités ou des similitudes avec le domaine PTB de SHC. Cette analyse de séquences a permis de définir un consensus et d'isoler des résidus-clés pour la fonction de ces domaines. D'un point de vue structural, ces domaines s'organisent dans l'espace de la même façon que les domaines PH en dépit de l'absence de communauté de séquence [22]. Ce résultat contraste nettement avec le consensus concernant la fonction des domaines SH2 qui présente une forte conservation de séquence. Cette différence est illustrée par le fait que le domaine PTB d'IRS-1 échappe au consensus « domaine PTB » malgré une fonction et une spécificité de fixation très semblables à celles du PTB de SHC. Les domaines PTB et PH pourraient dériver d'un même domaine ancestral dont le répertoire s'est accru au cours de l'évolution de manière à lui permettre de complexer certains lipides et protéines, de façon constitutive ou réglée par phosphorylation.

La transmission d'un signal de la membrane vers le noyau d'une cellule se fait par une cascade d'interactions entre protéines et lipides comparable à la disposition d'un jeu de dominos. Comprendre ces interactions et les mettre en perspective dans des processus pathologiques revient à définir des cibles pour des thérapeutiques spécifiques, qu'elles soient chimiques, peptidiques ou nucléotidiques. La ciclosporine représente un exemple magistral d'inhibiteur spécifique de l'activation des lymphocytes T dont la découverte doit tout à la recherche empirique. Les formidables avancées dans la mise en évidence des interactions et dans leur modélisation, en particulier grâce à la cristallographie des protéines et à la RMN, rendent maintenant possible la conceptualisation de nouveaux médicaments à activité ciblée ■

## Summary

### PTB, a protein-protein interaction domain important for signal transduction

Protein-protein interaction domains play a crucial role in the signal transduction of receptors with tyrosine kinase activity (RTKs). SH2 domains have been shown to bind tyrosine-phosphorylated peptides with a specificity determined by residues lying carboxyterminal to the phosphotyrosine. Recently, a second phosphotyrosine interacting domain has been characterized by several groups and named PTB (phosphotyrosine binding) or (phosphotyrosine interaction) domain. The binding specificity of this new domains is determined by residues amino-terminal to the phosphotyrosine. The binding site of SHC and IRS-1 proteins PTB domains, two major substrates of RTKs, is represented by the sequence  $\Psi$ XNPXpY (where  $\Psi$  is a hydrophobic residue, N is asparagine, P is proline, X is any amino acid and pY is phosphotyrosine). The integrity of this domain seems important for the signaling through RTKs such as epidermal growth factor- and insulin-receptors. From structural analysis, PTB domains are proposed to belong to the family of PH (pleckstrin homology) domains. Through computer alignments, several putative PTB domains have been detected in other cytoplasmic proteins. Among them, FE65 and X11 have been shown to contact  $\beta$ APP ( $\beta$  amyloid precursor protein) with their PTB domain. Whereas the overall structure and binding properties of these domains seem similar to those of the SHC PTB domain, they differ in the sense that tyrosine phosphorylation of the target ( $\Psi$ XNPXY) is not required. The interaction between  $\beta$ APP and FE65/X11 is discussed in relation to their potential role in the processing of  $\beta$ APP, a major actor in Alzheimer's disease. Moreover, the presence of  $\Psi$ XNPXY motifs in several membrane proteins (integrins, LDL receptor) leads to the hypothesis that other PTB domain-containing proteins may contact these receptors and participate to their metabolism and functions.



Bayard Éditions  
Sciences Médecine  
ISBN 2.227.13700.1  
125 FF

Quelle médecine demain, et pour quels malades ? Que penser des progrès récents, par exemple dans le domaine de la médecine prédictive, des thérapies géniques, des interventions sur l'embryon humain ? Quelles en seront les conséquences pour l'homme et la société ? Pourra-t-on longtemps résister à la tentation de l'eugénisme ? Autant de questions cruciales sur lesquelles Axel Kahn livre ses réflexions d'homme de science critique.

**Médecin généticien, directeur de recherche à l'Inserm, Axel Kahn est membre du Comité national consultatif d'éthique et, depuis plus de dix ans, rédacteur en chef de la revue médecine/sciences. Dominique Rousset est journaliste et anime en particulier l'émission « Enjeux internationaux » sur France Culture.**

TIRÉS À PART

D. Birnbaum.