

Université de Montréal

**Caractérisation fonctionnelle de SH3AP1, un nouvel adaptateur
moléculaire**

Par
Saadallah Bouhanik

Programmes de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en biologie moléculaire

Octobre 2004

© Saadallah Bouhanik 2004

QH

506

U54

2005

v. 010

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation fonctionnelle de SH3AP1, un nouvel adaptateur
moléculaire**

Présenté par :
Saadallah BOUHANIK

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Isabelle ROYAL
président-rapporteur

Dr. Alain MOREAU
codirecteur

Dr. Pierre BELHUMEUR
membre du jury



Résumé

SH3AP1 un nouvel adaptateur moléculaire est exprimé de façon ubiquitaire dans des cellules de mammifères. Il est constitué à son extrémité N-terminale d'un domaine FCH (Fes/Fer, Cip-4 homologous), d'un domaine central et à son extrémité C-terminale de deux domaines SH3. SH3AP1 est codée par un gène de 305 kb situé sur le chromosome 11 au locus 11q13.4. La protéine devient phosphorylée sur un (ou des) résidu(s) tyrosine lorsque la croissance des cellules est stimulée par l'addition de sérum au milieu de culture.

Afin de caractériser cet adaptateur nous avons cloné la partie C-terminale (aa 627-737) dans un vecteur pBTM-116 + Src fusionné au domaine de liaison à l'ADN de GAL4. Cette construction nous a servi d'appât dans le système du double hybride de la levure. Le criblage des bibliothèques de tissus de poumons et de glandes mammaires a permis l'identification de plusieurs clones dont Vav-1. Les ADNc des deux bibliothèques ont été clonés dans le vecteur pACT2 fusionné au domaine d'activation de GAL4.

La protéine Vav-1 (Rho/Rac-specific guanine nucléotide exchange factor) a été isolée lors du criblage de la bibliothèque d'ADNc de tissus de poumon en utilisant la partie C-terminale de SH3AP1 comme appât dans le système du double hybride de la levure. Le fragment d'ADNc retrouvé dans la bibliothèque de tissus de poumons contenait la partie C-terminale de Vav-1, elle est composée de deux domaines SH3 séparés par un domaine SH2. Vav-1 a été identifié par Katzav et al en 1989. La protéine Vav-1 est codée par un proto-oncogène *VAV-1*, un membre de la famille des GEFs, cette protéine est surtout présente dans les tissus hématopoïétiques où elle joue un rôle important dans le développement et l'activation des cellules B et T. Vav-1 est aussi associé à des pathologies humaines héréditaires comme le syndrome de Wiskott-Aldrich.

L'interaction entre SH3AP1 et Vav-1 a été confirmée une seconde fois dans la levure avec le test de β -Galactosidase, par la suite nous avons confirmé l'interaction *in vitro* par le test de GST *pull-down*. Cette interaction est médiée par la partie C-terminale riche en proline de SH3AP1 et le deuxième domaine SH3 en position C-terminale de Vav-1. Les tyrosines phosphorylées ne jouent aucun rôle dans cette interaction.

Mots clés : Adaptateur, interaction, domaines, SH2, SH3, Vav-1, système du double hybride de la levure, GST-*pull-down*.

Abstract

SH3AP1 is a new molecular adaptor, which is expressed ubiquitously in mammalian cells. SH3AP1 has one FCH domain (Fer/Fes Cip4 homology domain) in N-Terminal, two coiled-coil regions and two SH3 domains at C-terminal position. SH3AP1 is encoded by a gene of 305 kb on chromosome 11 locus 11q13.4. The protein SH3AP1 is phosphorylated on tyrosine residue(s) by adding serum to the growth medium.

To characterize the C-terminal part of this adaptor, we cloned the C-terminal region of SH3AP1 in pBTM116+Src vector (from aa 627-737) fused with the binding domain of GAL4 and we used it as a bait to perform a yeast two-hybrid screening using two cDNA libraries, one from lung tissues and the other from mammary glands tissues. The cDNAs were cloned in pACT2 vector fused to GAL4 activating domain.

We identified different clones; one of them is Vav-1 (Rho/Rac-specific guanine nucleotide exchange factor) which contains two SH3 domains separated by one SH2 domain. Vav-1 protein was first identified by Katzav & al. Vav-1 is expressed exclusively in hematopoietic tissues. It is a multi-domains protein involved in the development and activation of T and B cells and it is also associated with the Wiskott-Aldrich syndrome, an X-linked pathology.

The interaction between SH3AP1 and Vav-1 was confirmed in the yeast using a β -Galactosidase assay. This interaction was also confirmed *in vitro* using a GST pull-down assay. We identified that the second SH3 domain on C-terminal of Vav-1 is involved in the interaction with the C-terminal region of SH3AP1, which is proline rich. The phosphorylated tyrosines on SH3AP1 are not involved in this interaction.

Key words: Adaptor, interaction, domains, SH2, SH3, Vav-1, yeast two-hybrid system, GST pull-down assay.

Abreviations utilisées

2xYT	2x Yeast triptone
3-AT	3 amino-triazole
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
B4.1	Band 4.1 homologues
BLAST	Basic local alignment search tool
CASK	Calcium / calmodulin - dependent serine protein kinase
CH	Calponin homology
Cip4	Cdc42 interacting protein-4
CRE	cAMP-regulated enhancer
DA	Domaine d'activation
DH	Dbl homologous domain
DHR	Discs-large homology region
DL	Domaine de liaison
DMSO	Dimethyl sulfoxyde
DO	Densité optique
DRP	Domaine riche en prolines
DSS	Disuccini-mydil suberate
DTT	Dithioerythritol
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetic acide
EGF	Epithelial growth factor
EGF-R	Epithelial growth factor receptor
ELISA	Enzyme immuno-sorbent assay
ERM	Ezrine radixine moesine
FCH	Fer/Fes Cip4 homology
FHA	Forkhead associated domain
FRET	Fluorescence resonant energy transfer
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescente protein
GMPc	Cyclic guanosine monophosphate
GST	Glutathione S transferase
GTPases	Guanosine triphosphatases
HRP	Horseradish peroxydase
HUGE	Human unidentified gene-encoded large proteins
IgM	Immunoglobuline classe M
IP	Inositol phosphate
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LiAc	Lithium acetate
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3
Lsb7p	Las seventeen binding protein-7

LTR	Long terminal repeat
MaGuk	Membrane-associated guanylate kinase homologs
MAPkinase	Mitogene activating protein kinase
NAK	NF-kappaB-activating kinase
NGF	Nerve growth factor
PBS	Phosphate buffered saline
PCH	Pombe Cdc15 homology
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptor
PDZ	PSD-95, Dlg, ZO-1
PEG	Polyéthylène glycol
PH	Pleckstrine homology
PI-3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	p21-activated kinase
PPP	Polyproline
PSD-95	Mammalian postsynaptic density protein 95 kDa
PTB	Phosphotyrosine binding
PTPc	Protein tyrosine phosphatase
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SH2	Src homology domain
Spc	Spectrine-like proteins
TCR	T cell receptor
TE	Tris EDTA
TM	Trans membrane
TRP	Tétratricopeptide
VHD	Verpoline homology domain
Vrp1p	Verpoline
WASp	Wiskott-aldrich syndrome protein
WH-1/2	WASp homology domain 1/2
X-Gal	5-bromo-4-chromo-3-idolyl-b-G-galctoside
YPD	Yeast peptone dextrose medium
ZF	Zinc finger
ZRP-1	Zyxin-related protein

Remerciements

Je voudrais avant tout remercier le Docteur Alain Moreau d'avoir accepté d'être mon co-directeur et me superviser durant la rédaction de mon mémoire de maîtrise. Son aide m'a été très précieuse. Il a su me conseiller et m'orienter jusqu'à l'aboutissement de cet ouvrage. Pour tout cela je lui suis d'une très grande et sincère gratitude.

Je voudrais aussi remercier le Docteur Isabelle Royal d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury ainsi que le Docteur Pierre Belhumeur d'avoir accepté de siéger comme membre de ce jury. Ici je vous témoigne de toute ma gratitude.

Je tiens également à remercier les autres personnes qui ont travaillé avec moi sur ce projet et spécialement Yves Fortin qui n'a pas été avare ni de son temps ni de sa patience pour me fournir toute l'aide dont j'ai eu besoin pour accomplir mon travail de laboratoire et à l'avancement de mon projet.

J'aimerais aussi remercier Denis L'Abbé et Jason Boyd qui ont su être patients de m'avoir à côté d'eux pendant deux bonnes et longues années. Ils ont supporté mes blagues à un sous et les débordements de mes documents sur leurs bureaux mais surtout je les remercie pour les conseils techniques qu'ils m'ont offerts.

Je tiens absolument à remercier le docteur Yu Zhenbao, Normand Jolicoeur, Frédéric Savard, Eric Sirois, Nasser Fotouhi, Meryem Maoui, Nathalie Oulianova, Julie Champagne et enfin Lenka Rihakova pour leur soutien et surtout pour leur amitié.

Merci à tous nos professeurs qui ont pris de leur temps pour nous donner du savoir, une denrée qui ne s'achète pas.

Sans oublier Madame Viviane Jodoin qui nous a facilité notre acheminement universitaire durant ces deux années et à qui je dis merci.

Et enfin je remercie mon épouse et mon âme sœur, Carmen Scarlat, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible à réaliser, son amour, son appui et ses encouragements tout le long de ma formation ont été d'un grand réconfort, elle était présente à mes côtés tout le temps et surtout aux moments les plus durs, pour tout cela et même plus elle aura mon éternel amour et mon éternelle affection.

Je ne peux terminer sans avoir une pensée profonde pour ma mère et pour feu mon père qui m'ont donné la vie et tout leur amour. Ils m'ont toujours encouragé à faire des études, ils m'ont laissé choisir un métier qui m'a permis de voyager, de rencontrer des gens exceptionnels et surtout de découvrir le Québec.

Dédicace

Comment terminer cet ouvrage sans avoir une pensée pour mon directeur de recherche, feu le docteur Denis Banville, les mots me manquent pour remercier cet homme avant tout au grand cœur, qui a accepté sans aucune réticence de m'accueillir dans son laboratoire. Il m'a confié la grande tâche d'accomplir ce projet en toute confiance. Cet homme n'a pas lésiné ni sur son temps ni sur sa patience pour me guider, me conseiller et m'orienter durant la réalisation de ce projet. Il m'a appris la patience, une vertu rare et précieuse, pour arriver à obtenir de bons résultats. Cet homme, que j'ai côtoyé durant plusieurs années, m'a appris à travailler avec minutie et surtout à être persévérant car ce sont les outils de la réussite. Il m'a soutenu et encadré tout au long de ma formation, il a répondu à toutes mes questions, même les moins pertinentes. Pour tout cela et surtout pour son amitié sincère je lui serai éternellement reconnaissant. Il restera pour toujours dans ma mémoire.

À mon ami le docteur Denis Banville je dédie ce mémoire.

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>v</i>
<i>Abréviations utilisées</i>	<i>vi</i>
<i>Remerciements</i>	<i>viii</i>
<i>Dédicace</i>	<i>ix</i>
Table des matières	1
Liste des figures et des tableaux	4
CHAPITRE 1 : Introduction	6
1.1 Du génome au protéome	7
1.2 La signalisation cellulaire	10
1.3 Les récepteurs couplés aux protéines-G (les RCPGs)	10
1.5 Variété des effecteurs et cibles des protéines-G	12
1.5.1 Les adénylates cyclases (ou adénylyl-cyclases)	12
1.5.2 La phospholipase C.....	12
1.5.3 La cGMP phosphodiesterase.....	13
1.5.4 Les canaux ioniques.....	13
1.6 Les récepteurs liés à des canaux ioniques.....	13
1.7 Les Récepteurs Tyrosine Kinases	14
1.8 Les RTK , Ras et les molécules adaptatrices	15
1.8 Les adaptateurs moléculaires et leur rôle dans la signalisation	18
1.8.1 Les domaines SH2/PTB.....	18
1.8.2 Les domaines FHA, WD40, 14-3-3	19
1.8.3 Les domaines SH3, WW et EVH1.....	21
1.9 La cytocinèse	23
1.9.1 Le domaine PCH/FCH.....	23
1.9.2 Quelques membres de la famille des protéines à domaine PCH/FCH et leurs rôles biologiques	25
1.9.3 Imp2	25
1.9.4 PSTPIP	25
1.9.5 Les protéines Cyk2 et Cdc15 jouent un rôle dans la cytocinèse.....	26
1.9.6 Les interactions entre PSTPIP, PSTPEST et WASP et leurs rôles biologiques	28
1.9.7 L'interaction de Cip4 avec WASP et régulation de la structure du cytosquelette	28
1.9.8 L'interaction entre WASP et Cip4 ne nécessite pas Cdc42.....	29
1.9.9 La régulation de la polymérisation de l'actine dans les lymphocytes T implique WASP, Cdc42 et Vav-1	31
1.9.10 Le rôle de Cdc42, Las17p et Bzz1 dans la régulation de la polymérisation de l'actine.....	33
1.10 Le projet.....	34

1.10.1 Historique.....	34
1.10.2 Objectif	34
1.10.3 hPTP1E	37
1.11 Les différents domaines de hPTP1E	37
1.11.1 Le domaine ERM.....	37
1.11.2 Les domaines PDZ.....	37
1.11.3 Le domaine PTPc.....	38
1.12 Identification des partenaires de hPTP1E.....	38
1.13 Organisation génomique de SH3AP1 humain.....	39
1.13.1 SH3AP1	39
1.13.2 FLJ00007	43
1.14 La superfamille des petites GTPases	45
1.15 Les Rho-GTPases (Rho, Rac et Cdc42) et l'organisation du cytosquelette	46
1.15.1 GAPs (GTPase-activating proteins).....	47
1.15.2 GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors).....	47
1.15.3 GEFs (guanine nucleotide exchange factors).....	47
1.16 Les protéines membres de la famille GEFs	50
1.16.1 Vav-1, Vav-2 et Vav-3.....	50
1.16.2 Le gène Vav	50
1.17 Les différents domaines de Vav.....	52
1.17.1 Le domaine CH.....	52
1.17.2 Le domaine DH (Rho-GEF).....	52
1.17.3 Le domaine PH	53
1.17.4 La particularité de la partie C-terminale de Vav.....	53
1.18 La régulation de l'activité de VAV.....	56
1.18.1 Les éléments en amont de la voie de signalisation de Vav-1	56
1.18.2 Les régulateurs négatifs de Vav-1.....	56
1.18.3 Les éléments en aval de la signalisation exercée par Vav-1	57

CHAPITRE 2: Matériels et Méthodes 60

2.1 Étude des interactions de SH3AP1 chez la levure.....	60
2.1.1 Le système du double hybride chez la levure	60
2.1.2 Avantages de la technique double hybride	61
2.1.3 Inconvénients de la technique double hybride.....	61
2.1.4 Applications du système du double hybride	61
2.2 La méthode de sélection des clones positifs	63
2.3 Clonage de l'appât utilisé.....	65
2.4 Transformation séquentielle des levures.....	67
2.4.1 Calcul de l'efficacité de la transformation.....	68
2.4.2 Test de la β -galactosidase	69
2.5 Séquençage et identification des clones positifs.....	70
2.6 Confirmation des interactions dans la levure.....	72
2.7 Confirmation dans les cellules de mammifères des interactions déjà identifiées chez la levure	72

2.7.1 Clonage des protéines candidates dans un vecteur d'expression avec un tag moléculaire pour les cellules de mammifère	72
2.7.2 Co-transfection des cellules 293A	73
2.7.3 Lyse des cellules et co- immunoprécipitations	74
2.7.4 SDS-PAGE et Immunobuvardages Western	75
2.8 GST-Pull-Down	76
2.9 Identification des résidus impliqués dans l'oligomérisation de SH3AP1	77
2.10 Arbre phylogénétique des protéines à deux domaines SH3 de la famille FCH....	78
CHAPITRE 3: Résultats	79
3.1 Analyse du gène de SH3AP1 et de son produit	79
3.2 Caractéristiques de la partie Carboxy-terminale de SH3AP1 (appât)	80
3.3 Résultats des criblages double-hybride chez la levure	82
3.3.1 Description des clones positifs retrouvés dans les deux librairies d'ADNc	82
3.4 Confirmations des résultats dans les cellules de mammifères	89
3.4.2 Immunoprécipitation et immunobuvardage Western.....	89
3.5 Confirmation de l'interaction entre SH3AP1 et Vav1 par GST-pull-down	92
3.5.1 Clonage des constructions dans les vecteurs d'expression avec étiquette GST	92
3.5 Résultats de la dimérisation et oligomérisation	96
3.7 Prédiction de la structure en double hélice (coiled-coil structure)	100
3.8 Alignement des séquences des protéines de la famille PCH	102
3.8.1 Le Neighbor Joining	102
3.8.2 Le pourcentage de mutation accepté (PAM)	102
CHAPITRE 4 : Discussion	105
4.1 Les récents évènements.....	105
4.2 Les différentes formes de SH3AP1.....	105
4.3 Les interactions de SH3AP1 avec les protéines du cytosquelette.....	108
4.4 Arbre phylogénétique de l'évolution et de la conservation des protéines de la famille PCH chez les métazoaires.....	111
CHAPITRE 5 : Conclusion	113
REFERENCES.....	119

Liste des figures et des tableaux

Figure 1. La voie d'activation de Ras par les récepteurs tyrosines kinases	17
Figure 2. Représentation schématique de quelques domaines appartenant à des protéines qui sont impliquées dans la signalisation.....	20
Figure 3. Organisation des domaines de la protéines WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein).....	22
Figure 4. Organisation de la structure secondaire du domaine PCH/FCH (Pombe Cdc15 Homology)	24
Figure 5. Organisation des doamines des protéines membres de la famille FCH chez les métazoaires.	27
Figure 6. Rôle de WASP dans la nucleation de l'actine	30
Figure 7. Modèle de la régulation de la polymérisation de l'actine.....	32
Figure 8. La stratégie utilisée dans le système du double hybride chez la levure	35
Figure 9. Schéma du profil d'expression de SH3AP1 et de FLJ0007 dans plusieurs tissus par RT-PCR- ELISA.....	36
Figure 10. Organisation génomique du gène de SH3AP1	40
Figure 11. La localisation des différents domaines constituant la protéine SH3AP1	41
Figure 12. La séquence de la région codante du gène de SH3AP1	42
Figure 13. Le pourcentage d'identité de séquence entre SH3AP1 et FLJ0007	44
Figure 14a. La régulation de l'échange GTP-GDP.....	49
Figure 14b. La cascade des GTPases impliquées dans l'organisation du cytosquelette dans les fibroblastes.	49
Figure 15. La structure des protéines membres de la famille Vav.....	51
Figure 16. Modèle représentant le rôle de Vav-1 dans les cellules lymphoïdes.....	55
Figure 17. Le modèle de la synergie d'interaction entre Vav-1, Nck et SLP-76.....	59
Figure 18. Représentation schématique du système du double hybride chez la levure....	62
Figure 19. La transformation séquentielle des levures	64
Figure 20. L'appât.....	66
Figure 21. Étude des sites de phosphorylation sur les tyrosines de SH3AP1	81
Figure 22. La représentation schématique des fragments de l'ADNc ayant interagit avec la partie C-terminale de SH3AP1 utilisée comme appât dans le système du double hybride chez la levure.	86
Figure 23. La structure complète des trois principales protéines repêchées par le système du double hybride chez la levure.	87
TABLEAU 1A et 1B	88
Figure 24. Les clones de Vav-1 dans le vecteur pACTAG2-HA	91
Figure 25. Les clones de Vav-1 dans le vecteur pGEX-5X-3-GST.....	93
Figure 26. GST-Pull-Down.....	95
Figure 27. Les clones de SH3AP1 construits dans les vecteurs pcDNA3-FLAG et pcDNA3-GFP	97
Figure 28. La confirmation de l'oligomérisation de SH3AP1	99
Figure 29. Prédiction de la formation de dimères.....	101
Figure 30. Arbre phylogénétique des protéines de la famille PCH à deux domaines SH3	104

Figure 31. Représentation schématique des quatres formes de SH3AP1 (Carom) identifiées jusqu'à présent.....	107
Tableau 2. Résumé des interactions des SH3AP1	118

CHAPITRE 1 : Introduction

Le champ de la biologie cellulaire et moléculaire a connu des développements considérables ces dernières années. Grâce au développement de nouvelles technologies, d'une meilleure compréhension des mécanismes intracellulaires de signalisation, de l'identification de nouveaux compartiments cellulaires, de nouvelles interactions entre les différentes protéines ont été identifiées. Les cellules reçoivent l'information des récepteurs aux facteurs de croissance, de la matrice cellulaire et des contacts cellule-cellule, toutes ces informations doivent être intégrées afin de réguler différents processus en aval comme : la synthèse des protéines, la croissance cellulaire, la motilité, l'architecture et la polarité cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire. Les mêmes molécules de signalisation sont utilisées pour tous ces processus et génèrent des réponses dans différents types cellulaires. L'activation des molécules de la signalisation peut avoir diverses conséquences dépendamment du contexte cellulaire. La compréhension du fonctionnement de ce réseau complexe et extraordinaire *in vivo* et comment il est altéré dans les cellules cancéreuses représente un défi intellectuel majeur.

1.1 Du génome au protéome

Une cinquantaine d'années s'est écoulée depuis la découverte de la structure en double hélice de l'ADN par Francis Crick, Jim Watson et Maurice Wilkins. Des noms que la science ne pourra pas oublier. Cette reconnaissance s'est d'ailleurs traduite par l'obtention du prix Nobel pour couronner cette découverte (1).

Au début de l'année 1990, deux équipes ont relevé le défi du projet du séquençage du génome humain. Cet ambitieux projet les a mené une dizaine d'années plus tard, en février 2001, à la publication de la première version de la séquence du génome humain. La version définitive de la séquence des 3 milliards de bases qui composent le génome humain devrait être connue vers 2005 et nous permettra de connaître le nombre et la localisation exacte des gènes du génome humain. Ce projet a été rendu possible grâce au génie de l'homme et au développement de nouvelles technologies adaptées à ces besoins. La génomique "classique", en ne s'attachant qu'à l'analyse des séquences et des structures du génome, rencontre des limites pour inférer la fonction des gènes, des ARN et des protéines. La similarité de séquences ou de structures ne permet pas forcément de déduire une similarité de fonction.

La génomique fonctionnelle vient donc compléter cette approche du génome. Elle correspond à ce que l'on appelle la "post-génomique".

L'expression "*post-génomique*" est également souvent utilisée pour marquer la fin d'une période d'expérimentation et de séquençage.

La disponibilité des séquences, collectionnées sans connaissance sur le fonctionnement et l'évolution des systèmes vivants, marque le début d'un travail laborieux d'analyse de ces données.

Dans tous les cas, l'expression de chaque gène est conditionnée par le réseau des interactions responsables de l'homéostasie cellulaire. Elle s'effectue en deux étapes : la synthèse des ARNm (transcription) et la synthèse des protéines (traduction). Une première représentation d'une cellule donnée peut donc être définie par l'ensemble des gènes qui s'y expriment à un instant donné, c'est à dire par son transcriptome (ensemble des ARNm) et par son protéome (ensemble des protéines présentes dans une cellule donnée). Savoir où et quand un gène est transcrit en ARN et traduit en protéine est un

indice important pour déterminer sa fonction biologique. Connaître la façon dont un produit de gène particulier est fabriqué, où il réside, avec quelle force il interagit avec d'autres produits de gènes et d'autres molécules, l'inscrire dans une voie métabolique spécifique est aussi un des enjeux de la génomique fonctionnelle pour mieux comprendre le fonctionnement général de l'organisme.

La génomique fonctionnelle s'enrichit aussi grâce aux prédictions de fonctions issues de l'analyse de séquences par la recherche de similitudes avec d'autres séquences connues dans le même organisme (séquences paralogues) ou dans d'autres espèces (séquences orthologues), par la masse moléculaire, le point isoélectrique des protéines, s'enrichit aussi par la recherche de motifs, la comparaison dans les banques de motifs structuraux et fonctionnels, par l'identification d'isoformes (par épissages alternatifs), par la prédiction de structures 2D et 3D des protéines et par les modifications post-traductionnelles.

La protéomique est l'analyse globale des changements quantitatifs et post-traductionnels de toutes les protéines dans les cellules prenant le génome comme point de départ. Elle est aussi considérée comme l'approche post-génomique la plus importante. En effet, l'analyse de l'expression d'un gène dans la cellule par la mesure du taux d'ARNm transcrit n'est pas informative. Les données des protéines (protéome) sont souvent plus informatives. Ainsi, le défi de la protéomique consiste à trouver des moyens de mesurer les protéines actives à l'échelle du protéome et de connaître avec quels composants de la cellule elles interagissent (ADN, ARN, autres protéines et molécules).

La différence entre le génome et le protéome (tout comme le transcriptome) est que le génome est un ensemble statique de gènes (aux mutations somatiques près) alors que le protéome est dynamique et il est différent d'une cellule à une autre, d'un type tissulaire à un autre et d'un individu à un autre.

La protéomique est un champ d'application des nouvelles technologies pour analyser les profils d'expression des protéines à l'échelle du génome, comme par exemple comparer un profil d'expression dans un état physiologique versus un état pathologique. Parmi ces technologies on distingue l'analyse sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide à deux dimensions (2D-PAGE), la chromatographie, la spectrométrie de masse, la bio-informatique et les protéines 'chips'.

Il est clair maintenant que nous entrons dans une nouvelle phase 'post-séquençage' de divers organismes et que l'attention est portée sur l'identification de la fonction de chaque gène. La première étape va nous mener à la caractérisation de leurs rôles dans les diverses fonctions cellulaires. Les gènes imputent leurs fonctions à leurs produits, qui sont les protéines, qui ont comme fonction l'interaction avec d'autres molécules.

Pour arriver à cartographier ces interactions, de nouvelles approches ont été développées, *in-vivo* ou bien *in-vitro*, comme la co-immunoprécipitation en biochimie, le système du double hybride dans la levure en biologie moléculaire ou bien le phage-display, incluant le criblage à large échelle utilisant la spectrométrie de masse. Ainsi nous pourrions mieux comprendre la fonction des protéines.

Dans le cadre de cette introduction je tâcherai de résumer les principales voies de signalisation et de leurs composantes en mettant l'emphase sur les motifs protéiques qui participent à ses interactions diverses et qui somme toute amène une spécificité malgré la redondance de la structure, de motif et de fonction.

1.2 La signalisation cellulaire

Durant les deux dernières décennies nous avons accompli de grands progrès dans la compréhension des mécanismes par lesquels les signaux sont convoyés de la matrice extra-cellulaire à leur destination à savoir le cytoplasme ou bien le noyau.

Les cellules doivent être continuellement sensibles, à l'écoute et toujours disposées à répondre au moindre changement de leur environnement.

La signalisation peut être étudiée à l'échelle d'une cellule ou d'un organisme. À l'échelle de la cellule, la signalisation est cruciale dans la prise de décision pour le contrôle du métabolisme, de la division, de la spécialisation ou bien pour entrer en apoptose. A l'échelle de l'organisme, la signalisation contrôle la croissance et le développement. Il n'est pas surprenant de voir qu'un dysfonctionnement de la signalisation cellulaire conduit à des pathologies.

Les différentes cellules d'un organisme vivant reçoivent les informations nécessaires à la modulation de leur activité par l'intermédiaire de molécules extra-cellulaires. Ces dernières, que se soient des hormones, des neurotransmetteurs ou bien des facteurs de croissance, viennent la plupart du temps se lier à des protéines réceptrices qui font partie intégrante de la membrane plasmique de la cellule cible et qui vont permettre la transmission de l'information à l'intérieur de la cellule. Un autre type de molécules informatives, les hormones stéroïdiennes (2), peuvent de par leur caractère liposoluble, traverser seules la membrane plasmique pour aller se lier à des récepteurs cytosoliques. Cette liaison entraîne la translocation du complexe ligand-récepteur à l'intérieur du noyau, où il va directement moduler l'expression génique.

1.3 Les récepteurs couplés aux protéines-G (les RCPGs)

Il existe environ 200 types de RCPGs, sans compter les récepteurs olfactifs couplés aux protéines-G, dont le nombre est à lui seul estimé à 400-1000 récepteurs différents. Ces protéines présentent une structure commune à sept hélices alpha transmembranaires : l'extrémité amino-terminale de la protéine est extracellulaire, l'extrémité carboxy-

terminale est intracellulaire. On peut observer 3 boucles extracellulaires (nommées E1, E2 et E3) et 3 boucles intracellulaires (I1, I2 et I3). Ces protéines peuvent être sujettes à des modifications post-traductionnelles, de type N-glycosylation, acylation par des composés lipidiques (formant parfois une pseudo-quatrième boucle intracellulaire (I4), formation de ponts disulfures entre les chaînes latérales de 2 résidus de Cystéine. Les récepteurs couplés aux protéines G acheminent leurs signaux par l'intermédiaire de protéines hétérotrimériques, les protéines G, dont l'activation va entraîner la modulation de l'activité de différents effecteurs intracellulaires. Ces derniers peuvent être des enzymes (adénylates cyclases, GMPc phosphodiesterases, phospholipases...), des canaux ou des échangeurs ioniques (3)(4).

1.4 Variété des stimuli capables d'activer un RCPG

Des stimuli de nature très variée peuvent activer les RCPGs :

- 1- les photons (rhodopsine des bâtonnets et opsines rouge, verte et bleue des cônes)
- 2- des ions (Ca^{++})
- 3- des stimuli sensoriels (molécules olfactives, gustatives et phéromones)
- 4- des petites molécules endogènes :
 - 4.1- acides aminés (acide glutamique et gamma amino-butyrrique)
 - 4.2- amines (acétylcholine, adrénaline, noradrénaline, dopamine, histamine, mélatonine, sérotonine)
 - 4.3- nucléosides (adénosine) et nucléotides (ADP, ATP, UTP)
 - 4.5- lipides (leucotriènes, *Platelet Activating Factor*, prostaglandines, thromboxane A2)
 - 4.6- peptides endogènes
- 5- des composés exogènes :
 - 5.1- cannabinoïdes
 - 5.2- des composés impliqués dans les réactions du système immunitaire :
 - 5.3- les chimiokines
 - 5.4- les anaphylatoxines C3a et C5a du complément

6- des protéines :

6.1- hormones glycoprotéiques (thyrotropine TSH, lutropine LH, follitropine FSH, choriogonadotropine HCG)

6.2- protéases (thrombine)

L'activation d'un récepteur couplé aux protéines-G, par son ligand, entraîne un remaniement de la structure du récepteur, qui devient capable d'activer des protéines-G intracellulaires. Ces protéines-G activent à leur tour toute une série d'effecteurs intracellulaires (enzymes, canaux ioniques, transporteurs...), membranaires ou bien cytosoliques. Ces effecteurs permettent la plupart du temps, la modulation de la concentration intracellulaire de messagers secondaires (second messagers) tels l'AMPc, l'IP₃, le calcium, les diacyl-glycérols ou DAG...)

1.5 Variété des effecteurs et cibles des protéines-G

1.5.1 Les adénylates cyclases (ou adénylyl-cyclases)

Il existe à ce jour 9 isoformes connues de l'adénylate cyclase (AC). C'est une enzyme membranaire, avec 12 régions transmembranaires, qui est activée par les sous-unités de type G_sα et inhibée par celles de type G_iα. L'AC catalyse la réaction de formation de l'AMPc, qui est le second messenger produit, à partir d'ATP. Cet AMPc est l'activateur de la protéine kinase A (PKA) qui est capable de phosphoryler, et ainsi de moduler l'activité de nombreux substrats protéiques.

1.5.2 La phospholipase C

La phospholipase C est une enzyme catalysant la réaction d'hydrolyse du PIP₂ (phosphatidyl inositol bis-phosphate) en IP₃ (inositol-3-phosphate) et DAG (diacylglycérol). Elle est activée par les sous-unités de la classe G_qα. L'IP₃ est le messenger secondaire qui agit au niveau de récepteurs spécifiques, situés à la membrane des compartiments vésiculaires intracellulaires, entraînant un relargage à l'intérieur du cytosole, des ions calcium contenus dans ces vésicules. Le DAG quant à lui, active la

protéine kinase C, qui, elle aussi et tout comme la protéine kinase A, est capable de phosphoryler des protéines, afin d'en moduler l'activité.

1.5.3 La cGMP phosphodiesterase

La cGMP phosphodiesterase est l'enzyme spécifique des cellules en bâtonnet et en cône de la rétine, qui catalyse la réaction de formation du GMPc à partir du GTP. Elle est activée par les transducines G_{t1} et G_{t2} .

1.5.4 Les canaux ioniques

Certains canaux à conductance potassique ou calcique voient leur activité modulée par certaines sous-unités de la classe $G_i\alpha$.

1.6 Les récepteurs liés à des canaux ioniques

Ces récepteurs, qui fonctionnent essentiellement comme des canaux ioniques, ne sont pas reliés à une protéine G et n'agissent pas par l'intermédiaire d'un second messager. Ils possèdent tous une protéine transmembranaire composée de sous-unités qui ont pour propriété commune de traverser quatre fois la membrane; ces sous-unités délimitent un canal ionique central dont l'ouverture dépend directement du ligand: acétylcholine, GABA, glycine, glutamate, etc.

Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, présent à la jonction neuromusculaire des vertébrés, a été le premier récepteur à avoir été isolé et purifié. Il a surtout été étudié dans l'organe électrique de la torpille, où il est extrêmement abondant. Il s'agit d'un hétéro pentamère composé de chaînes α (40 kDa), β (50 kDa), γ (60 kDa) et σ (65 kDa), avec une stœchiométrie $\alpha_2\beta\gamma\sigma$. Seules les sous-unités α lient l'acétylcholine. La liaison de l'acétylcholine entraîne l'ouverture du canal central qu'entourent les cinq sous-unités, ce qui laisse passer un demi-million d'ions Na^+ en une milliseconde. La phosphorylation du récepteur augmente la vitesse de sa désensibilisation à l'action de l'agoniste, c'est-à-dire l'acétylcholine.

Le récepteur du GABA est un tétramère avec deux sous-unités α (de 53 kDa) et β (de 57 kDa). Chacune des sous-unités comporte quatre hélices transmembranaires. La liaison du GABA à la sous-unité β entraîne l'ouverture du canal à l'ion chlore, avec une fréquence qui est augmentée par les benzodiazépines, qui se lient à la sous-unité α et dont c'est sans doute le mécanisme d'action pharmacologique.

Les récepteurs de la glycine et du glutamate ont une structure analogue. En particulier, la sous-unité 48 kDa du récepteur de la glycine qui lie la strychnine. Elle a une forte analogie de séquence avec les sous-unités du récepteur nicotinique.

1.7 Les Récepteurs Tyrosine Kinases

Les récepteurs tyrosine kinase sont la seconde grande famille des récepteurs de surface.

Parmi les ligands de ces récepteurs on compte NGF (Nerve growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), FGF (Fibroblast growth factor), EGF (Epidermal growth factor) et l'insuline.

La liaison du ligand stimule l'activité protéine kinase intrinsèque de ce type de récepteurs. Le récepteur ainsi activé va ensuite enclencher une cascade d'événements qui vont permettre la transduction du signal qui va mener aux changements physiologiques cellulaires ou bien aux changements dans l'expression génique.

La voie de signalisation des RTK a un large spectre de fonctions incluant la régulation de la prolifération cellulaire, la modulation du métabolisme cellulaire, la différenciation cellulaire ainsi que la survie et la mort cellulaire.

Tous les RTK ont un domaine extracellulaire qui contient le site de liaison aux ligands, une hélice α transmembranaire hydrophobique et un domaine cytosolique avec une région possédant l'activité tyrosine kinase.

La liaison du ligand au RTK le plus souvent entraîne la dimérisation et l'auto-phosphorylation du récepteur.

La découverte de nouvelles classes de protéines kinases associées au polyomavirus, v-Src et v-abl des protéines virales transformantes, qui phosphorylent des tyrosines a suggéré immédiatement que la phosphorylation joue un rôle important dans le contrôle de la croissance (5-7). Le récepteur kinase catalyse le transfert d'un groupement phosphate

de l'adénosine triphosphate (ATP) à son substrat protéique. Les récepteurs à activité kinase sont le plus souvent modifiés par auto phosphorylation, comme chez les récepteurs aux facteurs de croissance.

La phosphorylation sur des résidus tyrosines sert de point d'ancrage à d'autres protéines qui s'assemblent pour former un complexe multiprotéique. Beaucoup de ces protéines sont considérées comme des adaptateurs moléculaires dont le rôle consiste à recruter d'autres molécules de la signalisation et ainsi à assurer la transmission du signal à l'intérieur de la cellule (8).

1.8 Les RTK , Ras et les molécules adaptatrices

Les molécules adaptatrices servent de relais dans la transduction du signal, ces protéines possèdent des domaines SH2 (Src Homology). La découverte du domaine SH2 comme étant le domaine qui reconnaît les tyrosines phosphorylées sur les RTKs a permis de comprendre et de percer le mystère par lequel les récepteurs activés pouvaient propager le signal (9).

Le domaine SH2 est le domaine le plus impliqué dans la signalisation en aval des RTKs, il reconnaît une séquence spécifique de 1 à 5 acides aminés en position C-terminale de la tyrosine phosphorylée, alors que PTB (Phosphotyrosine Binding) reconnaît une séquence spécifique de cinq acides aminés en position N-terminale de la tyrosine phosphorylée (10).

La phosphorylation des résidus sur les RTK fait intervenir des adaptateurs qui contiennent des domaines SH2 et PTB. Ces adaptateurs vont par la suite faire la liaison avec d'autres protéines de la voie de signalisation mais ceux-ci ne possèdent pas d'activité de signalisation intrinsèque. L'activation de Ras (11) se produit lorsque le RTK lie le ligand (e.g., EGF). Deux protéines cytosoliques GRB2 et Sos interviennent suite à cette liaison. Le domaine SH2 de GRB2 se lie spécifiquement au résidu(s) tyrosine(s) phosphorylé(s) sur le RTK. GRB2 contient aussi deux domaines SH3 qui lient et activent Sos. GRB2 joue ainsi un rôle d'adaptateur pour le Récepteur à l'EGF et Sos fonctionne comme un GEF (guanine nucleotide – exchange protein) qui aide la conversion de la forme Ras-GDP inactive en forme de Ras GTP active.

Le récepteur et Ras se retrouvent tous les deux à la membrane plasmique, après, Ras active une cascade de protéines kinases qui culminent par l'activation de la kinase ERK (MAP kinase) qui va directement influencer l'expression génique (12).

Les RTKs peuvent aussi stimuler des protéines à activité sérine/thréonine kinase par une voie impliquant la production de phospholipides incluant l'activation de PI3K qui va induire la production de PI-3, 4, 5-P3 (Phosphatidyl Inositol 3,4,5, TrisPhosphate). Nous savons déjà que PIP3 se lie sélectivement au domaine PH des sérines/thréonines kinases PDK1 et Akt/PKB (13) induisant leur association à la membrane cytoplasmique (14). Parmi les Sérines/Thréonines protéines-kinases, certaines sont activées par l'AMP cyclique, d'autres par le GMP cyclique. D'autres sont activées par les autres seconds messagers : Ca^{++} et diglycérides (2G). Certaines protéines-kinases sont activées par phosphorylation sous l'effet d'une autre protéine-kinase, de sorte qu'il se crée des cascades de protéines-kinases qui amplifient l'effet de phosphorylation des protéines. Dans ces cascades on retrouve aussi des adaptateurs sans activité enzymatique connue comme Grb, Nck, et Crk (15-16). La découverte des adaptateurs avec des domaines SH2 et SH3 a révélé un nouveau mécanisme par lequel les protéines de signalisation forment un complexe multiprotéique dans le cytosol ou bien associés à la membrane plasmique. Ces complexes sont formés par la liaison de régions riches en proline à des domaines SH3 des adaptateurs (17-18). Les domaines SH2 de ces mêmes adaptateurs peuvent acheminer le complexe protéique ainsi formé, près des tyrosines phosphorylées.

Ces adaptateurs moléculaires jouent un rôle de relais de l'information, ils sont capables de se re-localiser selon les besoins alors que d'autres adaptateurs peuvent aussi jouer un rôle d'échafaudage qui permet de rapprocher les protéines impliquées dans une voie spécifique pour être en contact et interagir. Les interactions décrites dans la voie de signalisation de Ras sont d'ailleurs schématiquement résumées à la figure 1.

Au chapitre 1.14 sera détaillée la super famille des GTPases Ras.

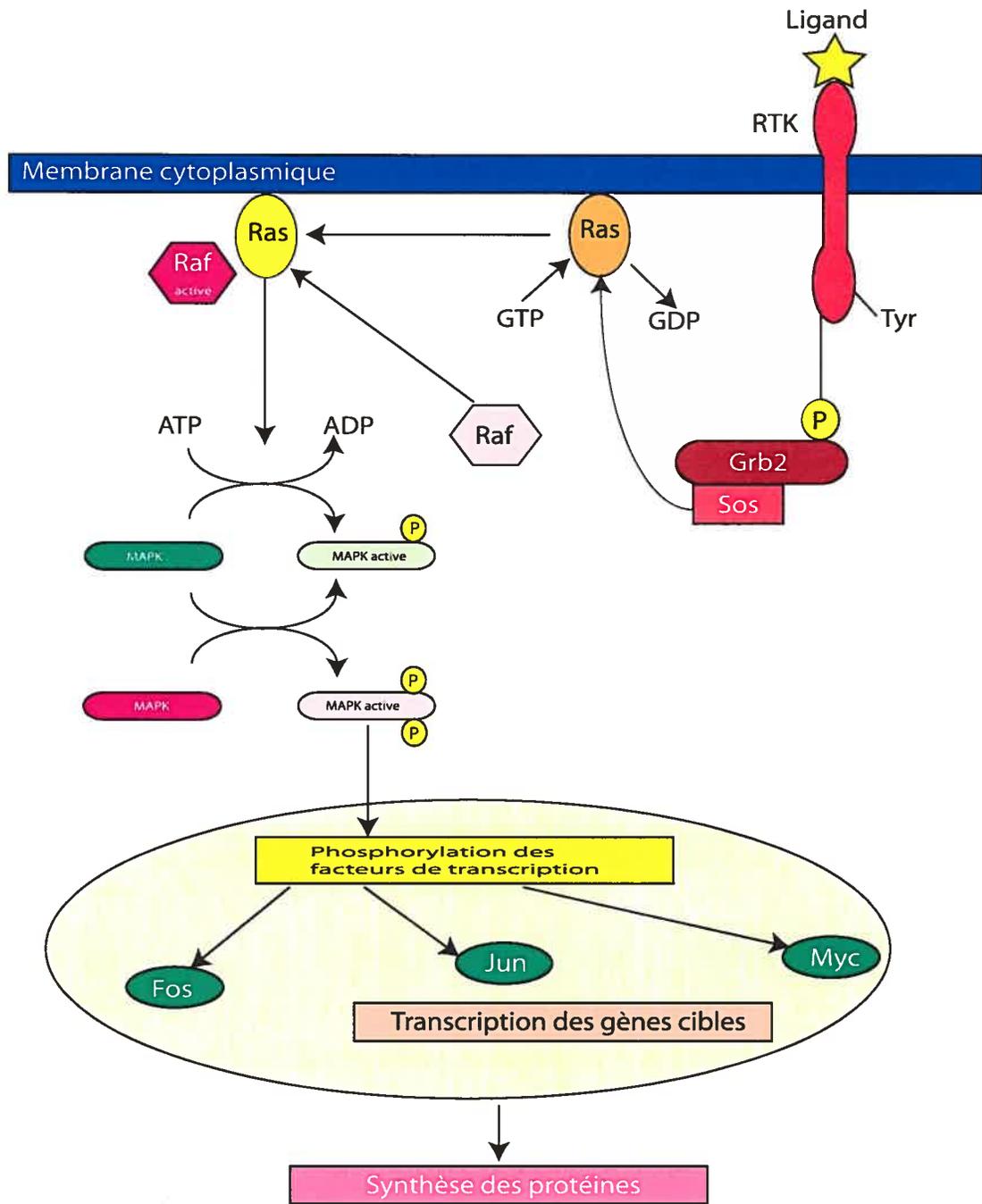


Figure1 : La voie d'activation de Ras par les récepteurs tyrosines-kinases.

Représentation schématique de la voie de signalisation par les récepteurs tyrosines-kinases. La liaison du ligand à son récepteur kinase va entraîner la phosphorylation de celui-ci, ce qui permettra le recrutement d'adaptateur comme Grb2 via sa liaison par son domaine SH2 à la tyrosine phosphorylée. Grb2 via la protéine Sos associée entraînera l'activation de Ras. A son tour, Ras recrutera et entraînera l'activation de Raf qui va engager la voie des MAP Kinases et ainsi acheminer un signal extra-cellulaire vers sa cible au niveau du noyau c'est à dire la transcription de gènes cibles. Biochemistry 2nd Ed. by Garrett & Grisham (1999)

1.8 Les adaptateurs moléculaires et leur rôle dans la signalisation

Les protéines cytoplasmiques qui acheminent le signal de la surface cellulaire jusqu'à la cible intracellulaire sont construites sous forme de modules (domaines) présentant ou non une fonction catalytique. Ces domaines sont impliqués dans les interactions entre protéines, les interactions avec des phospholipides, des acides nucléiques et des seconds messagers secondaires (AMPc, GMPc, etc...). Ces domaines jouent des rôles critiques dans la sélection et l'activation de voies de signalisation à travers leur habilité à recruter des protéines cibles et pour la régulation de la formation de complexes protéiques aux endroits adéquats (19-20).

Ces domaines en plus de contrôler la spécificité du signal, contrôlent aussi la cinétique de la réponse cellulaire à des stimuli extra ou intracellulaires. Il est évident maintenant que les interactions protéine-protéine spécifiques jouent un rôle essentiel dans la réponse cellulaire comme : le trafic cellulaire, le cycle cellulaire, l'expression génique, les réparations de l'ADN, le contrôle du réarrangement du cytosquelette et la dégradation de protéines cibles. Ce sont des réponses spécifiques aux signaux externes acheminés par la grande diversité des récepteurs membranaires à l'intérieur de la cellule.

1.8.1 Les domaines SH2/PTB

Les domaines d'interaction des protéines semblent destinés pour reconnaître des motifs exposés par leurs partenaires d'interaction, ceci s'applique à la grande famille des protéines à domaines SH2 et PTB (21-27) qui reconnaissent des modifications post-traductionnelles de séquence, comme les phosphotyrosines.

Le domaine SH2 est un module de 100 acides aminés qui lie spécifiquement les peptides contenant des tyrosines phosphorylées (pY). Le domaine SH2 conventionnel possède une poche conservée qui reconnaît les pY et une autre variable qui reconnaît un motif de 3 à 6 acides aminés en position C-terminale aussi bien qu'en position N-terminale des résidus tyrosines phosphorylés suggérant ainsi un modèle alternatif de liaison.

Le domaine PTB (Phosphotyrosine binding) est un module de 100 acides aminés qui lie communément les tyrosines phosphorylées dans un motif Asn-Pro-X-Tyr.

Le domaine PTB des protéines d'échafaudage comme Shc et IRS-1 requiert la présence d'un motif spécifique pour lier la tyrosine phosphorylée (NPXpY).

La figure 2 illustre quelques exemples de protéines comportant un domaine SH2.

1.8.2 Les domaines FHA, WD40, 14-3-3

Les domaines FHA, WD40, 14-3-3 reconnaissent les phosphosérines/thréonines (28), les bromo et chromo domaines reconnaissent des lysines acétylées et méthylées (29-30).

Le domaine associé à forkhead (ForkHead Associated domain) a été identifié pour la première fois chez les Eucaryotes dans le facteur de transcription Forkhead (Fkh). C'est un domaine long de 64 à 100 acides aminés qui contient des résidus clés très conservés, il reconnaît les protéines phosphorylées par les sérines/thréonines kinases.

La protéine 14-3-3 est un polypeptide de 30 kDa avec neuf membres connus chez les mammifères. Ils sont impliqués dans la régulation de diverses voies de signalisation et dans la transmission de signaux intracellulaires, l'apoptose, et le cycle cellulaire. Les protéines 14-3-3 forment des dimères et des hétérodimères qui se lient à leurs partenaires. Ces protéines 14-3-3 jouent également un rôle dans l'exportation de partenaires du noyau vers le cytoplasme.

WD40 est un domaine qui se retrouve de façon répétée sur les protéines des Eucaryotes. Ces protéines couvrent une grande variété de fonctions incluant celle d'adaptateur, régulateur dans la transduction du signal, l'assemblage du cytosquelette et le contrôle du cycle cellulaire. Les domaines WD40 de b-TRCP et Cdc4 sont impliqués dans la reconnaissance de peptides contenant des phospho-sérines et thréonines, il a aussi démontré que les domaines WD40 forment des structures en hélices β qui servent dans la reconnaissance des phospho-peptides.

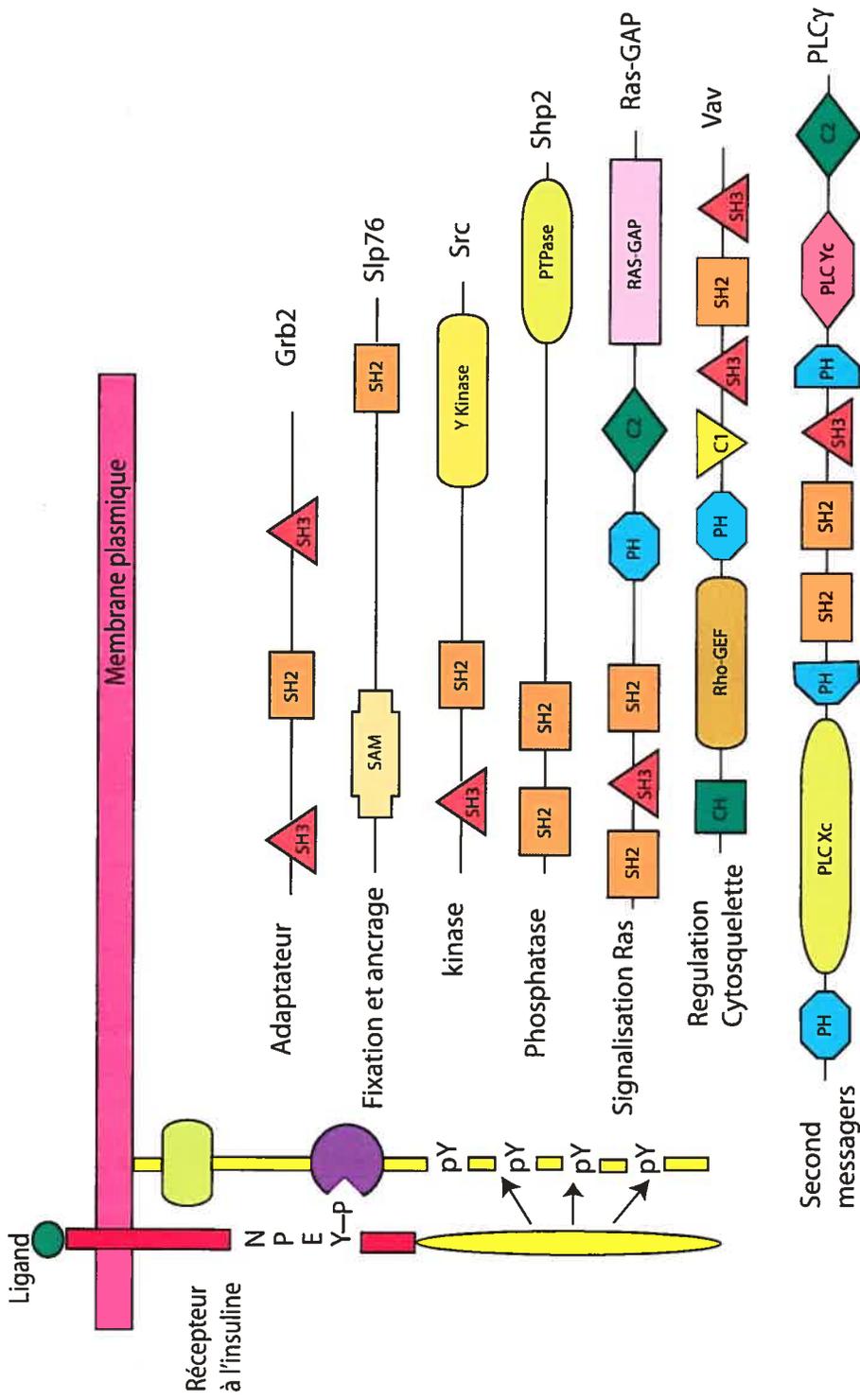


Figure 2. Représentation schématique de quelques domaines appartenant à des protéines qui sont impliquées dans la signalisation.
 Ici un exemple de protéines avec un domaine SH2. Ces domaines sont retrouvés dans une grande variété de protéines chez les métazoaires. Ces protéines possèdent de multiples fonctions et sont impliquées dans divers processus biologiques.

1.8.3 Les domaines SH3, WW et EVH1

Les domaines SH3, WW et EVH1 reconnaissent des séquences riches en proline (31) et les domaines PDZ se lient aux deux derniers acides aminés (en général une valine ou bien une isoleucine) à l'extrémité C-terminale des protéines. On distingue aussi une famille de protéines spécialisées dans la liaison aux phospholipides (PI) ce sont les protéines à domaines PH, FYVE, PX et ENTH (32-33).

Le domaine SH3 (Src homology domain) est un motif de 80 à 100 acides aminés. Ce domaine se lie aux séquences consensus riches en prolines (Pro-X-X-Pro). Chaque paire de proline aliphatique se lie à une poche hydrophobique dans le domaine SH3. La liaison des domaines SH3 à ces motifs riches en prolines a été analysée par différentes approches, entre autre, la résonance magnétique nucléaire et l'analyse cristallographique. Ces études ont permis de classer les domaines SH3 en deux classes : les domaines de la classe I qui reconnaissent respectivement les motifs RKXXpXXp et les domaines de la classe II qui reconnaissent le motif PXXPXR (34-35).

EVH-1 et 2 (WH1 et WH2 = WASp homology domain) sont deux protéines qui possèdent un autre domaine conservé qui lie les motifs riches en proline (36). On retrouve ce domaine dans les protéines du cytosquelette de la famille WASp (Wiskott-Aldrich Syndrome protein) (37). Cette protéine est absente dans le syndrome de Wiskott Aldrich, qui est une pathologie qui provoque une déficience du système immunitaire. Las17p (38) est l'homologue de WASp chez la levure qui joue un rôle dans le ré-arrangement du cytosquelette d'actine. L'organisation des différents domaines de WASP est représentée à la figure 3.

WASP (WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN)

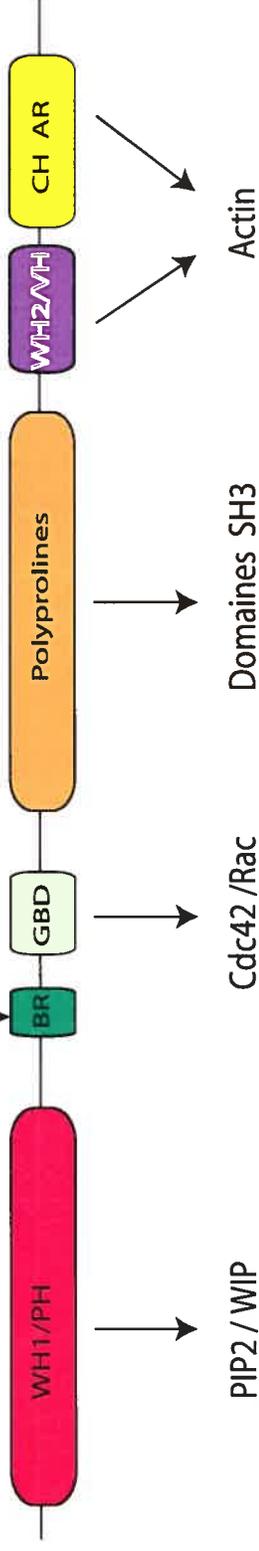


Figure 3. Organisation des domaines de la protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein). Les différents domaines jouent chacun un rôle différent. WASP est repliée sur elle-même lorsqu'elle est inactive. Le domaine CH/AR se replie et vient se lier à la région BR qui est une région riche en acides aminés basiques. La région centrale riche en prolines permet le recrutement et la liaison aux protéines qui possèdent un domaine SH3.

1.9 La cytokinèse

La cytokinèse est le processus cellulaire par lequel les cellules Eucaryotes se divisent après la mitose pour donner deux cellules filles (39). Ce processus nécessite la formation d'un fuseau d'actine pour parachever la division correcte du matériel génétique. La cytokinèse a été bien documentée chez *Schizosaccharomyces pombe*, avec la découverte d'une protéine Imp2 de la famille PCH/FCH qui est impliquée dans le processus de septation. Il consiste en l'assemblage de l'anneau de fibre d'actine primaire au milieu de la cellule durant la phase M (40).

1.9.1 Le domaine PCH/FCH

Aussi connu sous le nom de RAEYL ou bien domaine Cdc15 (Cell division control 15) (41) en N-terminale de Cdc15p *S. pombe*. Ce domaine a été décrit pour la première fois dans Cdc15p chez *Schizosaccharomyces pombe*. Après le début de la mitose, il forme une structure en anneau et se retrouve au même endroit que l'anneau d'actine médian. Il se pourrait que ce domaine soit impliqué dans le ré-arrangement du cytosquelette qui est requis durant la cytokinèse. On le retrouve aussi dans les protéines tyrosines kinases où il joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et dans les protéines Rho-GAP où il inhibe l'organisation des fibres de stress chez *Homo sapiens sapiens*. L'organisation de la structure secondaire du domaine PCH de Cdc15p de *S. pombe* est illustrée à la figure 4.

1.9.2 Quelques membres de la famille des protéines à domaine PCH/FCH et leurs rôles biologiques

Cette famille compte plus d'une cinquantaine de membres. Les protéines de cette famille jouent un rôle dans la cytokinèse et la distribution de l'actine. Elles possèdent un domaine PCH (Pombe Cdc15 Homology) / FCH (Fer/Fes Cip4 Homolgy) en position N-terminale (42), une région centrale coiled-coil et un ou deux domaines SH3 en position C-terminale. Quelques exemples d'organisation des protéines de la famille PCH sont représentés à la figure 5.

1.9.3 Imp2

Imp2 code pour une nouvelle protéine impliquée dans la machinerie de la septation chez la levure *S. pombe*. Cette protéine montre des homologies avec un membre de la même famille PCH/FCH, dont l'organisation des domaines est identique et qui inclut Cdc15p (43). La protéine Imp2 joue un rôle dans la formation du septum. Le gène *Imp2* n'est pas essentiel à la survie et à la croissance de la cellule. Par contre sa délétion entraîne de multiples défauts de septation et de formation des deux cellules filles.

D'autres protéines de structures identiques existent dans d'autres organismes. On les retrouve dans les mêmes compartiments cellulaires, font partie de la structure du cytosquelette et ont la même fonction ce qui suggère que celles-ci aient été conservées durant l'évolution (44).

1.9.4 PSTPIP

PSTPIP est une protéine associée au fuseau mitotique qui interagit avec une protéine tyrosine phosphatase PTP HSCF chez la souris (44, 45). FAP52 est une autre protéine de la famille PCH/FCH chez le poulet qui montre peu d'homologie de séquence en acides aminés mais une structure identique par rapport aux deux autres protéines citées plus haut (Cdc15p et Imp2p), est co-localisée avec Vinculine, Paxine et Taline et des protéines connues comme faisant partie du cytosquelette d'actine (46-47). Plus récemment d'autres

protéines comme PACSIN2 et Syndapine II, ont été identifiées (48-53). Toutes ces protéines partagent un domaine conservé PCH/FCH en position N-terminale suivi par une région centrale coiled-coil et un domaine SH3 en position C-terminale. FAP52, PACSIN2, Syndapin II, sont toutes largement exprimées dans différents tissus (54-56).

1.9.5 Les protéines Cyk2 et Cdc15 jouent un rôle dans la cytokinèse

Cyk2, une autre protéine de la famille PCH/FCH, a été caractérisée lors d'une étude sur la cytokinèse chez la levure *S. cerevisiae*. Elle interagit avec l'anneau d'actomyosine. La protéine Cyk2p, est l'homologue de Cdc15 de la levure *S. pombe* (57).

Cdc15p est une phosphoprotéine qui contient une région centrale coiled-coil, un domaine PEST et un domaine SH3 en position C-terminale (58). Cdc15 (Cell division control 15) joue un rôle dans la formation et l'assemblage de l'anneau d'actomyosine chez *S. pombe*. Cet assemblage requiert deux voies indépendantes impliquées dans la nucléation de l'actine, une des voie dépend du complexe Arp2/3 et l'autre voie fait intervenir un autre joueur qui est Cdc12p. Un modèle a été proposé dans lequel Cdc15 se lie directement au complexe Arp2/3 et Myo1p ce qui expliquerait pourquoi le recrutement du complexe Arp2/3, Myo1p et l'actine ne s'est pas fait chez le mutant $\Delta cdc15$. Cdc15p se lie directement à Cdc12p et ces deux protéines sont nécessaires à la localisation de l'anneau d'actomyosine durant la cytokinèse. Ces deux protéines interagissent également durant la nucléation de cet anneau avant la formation du CAR (Cytokinetic actin ring). La rupture de l'interaction entre ces deux partenaires dans les cellules mutées semble être la raison de la disparition de l'anneau d'actine durant la cytokinèse chez *S. pombe*. Il semblerait donc que Cdc15p joue un rôle critique dans le recrutement et la coordination des voies de signalisations impliquées dans l'assemblage, la localisation des filaments d'actine et la construction du fuseau d'actomyosine durant la cytokinèse (59).

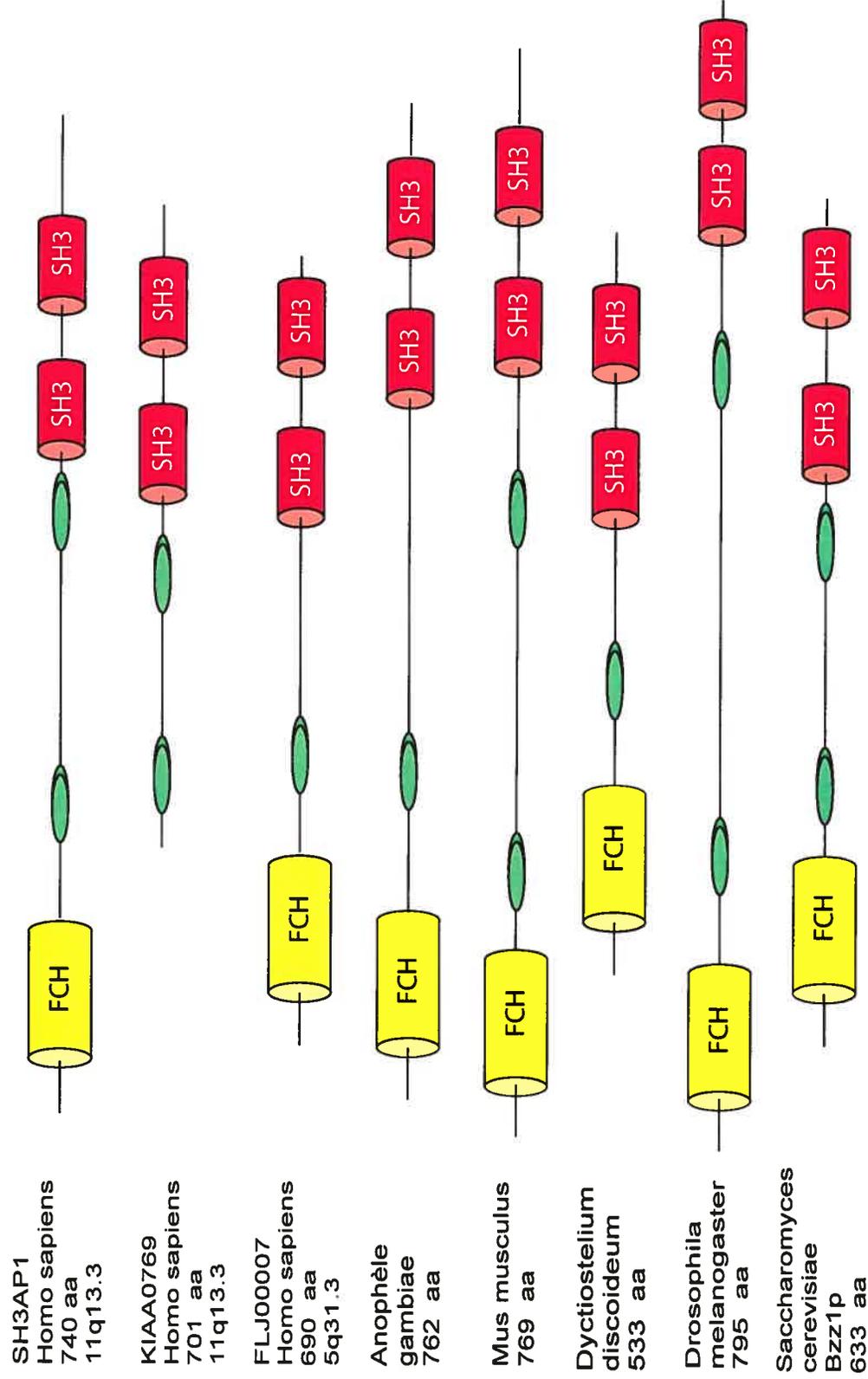


Figure 5. Organisation des domaines des protéines membres de la famille PCH chez les métazoaires. Ces quelques membres cités partagent un pourcentage d'identité de structure de 40 %. L'organisation structurale des domaines est identique et certains de ces membres jouent un rôle biologique dans le ré-arrangement du cytosquelette d'actine.

1.9.6 Les interactions entre PSTPIP, PSTPEST et WASP et leurs rôles biologiques

D'autres protéines de la famille PCH/FCH ont été identifiées. PSTPIP1 chez la souris a été caractérisée comme étant le substrat de la protéine tyrosine phosphatase PTP-PEST. Ces deux protéines ont été retrouvées dans le même compartiment cellulaire *in vivo* et interagissent directement via le domaine PCH/FCH de PTP-PEST qui se lie à la région coiled coil de PSTPIP. Il a été mis en évidence que PSTPIP pouvait être phosphorylée sur un résidu tyrosine en position 344 en réponse à une stimulation à l'EGF et PDGF. Il a été démontré que PTP-PEST déphosphoryle PSTPIP sur la tyrosine à la position 344. De plus PSTPIP sert d'échafaudage entre PTP-PEST et WASP(60).

Des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré que PSTPIP peut former des oligomères (61). PSTPIP, l'homologue de la protéine Cdc15 chez les mammifères est impliquée dans la ré-organisation du cytosquelette (62). Il a été rapporté que PSTPIP est associée à l'actine corticale durant le cycle cellulaire et que la translocation de PSTPIP a lieu durant la cytokinèse dans le sillon de clivage (63). Il est intéressant de noter que toutes ces protéines ont un domaine SH3 localisé en position C-terminale et que ce domaine est impliqué dans l'interaction avec WASP et/ou N-WASP. On sait déjà que les protéines WASP et N-WASP interagissent et activent Arp2/3 qui est impliquée dans l'activation et la nucléation de l'actine (64-74) comme illustré aux figures 6 et 7.

1.9.7 L'interaction de Cip4 avec WASP et régulation de la structure du cytosquelette

En utilisant le système du double hybride chez la levure pour l'étude d'un mutant de Cdc42, un ADNc codant pour une protéine de 545 acides aminés, Cip4 (Cdc42 interacting protein-4), a été identifié comme étant un partenaire d'interaction de Cdc42. Cip4 possède un domaine PCH/FCH en position N-terminale et un domaine SH3 en position C-terminale. CIP4 montre des similarités avec des protéines impliquées dans la signalisation et la régulation du cytosquelette d'actine (75).

Dans une autre étude il a été montré que CIP4 interagit avec WASP et que cette interaction implique la région riche en proline de WASP avec le domaine SH3 de CIP4.

Le segment riche en proline de WASP interagit aussi avec d'autres protéines contenant des domaines SH3 qui sont impliquées dans la régulation de la structure du cytosquelette. Parmi ces protéines, on distingue des adaptateurs comme Nck (76-78), les kinases de la famille Src et la phospholipase C γ (79-80). Il a été montré que WASP interagit directement avec l'actine via le domaine VHD (verpoline homology domain) (81). Chez la levure, Bee1p associée à Las17p (Las17p est l'homologue de WASP chez l'humain) interagissent avec le complexe Arp2/3 qui est la clef de la polymérisation de l'actine (82-83). D'après toutes ces études, il apparaît que les membres de cette famille de protéines à domaine PCH jouent un rôle dans le ré-arrangement du cytosquelette et de la polymérisation de l'actine par le recrutement d'autres protéines comme il est illustré aux figures 6 et 7.

1.9.8 L'interaction entre WASP et Cip4 ne nécessite pas Cdc42

Dans une autre étude, la protéine WASP a été utilisée comme appât dans le système du double hybride chez la levure et a conduit à l'identification d'une protéine Cip4 (Cdc42 interacting protein-4). L'interaction entre les deux protéines a été par la suite mieux caractérisée et implique la région riche en proline de WASP qui interagit avec le domaine SH3 de Cip4. Cependant cette interaction n'impliquait pas l'intervention de Cdc42, car cette même étude a démontré lors d'une expérience effectuée dans les cellules COS7 après co-transfection de CIP4 et WASP-GFP que ce complexe lie les microtubules via la partie N-terminale (domaine PCH/FCH) de Cip4.

En parallèle, l'étude a aussi montré que la région de Cip4 qui lie Cdc42 implique les acides aminés en position 383-417.

La mutation I398S abolissait la liaison de Cip4 à Cdc42 et la délétion de cette région (aa 383-417) de Cip4 n'abolissait pas la liaison de Cip4 avec WASP et leur co-localisation avec les microtubules. Ceci suggère que Cip4 facilite le transport de WASP et que cette liaison ne nécessitait pas d'interaction avec Cdc42 (84, 85).

Les différents domaines d'interactions de Cdc42 et de WASP sont représentés schématiquement à la figure 6.

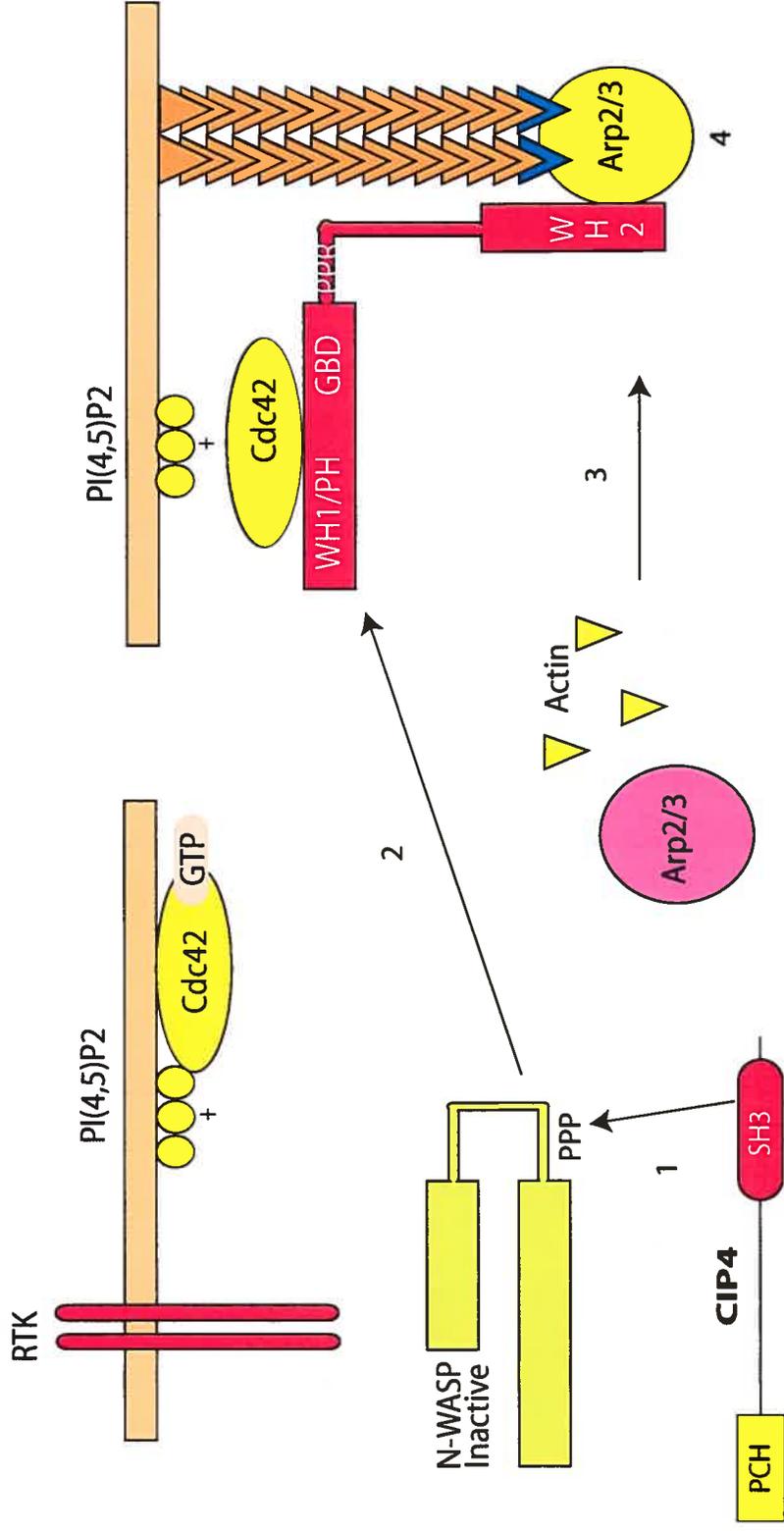


Figure 6. Rôle de WASP dans la nucléation de l'actine. Représentation schématique du rôle que joue Cdc42 et WASP dans la nucléation de l'actine. Cip4 se lie par son domaine SH3 à la région riche en proline de WASP. La protéine Cip4 recrute et achemine WASP vers la membrane plasmique pour permettre sa liaison à Cdc42. Cette association permet la libération du domaine WH2 qui va recruter le complexe Arp2/3 qui va par la suite entamer la nucléation de l'actine et la formation de fibres de stress.

La Tian & al, J. Biol. Chem. 2000 275: 7854-7861

1.9.9 La régulation de la polymérisation de l'actine dans les lymphocytes T implique WASP, Cdc42 et Vav-1

Il a été montré que l'activation de WASP au niveau du site d'interaction des cellules T et des cellules présentatrices d'antigène (APC), se faisait en deux étapes. La première étape est le recrutement de Cdc42 par WASP via sa région riche en prolines et de son activation qui est dépendante de sa liaison au GTP. La deuxième étape est le recrutement de WASP par Nck à l'aide du domaine SH3 de celle-ci. Par contre, l'activation de WASP requiert Vav-1.

Dans les cellules T déficientes en Vav-1, le recrutement de WASP se fait normalement, mais la localisation et l'activation de Cdc42 et de WASP est interrompue. Le recrutement et l'activation de WASP sont coordonnées par les tyrosines phosphorylées. SLP-76, qui fonctionne comme un échafaudage, rapproche Nck et WASP à proximité de Vav-1 et Cdc42-GTP (86). Cet ensemble forme la voie de signalisation qui va du TCR à l'activation de WASP. La figure 7 nous résume cette voie de signalisation.

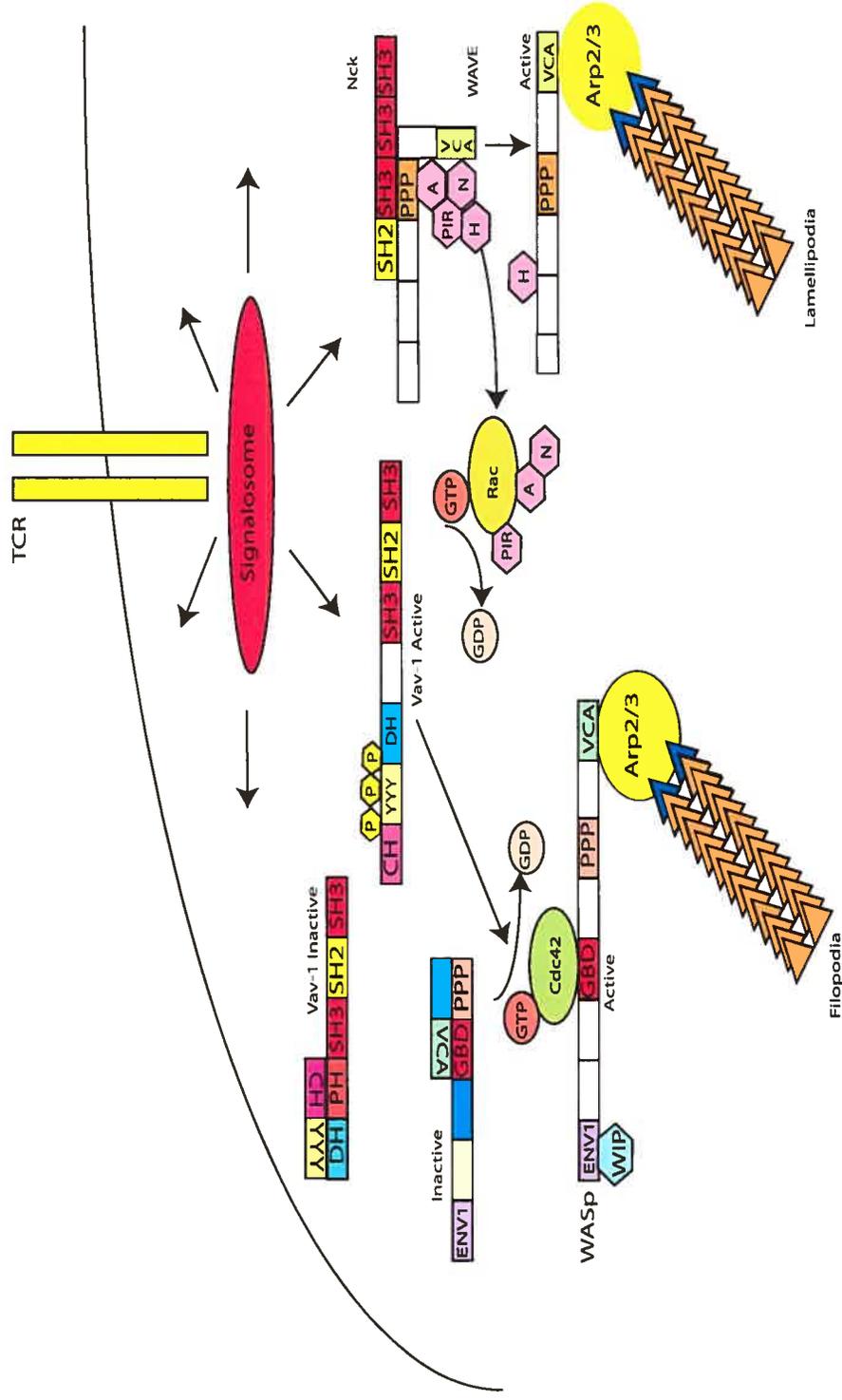


Figure 7 : Modèle de la régulation de la polymérisation de l'actine. Représentation schématique de la voie de régulation de la polymérisation de l'actine dépendante de Rho, Rac, Cdc42, Vav-1, WASP et WAVE. Ce modèle représente l'engagement du récepteur des lymphocytes T (TCR) qui va initier une cascade de signalisation cellulaire impliquant la tyrosine kinase Lck et le signalosome LAT/SLP76. La phosphorylation de la boucle acide de Vav-1 va lever l'auto inhibition du domaine catalytique de Vav-1 (DH) qui est responsable de l'activité d'échange GTP-GDP. Ceci va mener à l'activation de Cdc42 et de Rac. En conséquence, Cdc42-GTP se lie au domaine GBD (GTPase Binding Domain) de WASp et permet la libération du domaine VCA de WASp et ainsi va induire le recrutement du complexe Arp2/3 et l'actine. Dans une autre voie alternative, WAVE induit la polymérisation de l'actine suivant la voie de Rac-GTP qui médie la dissociation du complexe inhibiteur composé de PIR21, NAP125, ABI2 et HSPC3000. WAVE libre va activer le complexe Arp2/3 via le domaine VCA et initier ainsi la polymérisation de l'actine.

Zeng R & al, J Immunol. 2003 Aug 1;171(3):1360-8

1.9.10 Le rôle de Cdc42, Las17p et Bzz1 dans la régulation de la polymérisation de l'actine

Une autre étude chez la levure a montré que Cdc42 recrute et active le complexe Bee1/Las17p, Arp2/3 et Myosine I (Myo3p et Myo5p), aboutissant à la formation et à l'assemblage des filaments d'actine, à savoir que Las17p est l'homologue de WASP chez la levure (87). Il est aussi à noter que Bzz1p, une protéine de la famille PCH/FCH, possédant un domaine PCH/FCH en position N-terminale et deux domaines SH3 en position C-terminale, interagit avec la Myosine de type I (88). En effet, une étude menée pour identifier d'autres facteurs impliqués dans le complexe Arp2/3/ Las17p/ Myosine I/ Bee1p, chez la levure en utilisant le système du double hybride a permis de caractériser Bzz1p/Lsb7p (Las Seventeen Binding protein-7) comme un nouveau partenaire de ce complexe. Bzz1p (Lsb7p) interagit avec Las17p par l'intermédiaire de son domaine SH3. La délétion de *BZZ1* n'est pas létale; par contre la délétion simultanée de *BZZ1*, *MYO3* et *MYO5* l'est. De plus, la sur-expression de Bzz1p chez la levure inhibe la croissance cellulaire, alors que le double mutant *bzz1Δ* et *myo5Δ* est incapable de restaurer la polarisation de l'actine après un stress au chlorure de sodium. Il est à noter que Bzz1p est capable de recruter la machinerie de la polymérisation de l'actine grâce à ses domaines SH3. Ses interactions avec Las17p, Vrp1p et Myosine de type I sont essentielles à ce processus, ce qui suggère que Bzz1p pourrait être impliqué dans la régulation de la polymérisation de l'actine (89).

1.10 Le projet

1.10.1 Historique

Dans le cadre de mon projet je devais compléter la caractérisation de la protéine SH3AP1, aussi considérée comme un membre de la famille PCH/FCH. SH3AP1 a été isolée dans notre laboratoire lors d'une étude précédente qui portait sur la caractérisation de partenaire de hPTP1E, une phosphatase également isolée dans notre laboratoire (90-91) (Figure 8). SH3AP1 a été localisée au niveau du cytoplasme des cellules de mammifères. Il a été démontré lors d'études précédentes avec le système du double hybride de la levure que SH3AP1 interagissait avec la protéine WASP (Julie Champagne, Denis Banville, résultats non publiés). Ces résultats nous ont permis de supposer que SH3AP1 pouvait jouer un rôle dans le réarrangement du cytosquelette et ainsi nous avons poursuivi l'étude afin d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction. Nous avons aussi trouvé par Northern blot que SH3AP1 était sur-exprimée dans les tissus de poumons et dans la glande mammaire (Figure 9), ce qui explique le choix d'utiliser les bibliothèques d'ADNc issues de ces tissus pour ce projet.

1.10.2 Objectif

Afin de compléter la caractérisation de SH3AP1 dans un contexte biologique, mon objectif était de déterminer le rôle des deux tyrosines de SH3AP1 lorsque celles-ci sont phosphorylées, d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction moléculaire en utilisant le système du double hybride chez la levure en criblant des bibliothèques de cDNA et par la suite de confirmer ces interactions dans les cellules de mammifères.

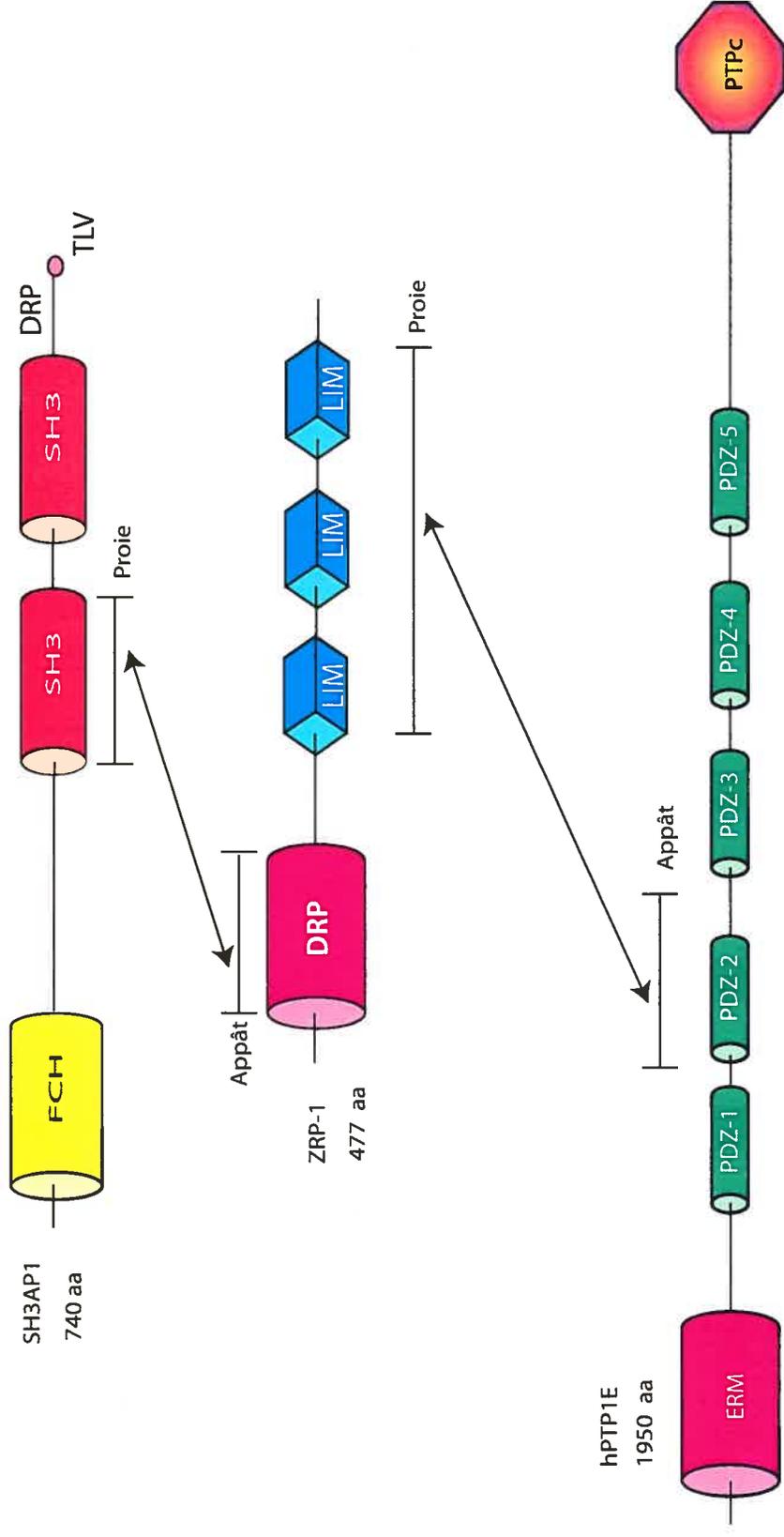


Figure 8. La stratégie utilisée dans le système du double hybride chez la levure. Pour trouver les partenaires d'interaction de hPTP1E, le second domaine PDZ de celle-ci a servi d'appât pour repêcher entre autres ZRP-1. Par la suite, le DRP (Domaine riche en proline) de ZRP-1 a servi d'appât dans le système du double hybride chez la levure pour repêcher SH3AP1. Les interactions retrouvées sont représentées par des segments et des flèches colorées en noir.

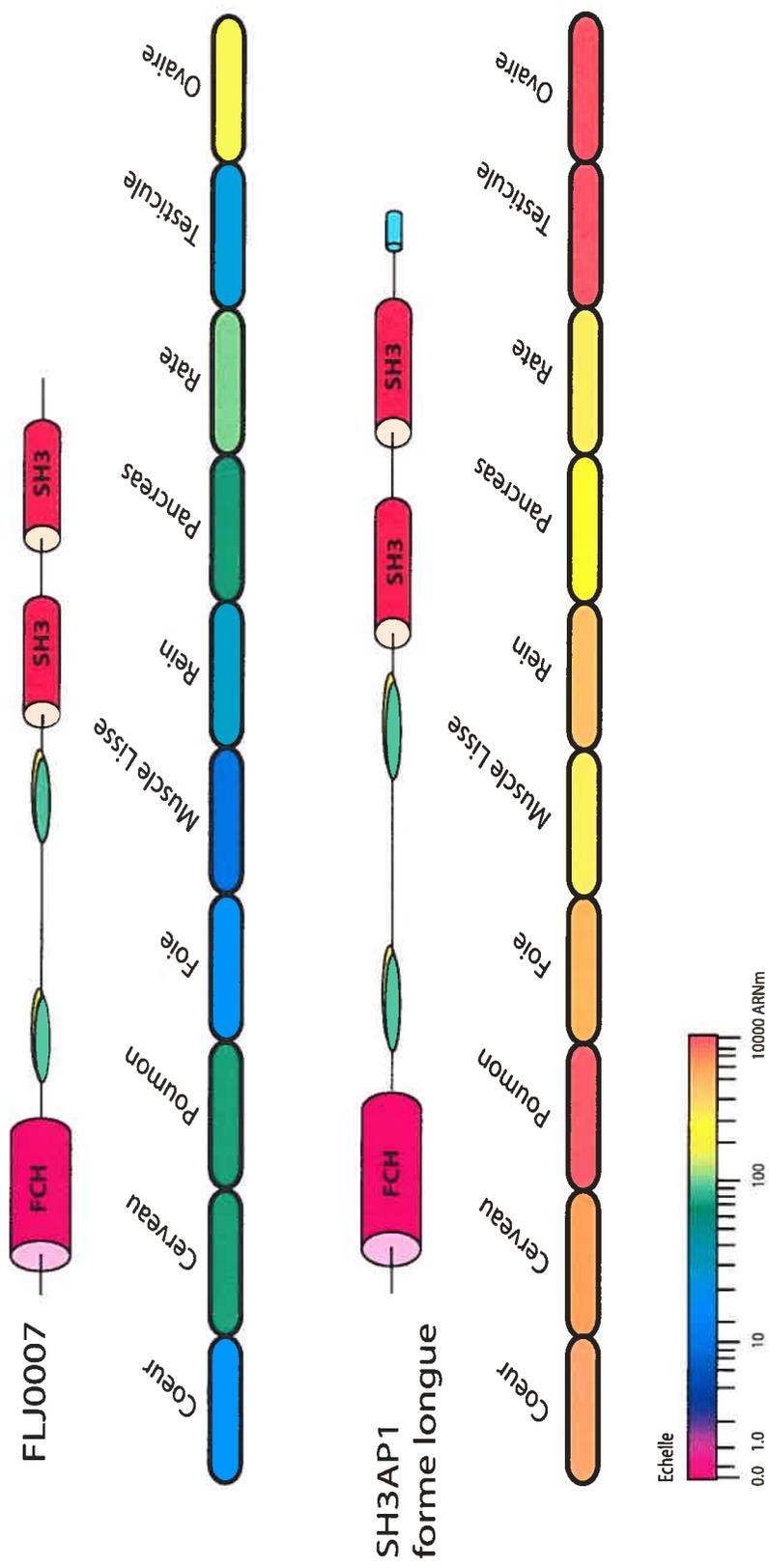


Figure 9. Schéma du profil d'expression de SH3AP1 et de FLJ0007 dans plusieurs tissus par RT-PCR-ELISA. SH3AP1 est fortement exprimée par rapport à FLJ0007 et ce dans tous les tissus analysés. Ces deux protéines partagent en moyenne 38% d'identité de séquence et sont codées chacune par un gène différent et porté par un chromosome différent (Ch 11 pour SH3AP1 et Ch 5 pour FLJ0007).

1.10.3 hPTP1E

hPTP1E est une protéine tyrosine phosphatase de 2490 aa codée par un ARNm de 8.5 kb. Il existe deux classes de PTPases : les tyrosines phosphatases réceptrices et les tyrosines phosphatases non-réceptrices. hPTP1E appartient à la deuxième classe. Son domaine catalytique lui confère une activité de tyrosine phosphatase qui lui permet de déphosphoryler certains résidus tyrosines sur d'autres protéines (90-91).

1.11 Les différents domaines de hPTP1E

1.11.1 Le domaine ERM

hPTP1E possède un domaine B4.1, cinq domaines PDZ et un domaine catalytique PTP en position C-terminale. Le domaine B4.1 (Band 4.1 homologues), aussi connu sous le nom de ERM, a été désigné ainsi d'après trois protéines murines chez lesquelles ce domaine est conservé, soit l'eitrine (92-93), la radixine et la moésine (94-95).

On retrouve ce domaine dans des protéines associées au cytosquelette à l'interface entre la membrane plasmique et le cytosquelette où il est impliqué dans l'ancrage de ces protéines à la membrane plasmique. Ces protéines sont notamment impliquées dans les voies de signalisation de Rho et PI3-kinase/Akt (96) (Figure 8).

1.11.2 Les domaines PDZ

Les domaines PDZ ont été nommés d'après trois protéines différentes dans lesquelles ils ont d'abord été identifiés. Ces trois protéines sont PSD-95 (mammalian postsynaptic density protein 95 kDa) (97) Dlg (drosophila discs-large protein) (98) et ZO-1 (mammalian Zonula occludens protein 1) (99). Ils sont parfois appelés domaines DHR (Discs-large Homology Region) (100) ou encore domaines GLGF (101) car cette séquence de quatre acides aminés est souvent présente à l'intérieur de ces domaines. Il a été observé que chacun de ces domaines PDZ peut avoir une spécificité différente dans ses liaisons avec d'autres protéines. Chaque domaine a le potentiel d'interagir avec des protéines différentes. Ceci offre la possibilité aux protéines à domaines PDZ de participer

à la formation d'importants complexes de protéines hétérogènes en servant d'échafaudage sur lequel les autres protéines viennent s'accrocher (102-103). Ils peuvent aussi reconnaître certaines séquences très courtes situées à l'extrémité carboxy-terminale, représentée par (S/T)X(V/I), où X peut être n'importe quel acide aminé (104). Le dernier acide aminé de l'extrémité C-terminale du ligand est le plus souvent une valine ou une isoleucine (Figure 8).

1.11.3 Le domaine PTPc

PTPc (Protein tyrosine phosphatase) est le domaine catalytique de hPTP1E, il est impliqué dans la réaction de déphosphorylation des résidus tyrosine phosphorylés par les kinases. Le groupement phosphate attaché au résidu tyrosine est enlevé par une réaction enzymatique (Protéine Tyrosine Phosphate + H₂O = Protéine tyrosine + Pi). Les phosphatases sont des enzymes qui jouent un rôle important dans le contrôle de la division et la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation et la transformation.

1.12 Identification des partenaires de hPTP1E

Pour identifier les partenaires d'interaction de hPTP1E, un des domaines PDZ a été utilisé comme appât dans le système du double hybride pour cribler la librairie de cDNA de tissus de poumons humains. Cette approche a permis d'identifier ZRP-1 (Zyxin-Related Protein) (105). La protéine ZRP-1 possède trois domaines LIM à son extrémité C-terminale ainsi qu'une région très riche en proline, composée à 20.5% de cet acide aminé, à son extrémité N-terminale ce qui lui permet de se lier, entre autres, aux domaines SH3.

Dans le but de caractériser ZRP-1, la partie N-terminale (riche en proline) de celle-ci, a été utilisée comme appât dans le système du double hybride de la levure et a été utilisée pour cribler la librairie de cDNA de cellules HeLa et c'est ainsi que le domaine SH3 de SH3AP1 a été repêché, identifié en même temps que d'autres protéines. Le clonage de la protéine complète de 541 acides aminés a permis d'établir que SH3AP1 possède, en plus du domaine SH3 à son extrémité carboxy-terminale, un domaine PCH/FCH à son

extrémité amino-terminale. Des recherches dans les banques de données ont démontré qu'il existe une autre forme de cette protéine obtenue par épissage différentiel du même gène. Cette forme plus longue et plus abondante que la première comprend 740 acides aminés et possède un deuxième domaine SH3 situé en aval du premier. La partie C-terminale de SH3AP1 contient 2 tyrosines phosphorylées lorsque les cellules sont stimulées par l'addition de sérum ou par Src, ainsi qu'une région riche en prolines. Cette région se termine également par trois acides aminés TLV qui constituent une séquence consensus pour les domaines PDZ (Figure 8).

1.13 Organisation génomique de SH3AP1 humain

1.13.1 SH3AP1

SH3AP1 est codée par un gène de 343 kb situé au locus 11 q13.4. La séquence codante de SH3AP1 est répartie sur 20 exons (Figure 10). Ce gène par épissage différentiel code pour deux protéines de poids moléculaires différents. La forme courte de 541 acides aminés est encodée par un gène de 16 exons et possède un seul domaine SH3 en position C-terminale. Cette protéine est exprimée dans tous les tissus testés (Figure 9). La forme longue de 740 acides aminés codée par le même gène de 20 exons, possède deux domaines SH3 en position C-terminale en plus d'une séquence riche en proline contenant aussi des tyrosines phosphorylées. Voir la figure 11 pour l'organisation des domaines respectifs de SH3AP1 ainsi que la figure 12 qui représente la séquence codante.

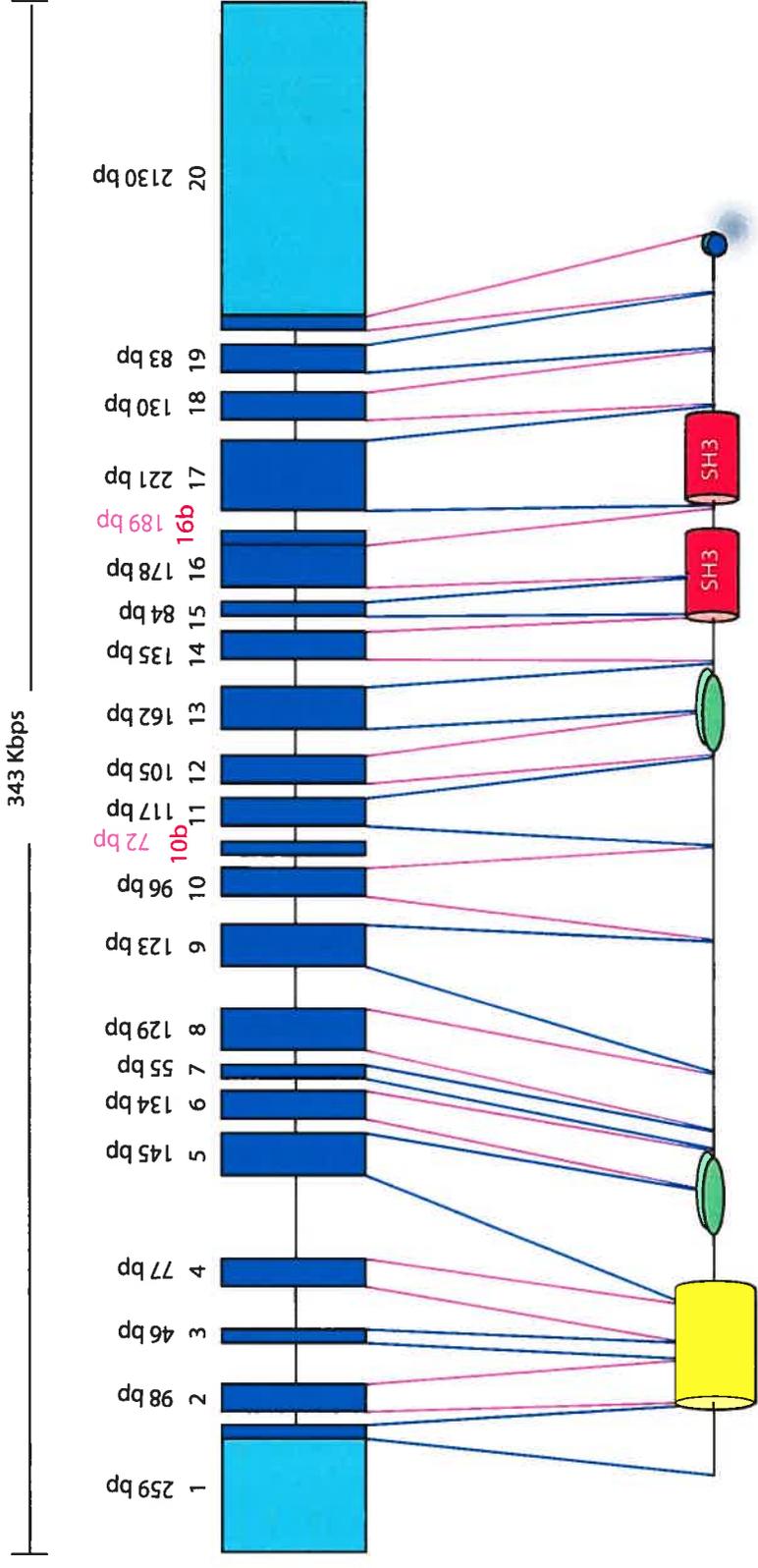


Figure 10. Organisation génomique du gène de SH3AP1. Le nombre et la taille des exons sont montrés au-dessus du gène. La partie colorée en bleu clair des exons 1 et 20 représente la portion de ces exons qui n'est pas traduite. La taille du gène est indiquée. L'exon alternatif 10b est montré en rouge (72 pb). L'exon 16b correspond au prolongement de l'exon 16 retrouvé à la fin de la forme courte de SH3AP1.

SH3AP1

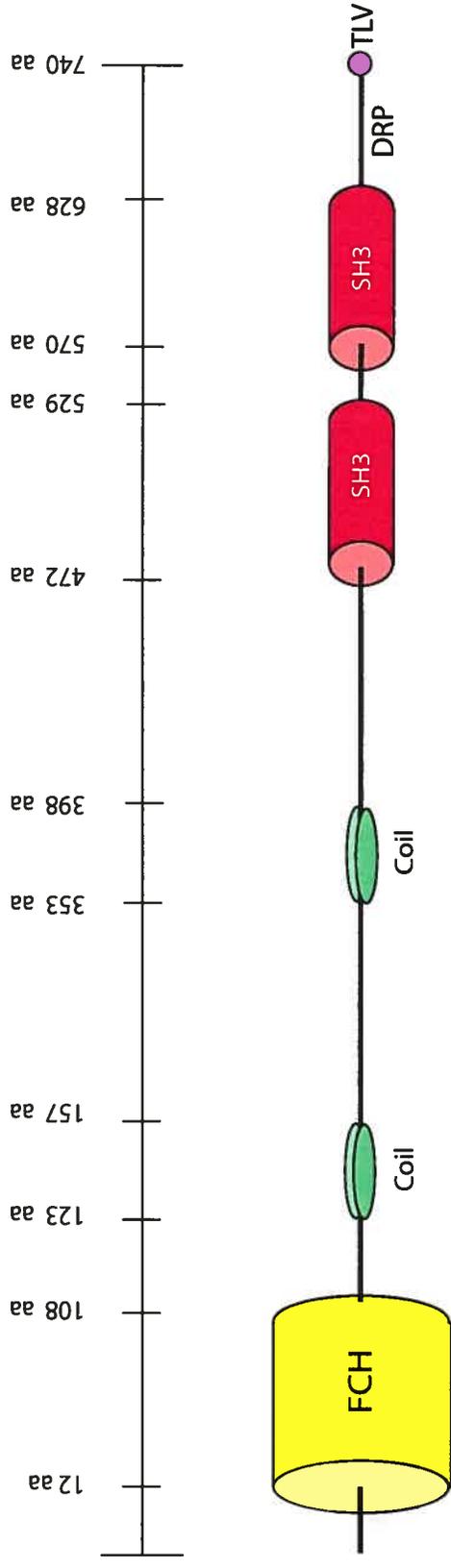


Figure 11. La localisation des différents domaines constituant la protéine SH3AP1. En jaune le domaine FCH (aa 12-108), en vert sont représentés les deux régions impliquées dans la dimérisation (aa 123-157 et 353-398), les deux domaines SH3 sont représentés en couleur rouge (aa 472-529 et 570-628) et la partie C-terminale riche en prolines ainsi que la séquence consensus TLV.

Séquence Nucléotidique et amino-acide de SH3AP1

```

atgcagccgcccgcgaggaaggtgaaagttacacaagaactgaaaaacattcaagttgagcagatgacaaaacttcaagccaaacatcaa
M Q P P P R K V K V T D E L K N I Q V E Q N T K L Q A E H G
gcagaatgtgatttgccttgaagatatgaggacattcagtcagaagaaggctgctattgaaagagagtatgcacagggatgcagaagttg
A E C D L L E D M N T P S Q K K A A I E E E Y A Q G M Q K L
gctagtcaatacctgaagagagattggcctggagtaaaagctgatgcgaatgat tacaggagcatgtatcccgtttggaatctttt
A S Q Y L K R D W P G V K A D D R N D Y R S M Y P V W K S
ctcaggggaacaatgcaggtgagccagctctcggatgaatatatgtgaaaactataaaaacttcatttctgagcctgcaaggacagtgaga
L E G T M Q V A Q E R M N I C E N Y K N F I S E P A R R V R
agcttaaaagaacgcaactaaaaaggtgtgtggaccagttgcaaaagatccaaactgaattacaagagacagtgaaagatttagctaaa
S L K E Q Q L K R C V D Q L T K I Q T E L Q E T V K D L A K
ggcaaaaagaataactttgagactgaacagatggctcatgcagtcagagagaaagctgacatcgaggcaaaactaaacttagtctttt
G K K K Y F E T E Q M A H A V R E K A D I E A K S K L S L F
caatcaagaatcagttacagaaggaagtgtaaagttaaaagcccggcgatctgagtgtaattccaaagctaccacgcaaggaatgat
Q S R I S L Q K A S V K L K A R R S E C N S K A T H A R N D
tatcttctaccctagcggcagcaaatgcacatcaggatcgctactatcaaacagatttagttaacattatgaaggctcttgatggaaat
Y L L T L A A A N A H Q D R Y Y Q T D L V N I M K A L D G N
gtgtatgatcatctcaaggatttttaatagccttcagccggactgagctagaaaacatgccaagctgtgcagaacacatccagttttta
V Y D H L Q K Y L I A F S R G T E L E T C Q A V Q N T F Q C F
ttagaaaactccagcaagtggtccgggactacaatcttcagctgtttttgcaagaaaacgctgtatctcaaaaacccagcctccag
L E N S S K V V R D Y N L Q L F L Q E N A V F H K P Q P F Q
ttcagccttgtagactactagccagctagaactcagaacatgggaccacagaggagcacagctctaaataaggaagctcgaaaaa
F Q P C D S D T S R Q L E S E T G T T E E H S L N K E A R K
tggccacacgctgtggcagctgacataaaaacattgttccaccaacaacgggttctaaatgatctggagtgatcagggagctgctgtatca
W A T R V A R E H K N I V H Q Q R V L N D L E C H G A A V S
gaacaaagccgagcagagctagaacagaaaatagatgaagctagagaaaatattcgtaaagcagagataattaaattgaaagctgaagcc
E Q S R A E L E Q K I D E A R E N I R K A E I I K L K A E A
cggttggactgctaaagcagattggtgttctgtggacacatggctaaagagtgccatgaaccaagtaatggaagaactggaaaaatgag
R L D L L K Q I G V S V D T W L K S A M N Q V M E E L E N E
cgatgggcccgcctcctgtagtaccagtaatggcactttacactcgcttaatgcagataccgaaagagaagaaggcgaagagtttgaa
R W A R P P A V T S N G T L H S L N A D T E R E E G E E F E
gataacatgagtgtttgcagacagcagttccagccctctggcsccttaagaaattatccactcactgcaaaagttgtttattcctac
D N M D V F D D S S S P S G T L R N Y P L T C K V V Y S Y
aaggcttctcaaccagatgagttgaccattgaggaacatgaggtgttagaagtgattgaagatggagatggaagactggtaaaaggct
K A S Q P D E L T I E E H E V L E V I E D G D M E D W V K A
cgaataaaagtggccaagtggtttatgtgccagaaaagtacctacagtttcccacctgcaacagcctcctgagcagctgcagctccctg
R N K V G Q V G Y V P E K Y L Q F P T S N S L L S M L Q S L
gccgctttggacagctcggtcacacacgctccagcaattccacggaagcagaaactcgtttcaggcagcctcaacggagatgccagtgatgt
A A L D S R S H T S N S T E A E L V S G S L N G D A S V Q
tttgtgaaagcactttatgattgaggccagacagatgagttatcttttctgagggagcaataatccggtatctgaaacaagaa
F V K A L Y D Y E G Q T D D E L S F P E G A I I R I L N R E
aaccaagatgatgatggctctctggaaggggaattcaatgggctgttgagttttcccacggtgctagtggagaactttcagcctca
N Q D D D G F W E G E F N G R I G V W P S V L V E E L S A S
gaaaatggtagactccatggatgagagagattcagatctctccttcccccaagccacagcctcctgctccactggccttgtagcag
E N G D T P W M R E I Q I S P S P K P H A S L P P L P L Y D
cagcctcccagcagcccctaccccagcccagataagaggagctcctgtactttcccggctccttccagcaaacgaaaaaagccttcat
Q P P S S P Y P S P D K R S S L F P R S P S A N E K S L H
gctgagtcaccagattctcacaggcatcaaggcactcctgagacctcatatggcaaacgacctgtccgggagctccccctcca
A E S P G F S Q A S R H T P E T S G K L R P V R A A P P P
cctacacagaatcaccgaaggccagcagagaagattgaagatgtggaaatcacactgggtgga
P T Q N H R R P A E K I E D V E I T L V -

```

Figure 12 : La séquence de la région codante du gène de SH3AP1 avec les différents domaines la constituant. Le domaine FCH est représenté en couleur bleue, les deux domaines SH3 sont représentés respectivement en jaune pour la forme courte de SH3AP1 et en vert pour la forme longue contenant les deux domaines, en rouge sont représentés les domaines riches en prolines et en pourpe les deux tyrosines phosphorylées en position 659 et 708. La séquence consensus TLV est représentée en couleur bleue à la fin de la séquence.

En consultant la banque de données HUGO (Human Unidentified Gene-Encoded Large Proteins) sur le site web (<http://www.kazusa.or.jp/huge>), une séquence correspondant à celle de SH3AP1, mais incomplète à l'extrémité 5', a subséquemment été identifiée et est déposée sous le nom de KIAA0769. Une analyse du profil de l'expression de la protéine SH3AP1 réalisée par RT-PCR-ELISA (RT-PCR-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Figure 9), par le groupe du Kazusa cDNA Project, a confirmé les résultats d'un immunobuvardage Northern obtenus précédemment dans notre laboratoire indiquant que SH3AP1 était exprimée à un niveau variant de élevé à très élevé dans tous les tissus testés. En consultant les banques de données du projet de séquençage du génome humain sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), il a été possible d'établir que le gène de SH3AP1 était situé sur le onzième chromosome, au locus 11q12.1, mais après révision, la localisation précise a été établie au locus 11q13.4

1.13.2 FLJ00007

Le centre Kasuza (<http://www.kazusa.or.jp/NEDO/gfpage/FLJ00007/>) a permis d'identifier une autre séquence d'ADN de 12116 paires de bases, sur le chromosome 5 au locus 5q31.3, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=89848>).

Elle est transcrite en un ARNm de 4303 bases, codant pour une protéine de 690 acides aminés, avec un domaine PCH en position N-terminale, une région centrale coil-coiled et deux domaines SH3 en position C-terminale. Cette protéine est, contrairement à SH3AP1, très peu exprimée dans les tissus où SH3AP1 est exprimée le plus. La comparaison d'identité des deux protéines est illustrée à la figure 13.

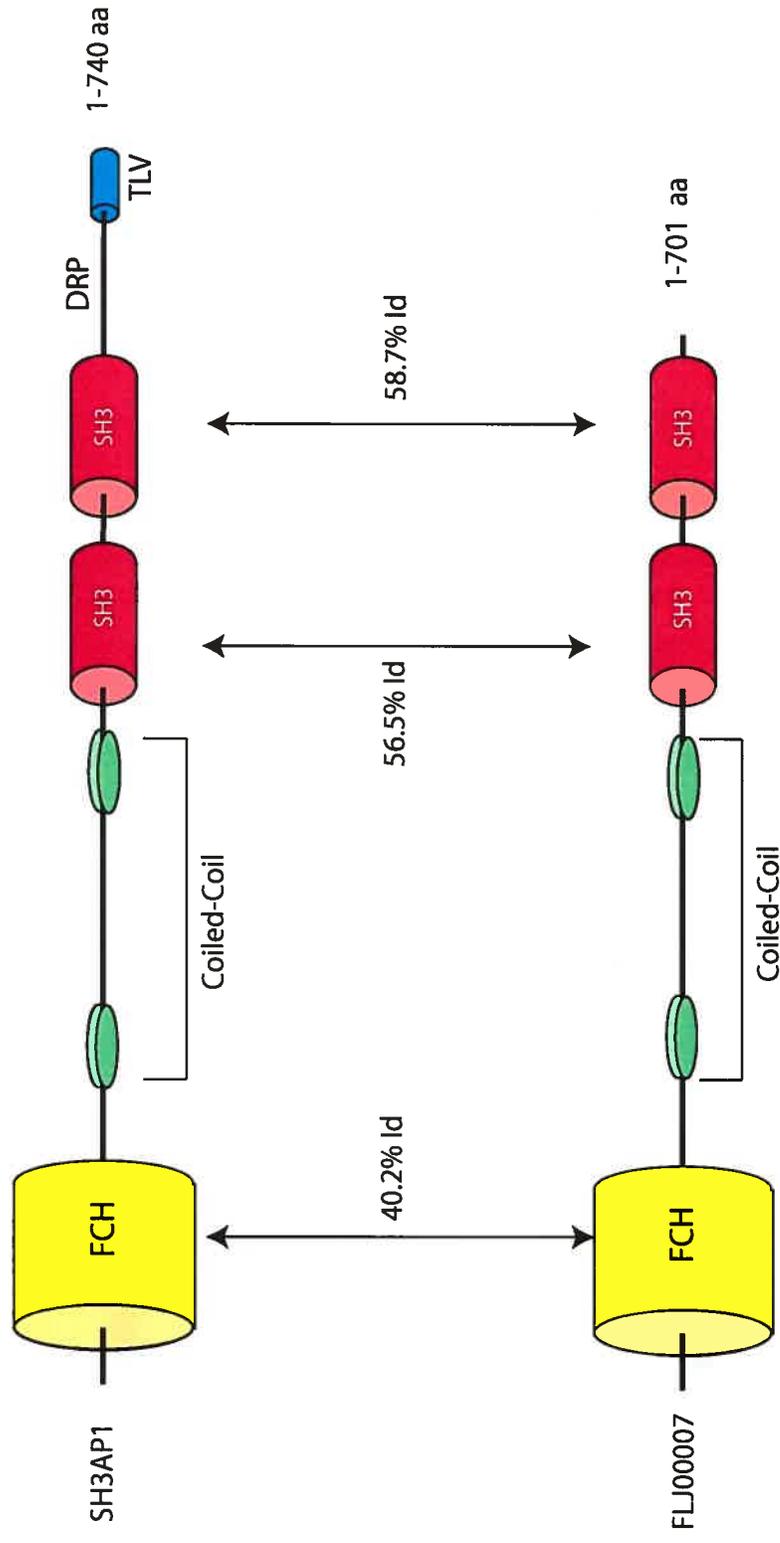


Figure 13. Le pourcentage d'identité de séquence entre SH3AP et FLJ0007. L'alignement des séquences en acides aminés des deux protéines humaines SH3AP1 et FLJ0007 dans le programme Blast de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/b2seq/b2.html>) nous a permis de mesurer le pourcentage d'identité de séquence entre ces deux protéines. Les deux protéines SH3AP1 et FLJ0007 partagent 40 % d'identité lorsqu'on aligne seulement les domaines FCH/PCH. Les deux domaines SH3 quant à eux partagent presque 60 % d'identité.

1.14 La superfamille des petites GTPases

La superfamille des petites GTPases regroupe plus de 100 membres chez les Eucaryotes.

Cette superfamille est subdivisée en cinq sous familles qui sont :

- La sous famille Ras compte Ras, Rap, Ral et R-Ras comme membres,
- La sous famille Rho compte les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 comme membres les plus étudiés,
- La sous-famille Rab est celle qui compte le plus de membres,
- Deux autres sous-familles Arf/Sar.

Les petites GTPases sont des protéines monomériques de poids moléculaire qui varient entre 20 et 40 kDa.

Les membres de cette superfamille des petites GTPases, en plus de partager des fonctions biochimiques fondamentales, exercent aussi un contrôle étroit dans divers processus cellulaires comme : la prolifération et la différenciation cellulaire, la motilité et les contacts cellules-cellules et la ré-organisation du cytosquelette.

Les petites GTPases jouent le rôle d'interrupteur moléculaire (Switch). Ces protéines passent d'un état activé en liant le GTP et un état inactivé en liant le GDP comme il est illustré sur la figure 14a.

Les petites GTPases servent de relais dans la transduction des signaux provenant des récepteurs membranaires en les acheminant vers leurs cibles intracellulaires. L'activité de ces GTPases est régulée par d'autres protéines qui sont les GEFs (Guanine nucleotide Exchanging Factors), les GAPs (GTPases activating proteins) et les GDIs (Guanine nucleotides dissociation inhibitors). Toutes ces protéines ont un rôle à jouer dans le maintien de l'état et du taux intrinsèque des formes inactives ou bien actives des petites GTPases, tel qu'illustré à la figure 14a.

1.15 Les Rho-GTPases (Rho, Rac et Cdc42) et l'organisation du cytosquelette

L'habilité des cellules eucaryotes de maintenir ou de changer leur forme et leur capacité de fixation à leur substrat en réponse aux signaux extracellulaires est largement dépendante des ré-arrangements du cytosquelette d'actine.

Le ré-arrangement du cytosquelette d'actine joue un rôle crucial dans le processus de la motilité cellulaire, la cytokinèse et la phagocytose. Le cytosquelette d'actine est composé de filaments d'actine qui sont organisés en structures comme les filopodes, les lamellipodes et les fibres de stress. La figure 14b illustre le rôle de chacune des protéines Rho, Rac et Cdc42 dans le ré-arrangement du cytosquelette d'actine.

Les Rho GTPases sont des protéines de 20 à 30 kDa. Elles sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires. Ce sont des protéines ubiquitaires exprimées chez tous les eucaryotes de la levure à l'homme. Chez les mammifères, cette sous famille compte plus de 10 membres (Rho A, B, C, D et E, Rac1 et 2, Rac E, Cdc42 et TC10). Comme membre de la super famille Ras, les Rho-GTPases sont des interrupteurs moléculaires qui oscillent entre un état actif qui lie le GTP et un état inactif qui lie le GDP.

Jusqu'à récemment, on croyait que les membres de cette famille Rho GTPase étaient impliqués essentiellement dans la régulation de ré-organisation du cytosquelette en réponse aux facteurs de croissance extracellulaires.

Néanmoins il a été démontré par d'autres recherches d'autres laboratoires (219-220) que les GTPases Rho jouent un rôle important dans divers événements cellulaires comme le trafic cellulaire, le contrôle de la croissance cellulaire, la régulation de la transcription et le développement et aussi la transformation cellulaire (221-226).

Comme tous les membres de la super famille des GTPases Ras, l'activité des petites GTPases est déterminée par le ratio de leur forme liée GDP/GTP dans la cellule. Ce ratio est régulé par les protéines GEFs (guanine nucleotide exchange factors) qui entament l'échange GDP/GTP (voir figure 14a) et les GAPs (GTPase-activating proteins) qui augmentent la vitesse de l'hydrolyse du GTP lié. Les GTPases Rho sont aussi régulées par les GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) qui peuvent inhiber l'échange du GDP en GTP et l'Hydrolyse du GTP déjà lié.

1.15.1 GAPs (GTPase-activating proteins)

Plus de 16 différentes Rho-GAPs (Rho GTPase activating proteins) stimulent l'activité intrinsèque GTPase des Rho GTPases (227-228). Ces protéines ont un seul domaine GAP en commun et montrent peu de spécificité. La protéine la plus représentative des Rho-GAPs est p50Rho-GAP. Elle possède une activité GAP envers les membres de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42) (106-108). D'autres protéines Rho-GAPs ont été par la suite isolées chez les mammifères comme Bcr, Abr et p190-GAP.

1.15.3 GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors)

La première protéine GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) identifiée pour les membres de la famille Rho-GTPase est GDP-Rho-GDI (dissociation inhibitor for the Rho proteins GDIs).

Cette protéine GDP-Rho-GDI s'associe préférentiellement à Rho-A et à Rho-B mais par la suite il a été démontré qu'elle est aussi active sur Cdc42 et Rac (106-108).

1.15.3 GEFs (guanine nucleotide exchange factors)

Les GEFs (guanine nucleotide exchange factors) appartiennent à la famille des protéines qui possèdent un domaine Dbl (DH) (Dbl-homology) essentiel à l'activité d'échange GDP/GTP et un domaine PH (Pleckstrine homology) qui est essentiel pour la localisation cellulaire.

En plus de ces deux domaines, d'autres sont communément retrouvés dans ces molécules de signalisation comme le domaine SH3 le domaine ZF (Zinc Finger), ce qui suggère que ces molécules ont des fonctions additionnelles.

La protéine Sos qui est une GEF de la protéine Ras a été démontrée comme se liant à la molécule adaptatrice GRB2 qui lie le récepteur PDGF (platelet-derived growth factor).

La famille Dbl (106-108) comprend 21 membres dont 10 (Lsc, Lfc, Lbc, Dbl, Ost, Dbs, Vav, Ect, Net1, et Tim) ont été identifiés sur la base de leur capacité de transformation des fibroblastes de souris NIH3T3. Deux gènes *fgd1* et *bcr* qui codent pour les deux protéines à domaine DH, Fgd1 et Bcr, ont été identifiés comme étant associés à des pathologies chez l'homme. En effet le ré-arrangement chromosomique (X:8) du gène

fgd1 est spécifique du syndrome de Aarskog-Scott, une dysplasie cranio-faciale liée au chromosome X (109-111). Cette pathologie étant caractérisée par une déformation des os du crâne, du visage, des mains et des orteils. La seconde pathologie est due à un ré-arrangement chromosomique réciproque (9:22) *bcr / abl* (break point cluster region / abelson) ou chromosome philadelphia. Ce ré-arrangement chromosomique est présent dans la majorité des leucémies myéloïdes chroniques et des leucémies lymphoïdes aiguës (LMC et LLA). La fusion de ces deux gènes produit une protéine chimérique de 120 kDa qui est une tyrosine kinase continuellement active.

Toutes ces pathologies sont liées à des mutations nulles ou à des ré-arrangements chromosomiques. Les protéines impliquées dans ces pathologies se situent soit en amont soit en aval des voies de signalisation de Rho/Rac/Cdc42. La majorité des protéines GEFs ont une capacité transformante importante lorsqu'elles sont sur-exprimées ou bien lorsqu'elles sont tronquées, raisons pour lesquelles le cycle GDP-GTP de ces protéines Rho/Rac/Cdc42 est hautement régulé durant la croissance cellulaire.

Les protéines de la famille Vav sont parmi les GEFs les mieux caractérisées aux niveaux biochimique, fonctionnel et de leur rôle dans la signalisation.

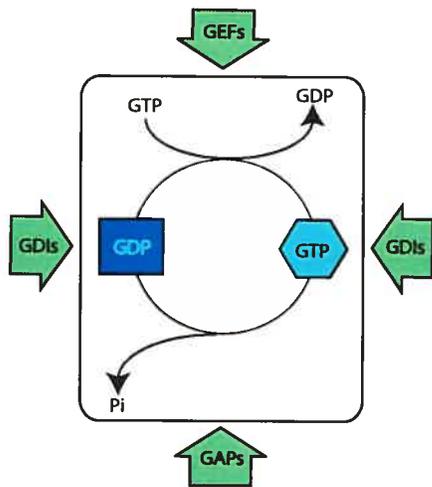


Figure 14a. La régulation de l'échange GTP-GDP.

Les GEFs catalysent l'échange du GDP pour le GTP. Les GAPs stimulent l'activité intrinsèque pour la conversion du GTP en GDP. Les GDIs catalysent la dissociation et l'hydrolyse du GTP.

Whitehead I.P & al.

Biochemica et Biophysica Acta 1332 (1997) F1-F23

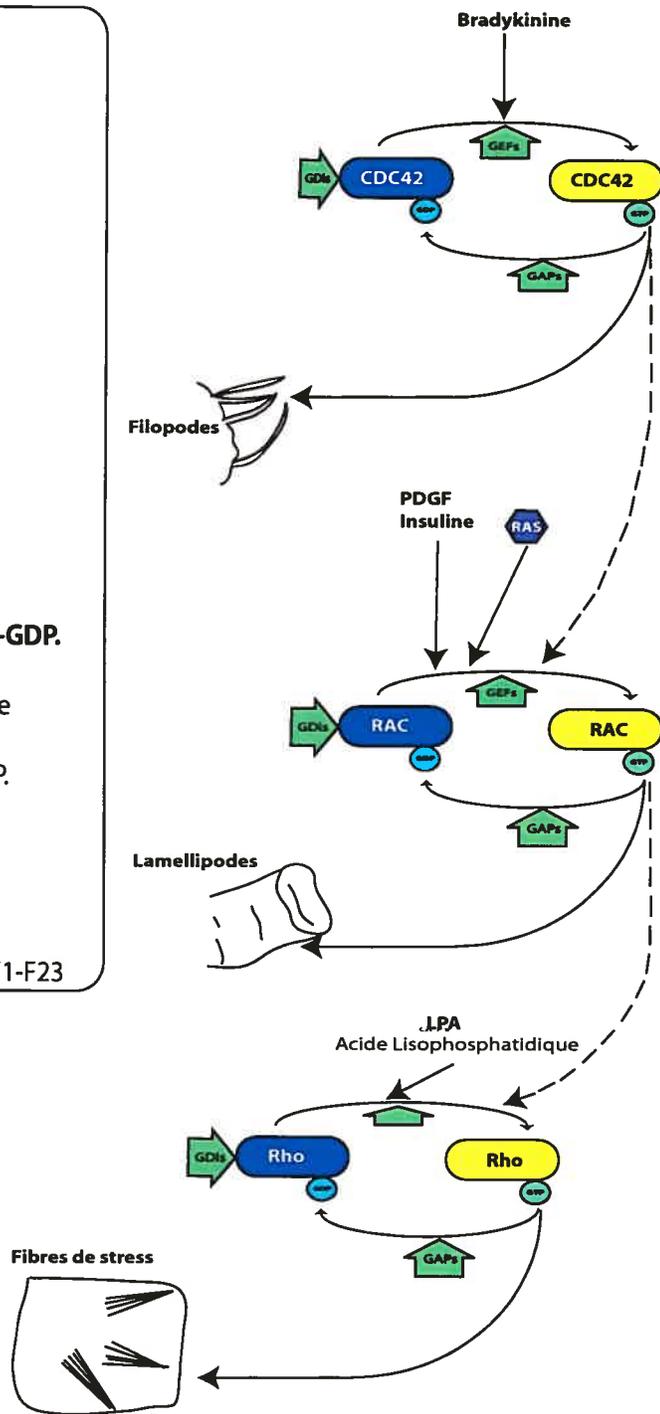


Figure 14b. La cascade des GTPases impliquées dans l'organisation du cytosquelette dans les fibroblastes.

Divers stimuli extracellulaires enclenchent l'activation des GTPases Rho, Rac et Cdc42. En réponse à ces stimuli, les cellules développent respectivement des filopodes, des lamellipodes et des fibres de stress. De plus il apparaît que CDC42 active Rac qui à son tour va activer Rho. Les GTPases Rho peuvent être activées par différents agonistes. Les mécanismes d'activation de ces GTPases impliquent les GEFs, GAPs et les GDIs.

Linda Van Aelst & al, Genes & Dev (1997) 11:2295-2322.

1.16 Les protéines membres de la famille GEFs

1.16.1 Vav-1, Vav-2 et Vav-3

Vav 1/2/3 sont des GEFs (guanine nucleotide exchange factors) pour les protéines de la famille des Rho-GTPases qui activent les voies de signalisation menant aux réarrangements du cytosquelette d'actine.

Les protéines de la famille Vav possèdent plusieurs domaines et sont capables d'interagir avec d'autres protéines qui vont relayer les signaux des récepteurs membranaires à leurs cibles intracellulaires.

Vav-1 est exprimé exclusivement dans les cellules hématopoïétiques, néanmoins il est à noter que récemment d'autres isoformes de Vav-2 et Vav-3 ont été isolés et sont généralement exprimés dans divers tissus.

Vav a été identifié par Katzav et ses collègues en 1989 (114). Il a été désigné ainsi parce que il est le sixième gène transformant isolé dans ce laboratoire, *vav* correspond à la sixième lettre de l'alphabet hébraïque. La figure 15 nous montre les trois protéines de la famille Vav et l'organisation de leurs domaines.

1.16.2 Le gène Vav

Vav est un gène de 7 286 004 pb porté par le chromosome 19 au locus 19p13.2, dont l'ARNm code pour une protéine de 845 acides aminés. L'onco-protéine Vav-1 est constituée en position N-terminale d'un domaine CH (Calponin Homology), de 115 acides aminés, d'un domaine DH de 174 acides aminés, d'un domaine PH de 103 acides aminés, d'un domaine C1 de 48 acides aminés et enfin de deux domaines SH3 séparés par un domaine SH2 en position C-terminale, respectivement de 64, 82, et 56 acides aminés. L'organisation des domaines respectifs de ces protéines est illustrée à la la figure 15.

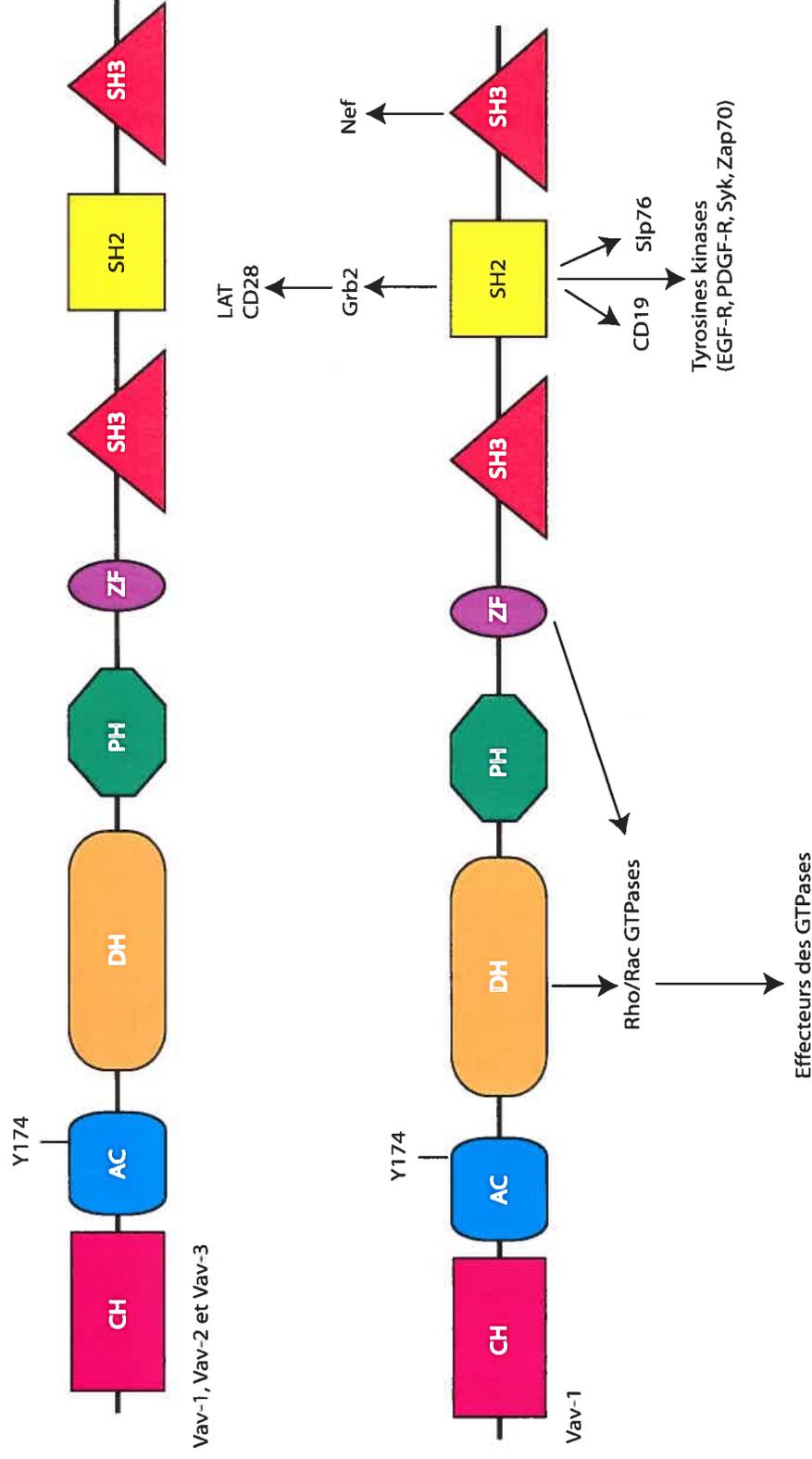


Figure 15. La structure des protéines membre de la famille Vav. La tyrosine 174 est dite inhibitrice lorsque non phosphorylée. La structure des domaines a été déjà décrite dans le texte à la section 1.13. La description des domaines de Vav-1 interagissant avec les différentes protéines et adaptateurs que se soit en amont avec les kinases Syk, Zap-70 et Src ou bien avec les adaptateurs comme Grb2, Slp76 et LAT ou bien avec les régulateurs négatifs comme SHP et Cbl-b. Vav-1 est impliqué dans des voies de signalisation des lymphocytes T et B.

Bustelo. X.R & al, Oncogene (2001), 20, 6372-6381

1.17 Les différents domaines de Vav

1.17.1 Le domaine CH

Le domaine CH (Calponin homology) consiste en quatre hélice principales connectées par des régions en boucles et de deux ou trois courtes hélices (115). Le domaine CH, est un module protéique de près de 115 résidus aminés qui est présent dans les protéines du cytosquelette et des protéines de signalisation. Deux domaines CH en tandem forment une région de liaison à l'actine-F. Les domaines CH sont subdivisés en 3 types, les types 1 et 2 étant retrouvés en tandem dans les protéines du cytosquelette comme la dystrophine, spectrine et filamine. Le type 3 est retrouvé dans les protéines qui régulent la contraction musculaire comme la calponine et aussi dans les protéines de signalisation comme Vav, Arh-GEF6 et Iq-GAP. Le domaine CH n'interagit pas directement avec l'actine mais agit comme un domaine de régulation ou bien sert d'échafaudage (scaffold) dans les interactions protéine-protéine et ainsi permet de moduler l'activité des protéines formant ces complexes (116-119).

La partie N-terminale de Vav partage 25% d'homologie avec la protéine CDC24 de *Saccharomyces cerevisiae* qui participe avec CDC24Sc dans l'organisation du cytosquelette durant le processus de bourgeonnement (120).

1.17.2 Le domaine DH (Rho-GEF)

Toutes les protéines de la famille Dbl partagent le domaine DH aussi appelé Rho-GEF (Dbl Homology), d'où leur nom GEFs. Il est localisé du côté C-terminal du domaine CH. Ce domaine encode l'activité catalytique d'échange de GDP en GTP. Les protéines de cette famille ont aussi en commun le domaine PH (Pleckstrin Homology). Il est invariablement localisé en position C-terminale du domaine DH/Rho-GEF. Cette position invariable suggère une fonction interdépendante entre ces deux structures. Les données biochimiques ont établi que le rôle de ce domaine dans l'activation et les interactions était très conservé dans les protéines GEFs et qu'il est aussi impliqué dans l'oligomérisation. L'homologie entre le domaine PH de Vav et celui des autres protéines qui possèdent un

domaine GRF (guanine nucleotide releasing factor) dont l'activité est dirigée vers les produits de la famille du gène Ras, indique que Vav est plus orienté vers les protéines de la famille Rho-GTPases (Rho, Rac et Cdc42) que vers celles de Ras-GTPases. Néanmoins, dans les cellules T, le domaine DH/Rho-GEF de Vav médie l'activité de Ras, en réponse à la stimulation de TCR/CD3 couplé aux tyrosines kinases de la famille Src. La même activité d'échange GDP-GTP pour Ras est aussi retrouvée dans les cellules B lorsque le récepteur IgM de surface est activé (121).

Le domaine DH/Rho-GEF est formé d'un entassement d'hélices alpha. Cet entassement est essentiellement composé de trois régions conservées CR1, CR2 et CR3 et chacune forme une hélice alpha séparément jusqu'à ce qu'elles se tassent. C'est au niveau de la région 1 et 3 qu'ont lieu les changements de liaison au GDP coordonnés par les ions Mg^{2+} et la boucle P qui lie le phosphate du GDP en N-Terminal et stabilise la liaison au GTP (122).

1.17.3 Le domaine PH

Le domaine PH (Pleckstrin Homology) est un module de 120 acides aminés qu'on retrouve dans une grande variété de protéines de signalisation chez les eucaryotes. Le domaine PH se lie spécifiquement aux phosphoinositides comme phosphoinositol (PI)-4,5-bisphosphate, PI-3,4-P2 ou bien au PI-3,4,5-P3. La liaison aux phosphoinositides permet aux protéines avec un domaine PH de répondre aux messagers lipidiques et de se re-localiser à la membrane plasmique. Il a été aussi rapporté que la partie C-terminale du domaine PH de certaines protéines permet de lier les sous unités bêta/lambda des protéines G hétéro-trimériques. On le trouve dans les protéines du cytosquelette comme la dynamine, dans les sérine/thréonine kinases comme Akt, dans les protéines GEFS comme Sos, Vav, Dbl, ainsi que dans bien d'autres protéines (123-126).

1.17.4 La particularité de la partie C-terminale de Vav

La particularité de Vav est sa partie C-terminale. Celle-ci possède deux domaines SH3 séparés par un domaine SH2 (Cassette). En effet, il n'est pas habituel de trouver dans les

protéines de signalisation à multi-domaines une pareille organisation. Le plus souvent on trouve des protéines avec un domaine SH2 suivi d'un domaine SH3 comme dans Grb3 et dans les protéines Grb/Grap. La seule protéine connue pour interagir avec ce domaine SH3 en N-terminale (N-SH3) est Grb2 (127). Le domaine SH3 en position C-terminale (C-SH3) interagit quant à lui avec beaucoup de protéines comme Grb3, Ku-70, hnRNP, Zyxine et bien d'autres protéines (128-129).

Vav aussi possède une région riche en prolines dans le domaine SH3 en position N-terminale, ce qui a suggéré au préalable que Vav liait Grb2 par la dimérisation des domaines SH3 des deux protéines. Toutefois, une autre étude a démontré que l'interaction était plutôt médiée par le domaine SH3 en C-terminale de Grb2 avec la région riche en proline de Vav dans le domaine SH3 en position N-terminale (130-131). Ceci a permis d'expliquer l'ambiguïté de l'interaction entre Vav et Grb2, qui en premier lieu supposait une dimérisation entre les deux protéines par les domaines SH3. En réalité, c'est la séquence riche en proline contenue dans le domaine SH3 en position N-terminale de Vav qui interagissait avec le domaine SH3 situé en position C-terminale de Grb2. La figure 16 nous résume le rôle que joue les différents domaines de Vav-1 dans la signalisation cellulaire.

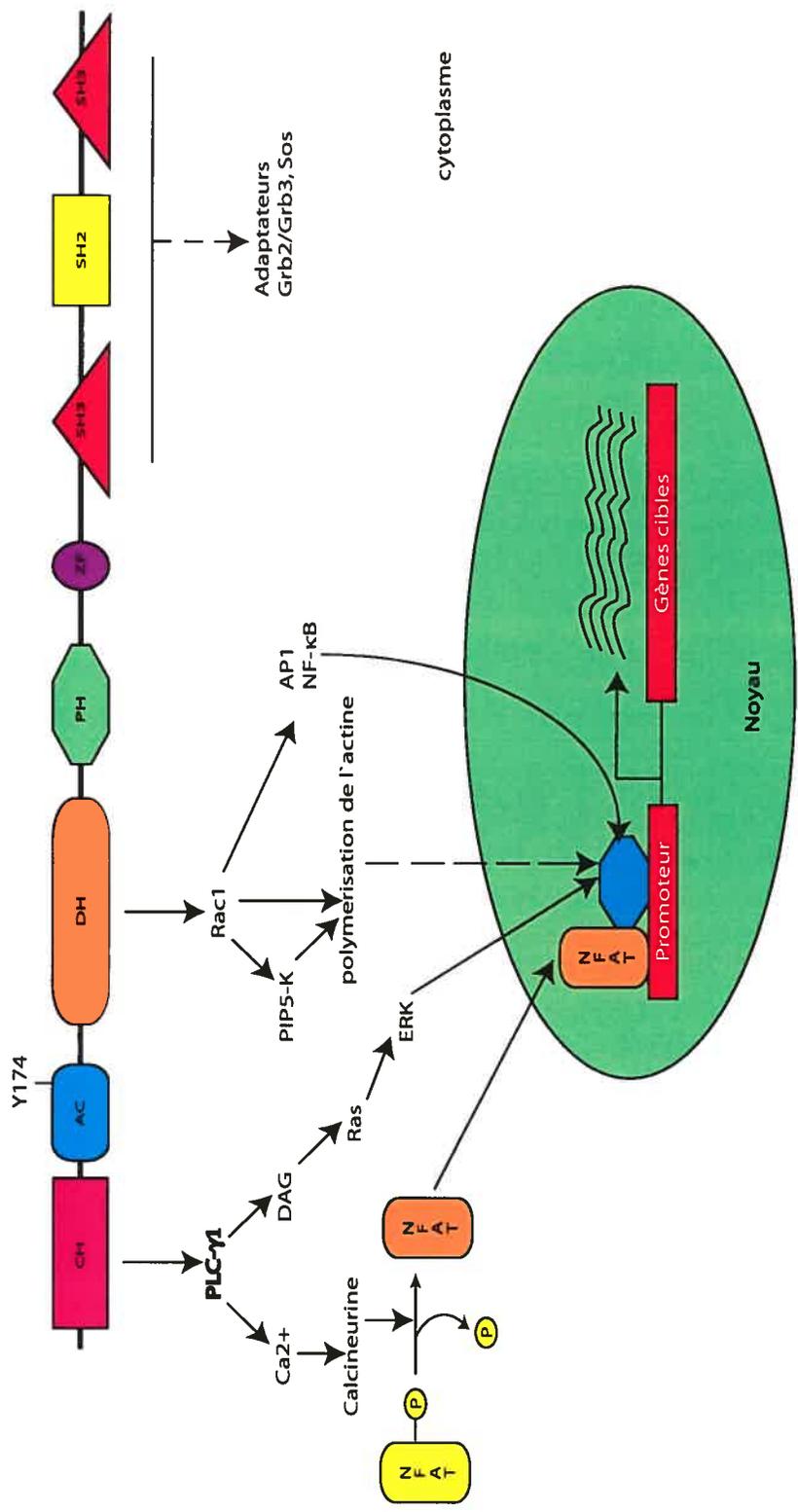


Figure 16. Modèle représentant le rôle de Vav-1 dans les cellules lymphoïdes. Vav-1 a été considéré en premier lieu comme un adaptateur en raison de la présence des domaines SH3 et SH2. Il s'est avéré plus tard que Vav-1 est impliqué dans différentes voies de signalisation grâce à ses différents domaines, tel que schématisé dans cette figure. Une de ces voies est la voie Rac qui culmine par le ré-arrangement du cytosquelette d'actine.

Bustelo. X.R & al, Oncogene (2001), 20, 6372-6381

1.18 La régulation de l'activité de VAV

La propriété fonctionnelle distinctive des membres de la famille VAV est le fait que leur activité enzymatique soit déclenchée par la phosphorylation de la tyrosine en position Y174 (218).

Il a été rapporté que la régulation de l'activité de Vav-1 était modulée par des seconds messagers dérivés de l'activité enzymatique de PI-3K (phosphatidylinositol 3-kinase). Cette activité est partagée par un petit nombre de protéines comme Sos et Arf de la famille des GEFs, (132-133).

1.18.1 Les éléments en amont de la voie de signalisation de Vav-1

On retrouve parmi les molécules qui participent à l'activation de Vav-1 durant la signalisation, entre autres, les récepteurs TCR et IgM des cellules T et B du système immunitaire, les récepteurs des facteurs de croissance EGF-R, PDGF-R, les protéines tyrosines kinases (PTK) et les adaptateurs moléculaires comme Grb2 dont la fonction est de permettre l'interaction de Vav-1 avec les protéines kinases (134-136).

Il a aussi été mis en évidence que les protéines kinases de la famille Src (Lck, Fyn et Hck) induisent la phosphorylation de Vav-1 et ainsi enclenchent l'activité d'échange GDP-GTP de Vav-1 et des deux autres membres Vav-2 et Vav-3 (137-139).

En dépit de la formation de complexes avec les protéines kinases citées plus haut, il apparaît que Vav-1 nécessite des adaptateurs moléculaires pour lui faciliter l'accessibilité à ces protéines kinases. Ces adaptateurs seraient entre autres capables de se lier aux domaines SH2 et SH3 de Vav-1.

1.18.2 Les régulateurs négatifs de Vav-1

Certaines molécules comme les tyrosines phosphatases SHP connue aussi comme (PTP1C, HCP, et SHPTP1) semblent jouer un rôle de régulateur de Vav-1. Cbl-b, un partenaire de Vav-1 qui interagit avec lui via les domaines SH3, SH2, SH3 joue

également un rôle direct dans la régulation négative de Vav-1 (140). Il est à noter que la protéine Cbl-b est exprimée de façon ubiquitaire (141).

1.18.3 Les éléments en aval de la signalisation exercée par Vav-1

Les réponses biologiques induites par Vav-1 sont classées en trois catégories interdépendantes : la stimulation des effecteurs de Rho et Rac, entre autres JNK, p21-activated kinase (PAK) et PI-4-P5-kinase (PIP5-K) (142-149), l'activation des facteurs de transcription et l'induction du ré-arrangement du cytosquelette. Vav-1 active JNK une sérine-thréonine kinase impliquée dans la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcriptions comme c-Jun et ATF2 (150-151). Les PAKs sont aussi des sérines-thréonines kinases apparemment liées au réarrangement du cytosquelette (151) et contribuent à l'activation de la voie de Ras via la stimulation de Raf ou bien de MAPK/ERK (152). Il a été montré que les changements morphologiques dans les cellules de mammifères étaient associés au ré-arrangement de l'actine-F induite par les membres de la famille VAV. Les protéines Vav induisent des changements dans les cellules NIH3T3 identiques à ceux induits par Rho/Rac, incluant l'expansion des lamellipodes et la contraction de l'anneau d'actomyosine. Ces changements sont la conséquence directe de l'activation de Rho/Rac par les protéines Vav. (153, 154). Vav-1 a également été identifié comme un partenaire spécifique de la protéine Nef du virus HIV-1. La co-expression et la liaison de ces deux partenaires entraînent de très importants changements morphologiques, des ré-arrangements du cytosquelette qui vont aboutir à l'élévation de la transcription et de la réplication virale.

Nef cible directement la membrane cytoplasmique avec sa partie N-terminale myristylée et la séquence de son motif PxxP se lie au domaine SH3 en position C-terminale de Vav-1. Cette liaison va enclencher l'activité GEF de Vav-1 qui va conduire à l'accumulation de Cdc42-GTP et Rac-GTP activés, qui à leur tour vont activer NAK (NF-kappaB-activating kinase) qui va cibler toute une série d'événements en aval incluant le ré-arrangement du cytosquelette et l'activation de JNK. Ces événements vont créer un changement dans l'environnement cellulaire et vont aboutir à l'augmentation de la réplication virale. Dans les cellules T, l'activation de la cascade JNK va permettre

l'accroissement de la transcription initiée au LTR (long terminal repeat) de HIV-1 (155). La figure 17 illustre la cascades des interactions après l'activation du récepteur des cellules T et les différentes voies de signalisation impliquant la protéine Vav-1 et les réponses engendrées.

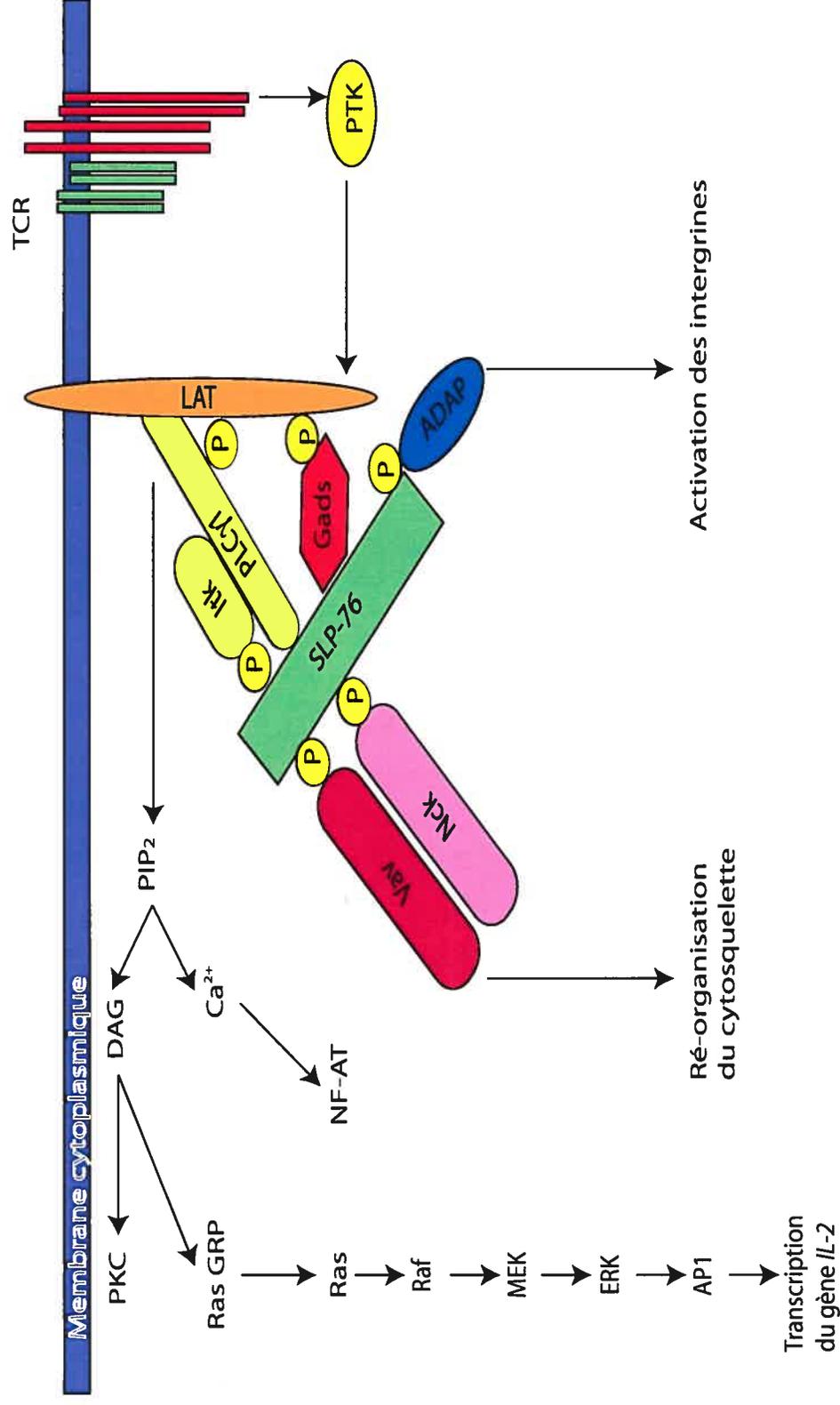


Figure 17. Le modèle de la synergie d'interaction observée entre Vav-1, Nck et SLP-76. Le résumé des voies de signalisation après activation du récepteur T dans les lymphocytes. Cette activation va entraîner le recrutement de différents joueurs comme LAT, PLC γ , SLP-76, Vav-1 et Nck. Ces interactions vont aboutir à trois voies de signalisation qui vont entraîner trois réponses différentes; entre autres la ré-organisation du cytosquelette d'actine via l'activation de Rho, Rac et Cdc42 (Figure 7). Jordan M.S & al, Nature Immun, Feb 2003, Vol 3 (2), 110-116.

CHAPITRE 2: Matériels et Méthodes

2.1 Étude des interactions de SH3AP1 chez la levure

2.1.1 Le système du double hybride chez la levure

Le système double hybride permet d'identifier les interactions protéines-protéines *in vivo* par reconstitution d'un activateur de l'activité transcriptionnelle. La méthode est basée sur les propriétés de la protéine GAL4, un activateur transcriptionnel trouvé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui consiste en la séparation du domaine responsable de la liaison à l'ADN et du domaine comportant l'activité transcriptionnelle (156-160).

Les plasmides contenant les séquences codantes pour deux protéines hybrides, une représentant le domaine de GAL4 liant l'ADN fusionné à la protéine X, et l'autre représentant le domaine de GAL4 activateur de la transcription fusionné à la protéine Y, sont construits et introduits à l'intérieur de la levure. L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine GAL4 fonctionnelle et conduit à l'activation de la transcription du gène rapporteur HIS3 contenant un site de liaison à GAL4. La protéine associée au domaine de liaison à l'ADN est appelée "**appât**". L'appât est généralement une protéine dont on recherche les partenaires cellulaires. La protéine associée au domaine activateur de la transcription est appelée "**proie**". La proie est le plus souvent inconnue. Chaque élément d'une banque issue d'un type cellulaire donné, est couplé au gène du domaine N-terminal de GAL4 pour l'identification des proies. Le gène rapporteur le plus utilisé est le gène lacZ qui code pour une enzyme, la β -galactosidase. L'expression de lacZ peut être mesurée par un test colorimétrique, le test de l' α -complémentation, basé sur l'activité de la β -galactosidase. La figure 18 illustre le principe de la technique du double hybride.

2.1.2 Avantages de la technique double hybride

Cette méthode permet de détecter des interactions *in vivo*, même celles de faible affinité.

2.1.3 Inconvénients de la technique double hybride

Cette méthode donne de nombreux faux positifs, ce qui peut par conséquent conduire à des pistes de recherche erronées. De plus, elle est difficilement réalisable en ce qui concerne les protéines membranaires. Dans un grand nombre de cas, cette technique nécessite de tronquer l'appât car dans la grande majorité des cas, la protéine complète ne fonctionne pas. Par conséquent, l'utilisation d'une protéine tronquée nous éloigne dans certains cas des conditions physiologiques et introduit un biais dans la sélection et l'identification de certains partenaires d'interaction.

2.1.4 Applications du système du double hybride

Il permet de mettre en évidence les interactions protéines-protéines, d'identifier les mutations qui affectent les liaisons, d'identifier les domaines de la protéine impliqués dans la liaison et d'identifier de nouveaux partenaires. Les interactions identifiées par cette technique doivent par la suite être confirmées par d'autres méthodes biochimiques *in vivo* telles que les techniques de co-immunoprécipitation et de GST *pull-down*. Donc on ne doit pas s'appuyer sur une seule méthode.

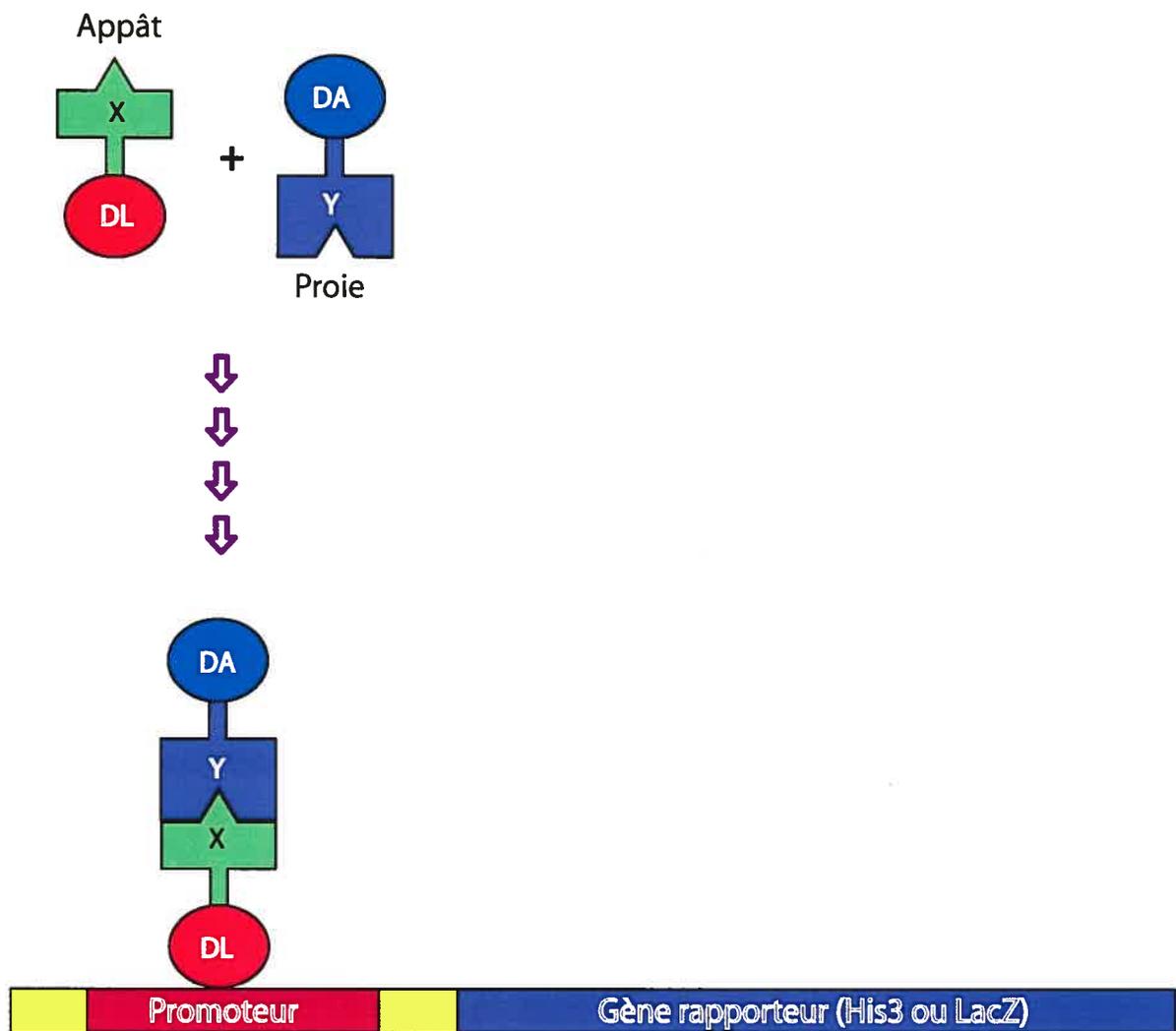


Figure 18. Représentation schématique du système du double hybride chez la levure (système MATCHMAKER GAL4 DE CLONTECH). L'appât est cloné dans un vecteur qui contient le domaine de liaison à l'ADN du gène GAL4, tandis que les clones de la librairie à cribler sont clonés dans le vecteur contenant le domaine d'activation du même gène. Lors d'une interaction physique entre l'appât et la proie (un des clones de la librairie), les deux domaines du gène GAL4 sont réunis et la transcription du gène rapporteur His3 et LacZ pourra se faire. Domaine d'activation (DA), Domaine de liaison à l'ADN(DL).

2.2 La méthode de sélection des clones positifs

La première sélection est basée sur l'auxotrophie de la souche L40 α pour au moins un de ces nutriments Histidine, Leucine ou Tryptophane (His⁻, Leu⁻, Trp⁻). Ainsi le plasmide contenant notre protéine d'intérêt contient aussi un gène qui code pour l'acide aminé tryptophane (*Trp*). La lignée L40 α transformée par le plasmide pBTM16 + Src + appât estensemencée sur un milieu minimal dépourvu de tryptophane. Sur ce milieu solide minimal ne poussent que les levures ayant incorporé le plasmide. Les fragments d'ADNc sont clonés dans le plasmide pACT2 contenant le gène qui code pour la leucine (*Leu*). Les levures sélectionnées une premières fois contenant le plasmide pBTM116 + Src + l'appât sont transformées une seconde fois avec le plasmide pACT2 + la proie (clones de cDNA de la librairie). Ces levures sontensemencées sur un milieu dépourvu de Trp et de Leu (sélection double). Sur ce milieu ne poussent que les levures contenant l'appât qui ont incorporé le plasmide contenant la proie (Figure 19). Les clones ainsi récupérés sont par la suiteensemencés sur un milieu ne contenant pas d'histidine (His). Si l'interaction entre l'appât et la proie a lieu, les domaines de liaison et d'activation sont assemblés, ce qui entraîne l'activation de la transcription du gène His3; c'est la sélection triple. Les clones qui poussent sur le milieu dépourvu de Trp, Leu et His sont les clones positifs encodant des candidats potentiels.

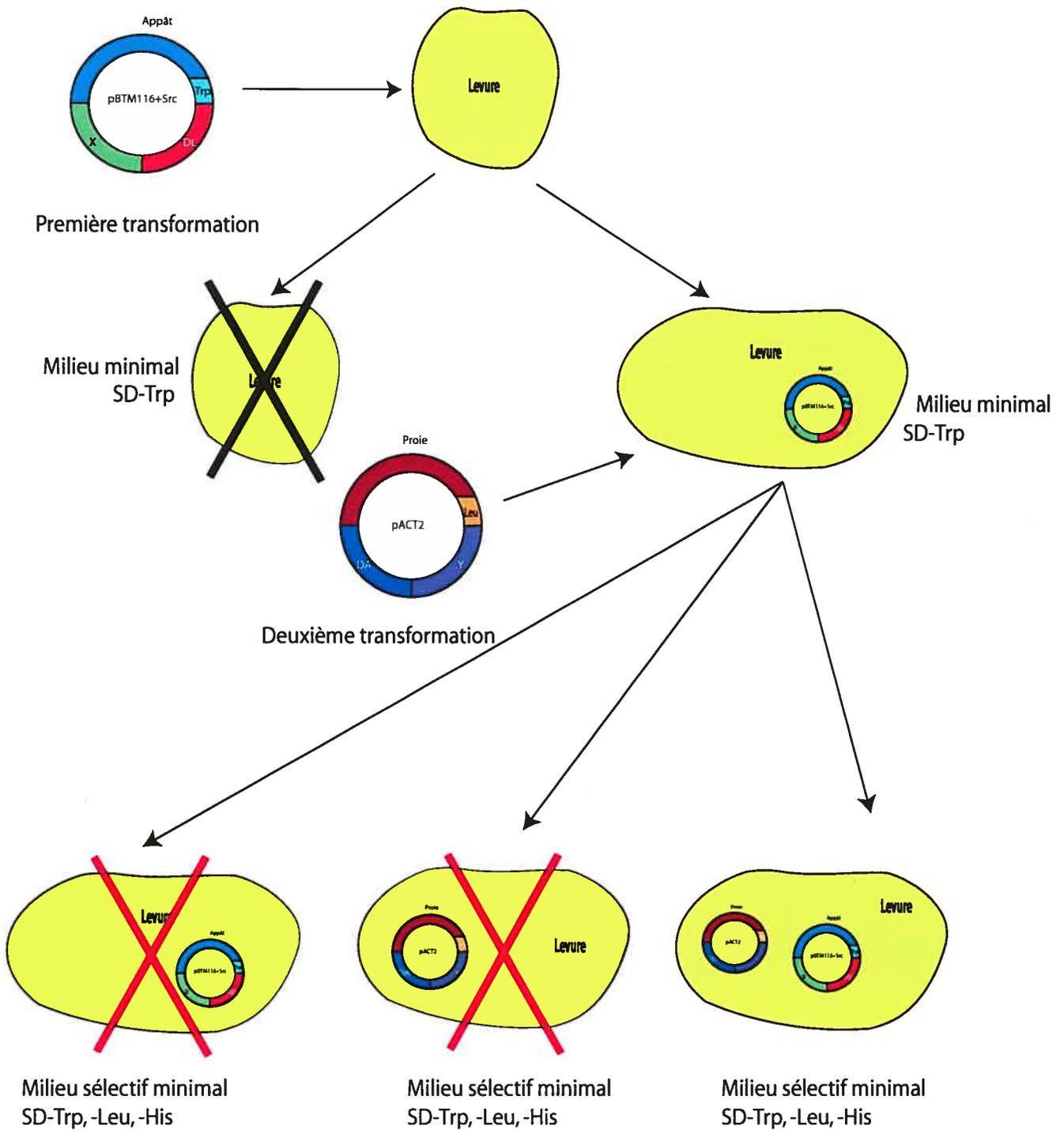


Figure 19. La transformation séquentielle des levures. Les plasmides contenant l'appât et la proie sont introduits dans les levures séquentiellement après avoir perméabilisé la paroi cytoplasmique. Une fois la transformation terminée, les cellules contenant les deux plasmides sont sélectionnées sur milieu minimal ne contenant ni tryptophane ni leucine ni Histidine. Seulement les levures qui ont incorporé les deux plasmides avec les deux gènes *Trp* et *Leu* sont capables de pousser sur ce milieu sélectif. La sélection triple se fait sur un milieu dépourvu des acides aminés *Trp*, *Leu* et *His*.

2.3 Clonage de l'appât utilisé

La partie C-terminale de la forme longue de SH3AP1 contenant les acides aminés 627 à 737 (sans la séquence consensus TLV) a été clonée aux sites de restriction EcoRI et BamHI du vecteur pBTM116-Src. Elle a été fusionnée à la partie C-terminale du domaine de liaison à l'ADN de l'activateur bactérien LexA. Le vecteur pBTM116-Src contient un mutant de la kinase c-Src afin de permettre la phosphorylation des résidus tyrosines des protéines chez la levure (161).

La banque de proies a déjà été générée par clontech dans le vecteur pACT2, voir le manuel technique pour plus de détails au site web de la compagnie Clontech à l'adresse qui suit : (<http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3247-1.pdf>). La figure 20 représente la région C-terminale de SH3AP1 utilisée comme appât dans le système du double hybride.

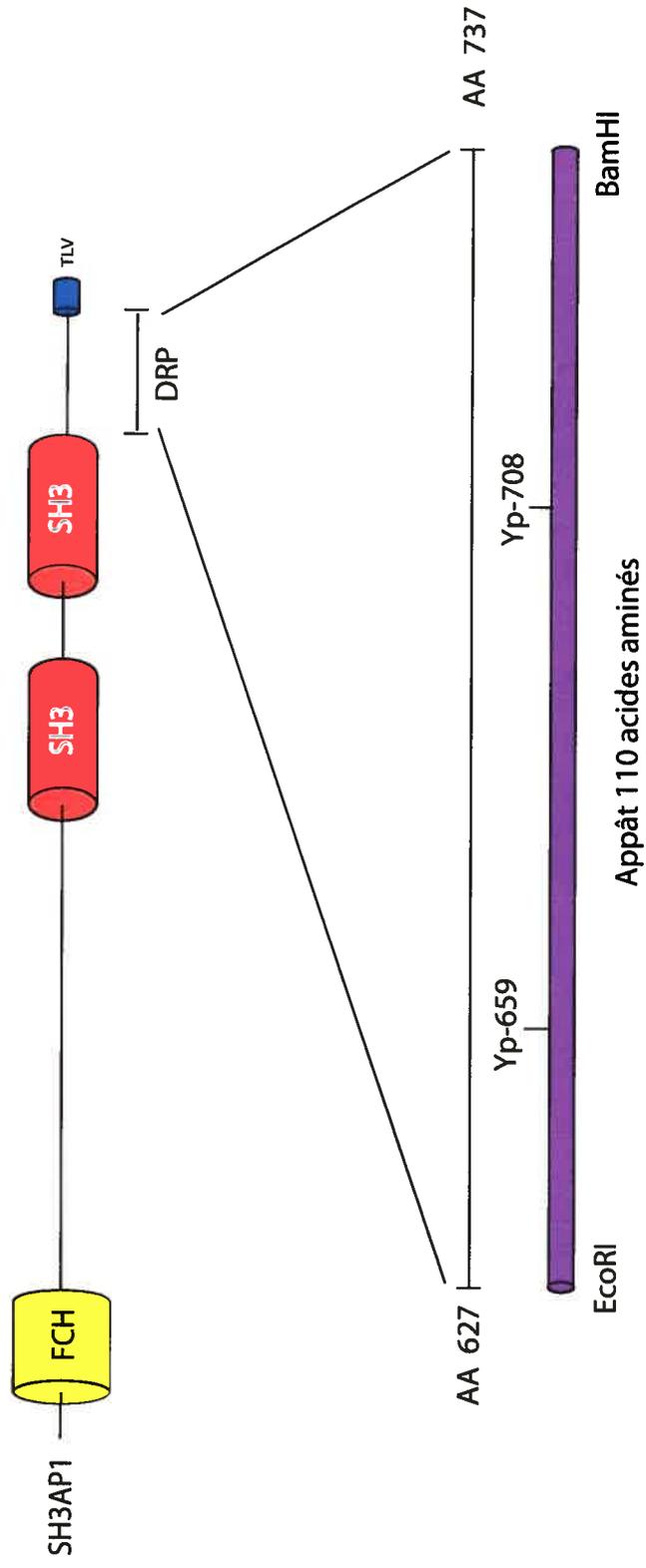


Figure 20. L'appât. La partie C-terminale de SH3AP1 a été utilisée pour le criblage des bibliothèques d'ADNc de tissus de poumons et de glandes mammaires humains. L'appât a été cloné dans le vecteur pBTM116+Src entre les sites de restriction EcoRI et BamHI.

2.4 Transformation séquentielle des levures

Des levures de la souche L40 α d'abord ont été transformées à petite échelle avec un vecteur contenant l'appât selon le protocole du système MATCHMAKER GAL4 de la compagnie Clontech. Des cellules compétentes de levure ont été préparées à partir d'un stock de levures de la souche L-40 α (souche sauvage).

Une pré-culture de 16 h qui a d'abord été obtenue à partir d'une colonie de levure dans un volume de 50 mL de milieu YPD (Difco) (20g/L de Difco peptone, 10 g/L d'extrait de levures) est incubée à 30°C avec une agitation de 250 rpm. La culture a ensuite été diluée afin d'obtenir une DO₆₀₀ (densité optique à 600 nanomètres) de 0.2 à 0.3 dans 300 mL de YPD et cette nouvelle culture a été placée à 30°C avec une agitation de 230 rpm jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0.4 à 0.6, soit après environ 3 heures d'incubation. Après une centrifugation des cellules à 1 000 x g pendant 15 minutes à la température de la pièce, trois lavages un de 300 mL, un de 100 mL et un de 50 mL ont été effectués avec de l'eau stérile avec une centrifugation de 5 à 15 minutes à 1 000 x g entre chaque lavage. Un dernier lavage a finalement été effectué en utilisant 10 mL d'une solution de TE/LiAc 1X. Les cellules compétentes de levures ont enfin été re-suspendues dans un volume de 1.5 mL de TE/LiAc 1X. Un volume de 100 μ L (1×10^6) de cellules compétentes de levures a été incubé pendant 30 minutes à 30°C avec une agitation de 200 rpm avec 0.1 μ g d'ADN provenant du vecteur contenant l'appât SH3AP1, 0.1 mg d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 minutes à 95°C et 600 μ L d'une solution de PEG/LiAc 1X. Le PEG (polyéthylène glycol) est utilisé afin de protéger les cellules des effets nuisibles de la forte concentration de lithium acétate. Celles-ci ont ensuite été traitées avec 70 μ L de DMSO, afin d'obtenir une meilleure efficacité de transformation des levures, puis placées dans un bain à 42°C pendant 15 minutes et finalement sur la glace pendant 1 à 2 minutes pour produire un choc thermique. Après une brève centrifugation, les cellules ont été re-suspendues dans 500 μ L de tampon TE 1X, puis un volume de 100 μ L a finalement été étalé sur un milieu solide SD minimal ne contenant pas de tryptophane (20 g/L de Difco peptone, 10 g/L d'extrait de levures et 20 g/L et 20 g/L d'Agar) et ne contenant pas de Trp (tryptophane).

Une transformation à grande échelle a été réalisée par la suite, toujours selon le même protocole, afin d'introduire la banque d'ADNc désirée dans la souche de levure contenant déjà l'appât. La banque d'ADNc de cellules de poumons humains (Clontech) et d'ADNc de glandes mammaires (Clontech) contenaient respectivement 3.0×10^6 de clones indépendants. Après préparation des cellules compétentes de levure dans du milieu SD-trp dans le but de maintenir la sélection pour les levures précédemment transformées avec le vecteur contenant l'appât, un volume de 1 mL de ces cellules a été incubé pendant 30 minutes à 30°C avec une agitation de 200 rpm avec 50 µg de plasmide de la banque d'ADNc choisie, 2 mg d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 minutes à 95°C et 6 mL d'une solution de PEG/LiAc 1X. Les cellules ont ensuite été traitées avec 700 µL de DMSO, puis placées dans un bain à 42°C pendant 15 minutes et finalement déposées sur la glace pendant 1 à 2 minutes. Après une brève centrifugation, elles ont été re-suspendues dans 10 mL de tampon TE 1X. Un volume de 200 µL a été étalé sur 50 boîtes SD-trp-leu-his+3-AT (5mM, 3mM, 2mM et 1mM) (Sigma #A-8056) de 15mm de diamètre. La sélection sur milieu nutritionnel permet de vérifier l'expression de l'un des gènes rapporteurs de ce système: le gène HIS3. Le 3-amino-1,2,4-triazole est un inhibiteur compétitif de la protéine de levure HIS3 et est utilisé pour supprimer les clones qui expriment ce gène rapporteur à un faible niveau afin de réduire la croissance de faux positifs sur un milieu déficient en histidine. Des contrôles d'efficacité de la transformation ont également été préparés en étalant un volume de 100 µL de dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} de la transformation sur des boîtes SD-trp-leu.

2.4.1 Calcul de l'efficacité de la transformation

L'efficacité de la transformation à grande échelle a été calculée d'après la formule suivante (protocole Clontech):

Nombre de colonies x volume total de la suspension (µL)	= cfu/µg ADN
Volume étalé (µL) x facteur de dilution x quantité d'ADN utilisée (µg)	

En multipliant le résultat obtenu par la quantité de plasmide de la banque d'ADNc utilisée, on trouve le nombre approximatif de clones de la banque d'ADNc qui ont été criblés: $\text{cfu}/\mu\text{g} \times \text{quantité de plasmide utilisée } (\mu\text{g}) = \text{nombre de clones criblés}$.

Ce calcul est très important, car on doit s'assurer d'avoir fait le tour de la banque d'ADNc au moins une fois, et même idéalement deux à trois fois, pour ne pas passer à côté de certaines interactions. Chaque banque d'ADNc est différente, mais elles contiennent généralement environs 3.5 millions de clones indépendants.

2.4.2 Test de la β -galactosidase

Le test de la β -galactosidase sur filtre permet d'écartier les faux positifs et de vérifier l'expression du deuxième gène rapporteur présent dans ce système, le gène LacZ, dont l'expression conduit à la production de β -galactosidase (162). Ce test est particulièrement efficace pour cribler un grand nombre de colonies ayant survécu à la sélection auxotrophique HIS3. Les colonies de levure qui ont poussé sur milieu nutritionnel sélectif et qui exprimaient par conséquent le gène rapporteur histidine, ont été repiquées sur une boîte contenant le même milieu (SD-trp-leu-his+3-AT). Un filtre est ensuite placé sur la boîte, puis décollé et trempé deux fois dans l'azote liquide, pendant 10 secondes pour un filtre de 10 mm de diamètre et 30 secondes pour un filtre de 15 mm, avec une pause suffisante pour qu'il dégèle entre les deux. Ces deux cycles de gel/dégel permettent de briser la paroi des levures afin de pouvoir déterminer l'activité β -galactosidase (164). Le filtre est ensuite posé à l'endroit, dans un pétri qui contient un autre filtre imbibé d'une solution composée de 0.27% de β -mercaptoéthanol et de 1.67% d'une solution de X-Gal dans du tampon Z (100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Le pétri est finalement incubé à 37°C. Les colonies positives sont celles qui deviennent bleues au contact de la solution après une période d'incubation variable allant de 20 minutes à 1 heure.

2.5 Séquençage et identification des clones positifs

Les clones qui sont encore positifs après le test de la β -galactosidase sont sélectionnés pour le séquençage. L'ADN est d'abord extrait à partir d'une culture de 16 heures obtenue en inoculant environ 3 mL de SD-leu, toujours pour maintenir la sélection pour le plasmide de la protéine isolée dans la banque d'ADNc, avec une colonie de levure et en agitant à 250 rpm à 30°C. Les levures sont centrifugées 5 minutes à 1 000 x g et l'ADN plasmidique est ensuite extrait en ajoutant 20 μ L de lyticase à 5 unités/mL (Sigma) au liquide résiduel (protocole Clontech). Cet ADN est ensuite purifié en effectuant 2 extractions: l'une à l'aide d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25:24:1 et l'autre avec une solution chloroforme/alcool isoamylique 24:1, effectuées volume à volume, selon des protocoles standards (164). L'ADN est par la suite précipité dans 2.5 volumes d'éthanol 100% et 0.5 volume d'acétate d'ammonium 7.5M, selon des protocoles standards, puis enfin resuspendu dans 20 μ L d'eau.

L'ADN plasmidique extrait des levures est par la suite transformé par électroporation dans la souche de bactéries électrocompétentes HB101-leu (165) en utilisant de 1 à 3 μ L d'ADN et 40 μ L de bactéries, dans des cuvettes de 1 mm prévues à cet effet, et en ajustant la résistance de l'électroporateur (BioRad) à 200 Ω , la capacitance à 25 μ F et le voltage à 25kV, selon les protocoles standards (166). Un volume de 960 μ L de milieu SOC (900ml d'H₂O distillée, 20g de Bacto Tryptone, 5g Extraits de levures Bacto, 2ml de 5M NaCl, 2.5ml de 1M KCl, 10ml de 1M MgCl₂, 10ml de 1M MgSO₄, 20ml de 1M glucose, ajuster le volume final à 1L d'eau distillée, stériliser par autoclavage) est ensuite ajouté aux cellules et à l'ADN après leur électroporation, puis le tout est incubé pendant 1 heure à 37°C avec une agitation d'environ 230 rpm. Après centrifugation, le culot de bactéries est d'abord re-suspendu dans un volume de 100 μ L d'eau puis étalé sur milieu minimal M9-leu contenant 100 μ g/ml d'ampicilline (Stock de 50-100 mg/mL H₂O). Le milieu M9 a été préparé avec 30 g/L de Na₂HPO₄, 15 g de KH₂PO₄, 5 g de NH₄Cl, 2.5 g de NaCl et 900 ml d'H₂O. Après autoclavage, 1 ml d'une solution à 1M de MgSO₄, 10 ml d'une solution de Glucose à 20%, 0.1 ml d'une solution de Thiamine de 0.5% sont ajoutés.

Après 36 à 48 heures de croissance, les colonies sont utilisées directement pour une amplification de l'insert dans le vecteur pACT2 par PCR (Polymerase Chain Reaction), à l'aide de l'enzyme Taq polymérase (Amersham Pharmacia). Pendant la réaction, les échantillons sont soumis à une température de 94°C pendant 5 minutes pour commencer à dénaturer l'ADN à amplifier, puis 30 cycles sont effectués selon les conditions suivantes: 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C ou 68°C, selon la paire d'oligonucléotides utilisée et finalement, 2 minutes d'élongation à 72°C.

Une période supplémentaire de 7 minutes d'élongation à 72°C est ajoutée à la fin des cycles afin d'aider à terminer l'élongation des produits de PRC amorcée durant le dernier cycle. Les amorces utilisées pour générer un fragment d'approximativement 1 Kpb (GAD2F : 5'CATTTCGATGATGAAGATACCCACCA-3' et M3R2 : 3'-CCCCAAAA AGTCATAGATGCTA-5').

Les produits de PCR sont ensuite chargés sur un gel d'agarose à 1% afin de vérifier qu'il y a bien eu amplification des fragments désirés. Puis, ceux-ci sont purifiés à l'aide de la trousse GENE CLEAN (Bio101) selon le protocole du fabricant. Une réaction de séquence est ensuite effectuée en utilisant l'oligonucléotide 5' approprié de même que le mélange pour séquençage *ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction kit* (Perkin-Elmer) ou bien par *Big Dye terminator version 3.1 de Applied Biosystems*. La réaction est amorcée par une dénaturation préliminaire de l'ADN de 30 secondes à 95°C, suivie de 30 cycles composés de 10 secondes de dénaturation à 96°C, 5 secondes d'hybridation à 50°C et 4 minutes d'élongation à 60°C pour *ABI PRISM dRhodamine Terminator*. Les produits de séquence sont ensuite purifiés à l'aide de colonnes Centri-Step (Princeton Separations) selon le protocole du fabricant. Les séquences sont lues par un séquenceur ABI PRISM 377 puis finalement alignées avec celles contenues dans les banques de données à l'aide du programme BLAST sur le site web de NCBI dans le but d'identifier les clones obtenus.

2.6 Confirmation des interactions dans la levure

Les clones analysés comme contenant des séquences codantes avec un cadre de lecture ouvert sont sélectionnés pour être analysés. L'ADN plasmidique de ces clones est extrait à l'eau bouillante selon les protocoles standards (166). Des levures L40 α sont co-transformées à petite échelle avec cet ADN plasmidique et avec le plasmide contenant l'appât. Cette expérience nous permet de confirmer dans la levure l'interaction positive trouvée précédemment lors du criblage de la librairie d'ADNc. Des contrôles sont ajoutés. Des levures sont transformées seulement avec l'appât et sans la proie et vis-versa. Les transformations sont effectuées selon les protocoles standards de Clontech, puis sont étalées sur des milieux solides de SD-Trp, SD-Trp,-Leu et SD-Trp,-Leu,-His. Un test de la β -galactosidase est effectué sur les colonies ayant poussées sur les trois milieux afin de confirmer dans la levure l'interaction entre l'appât et le clone positif (proie), repêché précédemment, et aussi afin de confirmer que l'appât seul et la proie seule n'activent pas l'expression du gène rapporteur Lac Z (auto-activation).

2.7 Confirmation dans les cellules de mammifères des interactions déjà identifiées chez la levure

2.7.1 Clonage des protéines candidates dans un vecteur d'expression avec un tag moléculaire pour les cellules de mammifère

Le clone sélectionné pour la confirmation de son interaction avec SH3AP1 dans les cellules de mammifère a d'abord été amplifié par une réaction de PCR en utilisant l'oligonucléotide 5' GAD2F qui avait antérieurement servi à son amplification et qui contient un site restriction pour l'enzyme Sal1. Un oligonucléotide 3' spécifique a été conçu pour chaque clone afin d'insérer un site de restriction pour l'enzyme Xho1 à la fin de la protéine. L'amplification a été réalisée en utilisant ces oligonucléotides de même que l'enzyme High Fidelity Expand (Roche Diagnostics) et de l'ADN correspondant aux clones désirés obtenus lors de la miniprep de bactéries. Les mêmes cycles décrits précédemment ont été utilisés avec l'étape d'hybridation à 55°C. Les produits de PCR ont été purifiés par GENECLEAN selon le protocole du manufacturier (Bio101). Par la

suite, ces produits de PCR ont été digérés avec les enzymes de restriction Sal1 et Xho1 selon les conditions suivantes: 2 μ L de Sal1 (NEB, 10 000 unités/ μ L), 1 μ L de Xho1 (NEB, 20 000 unités/ μ L), 5 μ L de tampon 3 (NEB), 2 μ L de BSA (NEB), 27 μ L d'ADN et 13 μ L d'eau. La réaction a été incubée pendant 2 heures à 37°C. Les fragments correspondant à la bande désirée sur un gel préparatif d'agarose de 1% ont ensuite été extraits de ce gel puis purifiés à l'aide de la trousse GENECLEAN (Bio101).

Une réaction de ligation a ensuite été réalisée en utilisant 0.5 μ L de tampon ligation, 0.5 μ L de T4 DNA ligase, 2 μ L d'insert, 0.5 μ L de vecteur pACTAG2-HA et 1.5 μ L d'eau. Cette réaction a été incubée 1 heure à la température de la pièce pour ensuite être transformée dans des bactéries DH5 α compétentes. Un volume de 5 μ L de la réaction de ligation a été incubé avec 50 μ L de bactéries compétentes sur de la glace pendant 30 minutes. Un choc thermique a ensuite été effectué en incubant l'ADN et les bactéries pendant 45 secondes dans un bain à 42°C puis en les remettant sur de la glace pendant 1 à 2 minutes avant de les placer à 37°C pendant une heure avec une agitation de 230 rpm. Les bactéries ainsi transformées ont finalement été étalées sur milieu LB+ampicilline (50-100 μ g/mL).

2.7.2 Co-transfection des cellules 293A

Des cellules de mammifère de la lignée 293A (lignée de cellules embryonnaires de rein humain) ont été transfectées à l'aide du système lipofectamine PLUS (Life Technologies) selon le protocole du fabricant. Les co-transfections ont été réalisées en utilisant l'ADNc de SH3AP1 cloné dans le vecteur pCDNA3-FLAG et chacune des constructions de la protéine candidate dans le vecteur pACTAG2-HA. Les vecteurs pCDNA3-FLAG et pACTAG2-HA vides ont également été utilisés avec, respectivement, chacune des protéines candidates et SH3AP1 en guise de contrôle négatif pour les expériences de co-immunoprécipitation. Les cellules ont été transfectées dans des pétris de 100 mm en utilisant une quantité totale d'environ 4 μ g d'ADN comprenant deux constructions ainsi qu'un vecteur contrôle qui exprime la protéine GFP afin de pouvoir évaluer l'efficacité de la transfection. Nous avons fait le choix d'utiliser les lignées cellulaires 293A car elles avaient un niveau d'expression de SH3AP1 moyen (Figure 9) et l'expression de Vav-1

n'a pas été testée mais nous avons tenu compte de la littérature qui spécifiait clairement que Vav-1 n'était exprimé que dans les cellules hématopoïétiques, ce qui nous permettait d'éviter toute interférence avec l'expression de Vav-1 endogène.

2.7.3 Lyse des cellules et co-immunoprécipitations

Les cellules ont été lysées environ 48 heures après la transfection afin de réaliser des immunoprécipitations à partir des extraits cellulaires totaux selon les protocoles standards (166). Les cellules ont été lavées deux fois avec une solution de PBS et incubées 30 minutes sur glace avec 900 μ L de tampon de lyse (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.6% NP-40) auquel un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Roche Diagnostics) a été ajouté. Par la suite, les cellules ont été transférées dans un tube sur la glace, à l'aide d'un grattoir à cellules, puis centrifugées à 15000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Une fraction du surnageant a été conservée comme échantillon de lysat cellulaire total et le reste de celui-ci a été partagé afin de réaliser trois immunoprécipitations: la première avec l'anticorps monoclonal de souris anti-FLAG M5 (Sigma) utilisé à une concentration finale de 10 μ g/mL, la seconde avec un anticorps monoclonal de rat anti-HA 3F10 (Roche Diagnostics) utilisé à une concentration finale de 1 μ g/mL et la dernière avec un anticorps monoclonal de souris pur anti-IgG à une concentration finale de 2 μ g/mL comme contrôle négatif. Ces réactions ont été incubées à 4°C pendant 3 heures sur une plaque rotatrice. Par la suite, un volume de 45 μ L de billes de protéine G SépharoseTM (Amersham BioScience) à une concentration de 50% en suspension dans une solution de PBS a été ajouté aux réactions avant de les incuber une heure de plus sur la plaque rotatrice à 4°C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 4°C pendant 8 secondes à une vitesse de 1000 rpm afin de précipiter les billes de protéine G sépharose puis celles-ci ont été resuspendues dans 1 mL de tampon de lavage constitué d'un mélange 1:1 du tampon de lyse et de tampon NET-gel (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1mM EDTA pH 8, 0.25% gélatine, 0.02% azide de sodium). Deux autres lavages ont ainsi été effectués et les billes ont finalement été resuspendues dans 20 μ L de tampon de charge pour gels de protéines SDS 2X. Un volume de 30 μ L du même tampon a aussi été ajouté aux échantillons de lysats cellulaires totaux.

2.7.4 SDS-PAGE et Immunobuvardages Western

Après les immunoprécipitations et les lavages, les échantillons ont été mis sur gel SDS-PAGE de 10 % pour ensuite transférer les protéines sur des membranes de nitrocellulose, afin de pouvoir réaliser des immunobuvardages selon des protocoles standards (166). Tous les échantillons ont d'abord été placés pendant 5 minutes dans un bain de sable à 105°C, afin de dénaturer les protéines et de les décrocher des billes de protéine G sépharose, puis mis sur la glace pendant 2 à 3 minutes avant d'être centrifugés à 4°C pendant 8 secondes à une vitesse de 1000 rpm. Un volume de 10 µL des échantillons immunoprécipités et de 15 µL des échantillons de lysat cellulaire total ont ensuite été chargés sur un gel 10%. Après leur migration sur gel, les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Hybond™ ECL™ AmershamBioScience) pendant une heure à 100V (ou toute la nuit à 30V). Ces membranes ont été incubées par la suite dans une solution de lait 5% dans un tampon de PBS-Tween 20 (0.1%) sur une plaque agitatrice pendant une heure à température ambiante (ou encore toute la nuit à 4°C) afin de bloquer les sites de liaison des protéines non spécifiques sur la membrane.

Des immunobuvardages ont ensuite été réalisés en ajoutant à l'une des membranes un anticorps primaire anti-FLAG M5 monoclonal de souris (Sigma) à une concentration finale de 0.5 µg/mL, puis à l'autre membrane un anticorps anti-HA 12CA5, produit à partir de surnageant d'hybridome de souris, dilué cinq fois dans une solution de lait 5% dans du PBS-Tween 20 (0.1%). Les deux membranes ont été incubées sur une plaque agitatrice pendant 2 heures à température ambiante (ou encore toute la nuit à 4°C). Celles-ci ont ensuite été lavées une fois 15 minutes et trois fois 5 minutes dans une solution de PBS-Tween 20 (0.1%) sur une plaque agitatrice à température de la pièce, puis incubées avec un anticorps secondaire anti-souris-HRP (Roche Diagnostics) à une concentration finale de 0.4 mg/mL dans une solution de lait 5% dans du PBS-Tween 20 pendant une heure à température ambiante sur une plaque agitatrice. Les membranes ont par la suite encore été lavées une fois 15 minutes et trois fois 5 minutes dans une solution de PBS-Tween 20 (0.1%) sur une plaque agitatrice à température de la pièce.

Ces dernières ont finalement été incubées une minute à température de la pièce, sur une surface lisse et propre, avec les deux réactifs d'une trousse de chemiluminescence pour

immunobuvardages Western (NEN Life Science), puis développées sur film Kodak X-AR à différents temps d'exposition.

2.8 GST-Pull-Down

Le test GST *Pull-Down* est une technique *in vitro* qui consiste en la production d'une protéine de fusion "proie-GST". La protéine proie porte un tag GST qui permet de l'immobiliser sur des billes de glutathione sepharose 4B. Par la suite un lysat cellulaire de la protéine appât (C-terminale de SH3AP1 aa 637-737) a été mélangé avec la protéine proie-GST, l'ensemble est incubé à 4°C pendant 1 heure sur un agitateur en rotation, lavé successivement avec une solution de PBS afin d'éliminer l'excédent de protéines fixées non spécifiquement, l'ensemble (proie et appât) est ensuite élué avec une solution tampon (Glutathion Elution buffer) et mis à migrer sur un gel SDS-polyacrylamide de 12%.

Pour faire ce test *in-vitro*, les inserts encodant divers domaines de la protéine candidate (proie repêchée à l'aide du système du double hybride de la levure) préalablement clonés dans le vecteur pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) aux sites BamH1/Xho1.

Les constructions ont été vérifiées par séquençage avant la transformation des bactéries compétentes de souche E.Coli BL21. Les bactéries transformées ont été étalées sur milieu LB+ampicilline (50-100 µg/mL). Après 24 heures d'incubation, une colonie a été prélevée et inoculée dans 100 ml d'un milieu liquide de 2x YT(2X Yeast Tryptone Media), contenant 16g de tryptone, 10g d'extrait de levures, 5g de NaCL, dans 900 ml d'H2O distillée. Le pH a été ajusté à 7.0 avec du NaOH puis le milieu a été autoclavé pendant 20 minutes à 120°C puis lorsque refroidi à 50°C 1 ml d'Ampicilline (50-100µg/ml) a été rajouté au milieu. La culture a été incubée toute la nuit sous agitation à 250 rpm à 37°C, puis diluée 1/100 avec du milieu 2xYT frais. L'incubation à 37°C, s'est poursuivie jusqu'à ce que la densité cellulaire (DO) mesurée à 600 nm atteigne 0.5-2. À ce moment là, une concentration de 100 mM d'IPTG a été rajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 0.1-1,0 mM. Cette solution a été préalablement préparée par dissolution de 0.5g d'isopropyl-β-D-thiogalactoside dans 20 ml d'eau, puis filtrée et aliquotée dans des tubes à raison de 0.5 ml par tube. L'incubation a duré de 4 à 6 heures.

Par la suite, la culture a été transférée dans des flacons et centrifugée à 7700 x g pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules ont été ensuite déposées sur de la glace puis remises en suspension dans 50 µl de PBS 1x par ml de culture de départ. Elles ont ensuite été lysées par sonication, conformément aux directives du manufacturier. Une solution contenant 20% Triton X-100 pour une concentration finale de 1% a été ajoutée pour aider la solubilisation de la protéine de fusion. L'ensemble a été mélangé et incubé à la température de la pièce sous agitation pendant 30 minutes afin d'aider la protéine de fusion à solubiliser. À la fin de l'incubation, le lysat a été centrifugé à 12 000 x g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant prélevé pour analyse sur gel SDS-PAGE. Le reste a été conservé à 4°C pour réaliser le test de GST-Pull-Down avec SH3AP1-myc. L'ADNc de SH3AP1 a été cloné dans le vecteur pCDNA3-myc aux sites *EcoR1/BamH1*. Les cellules 293A ont été transfectées par le vecteur contenant pCDNA3-SH3AP1-myc en utilisant le réactif Lipofectamine (Gibco BRL, MD) en accord avec les instructions du manufacturier. Après 48h les cellules ont été lysées pour réaliser le test de GST pull down tel que décrit précédemment.

2.9 Identification des résidus impliqués dans l'oligomérisation de SH3AP1

Deux constructions, une de la forme courte et une de la forme longue de SH3AP1 type sauvage, ont été réalisées dans un vecteur avec l'étiquette FLAG en position N-terminale. Ces trois constructions serviront de contrôle positif. Trois autres constructions qui ont été réalisées contiennent des mutations ponctuelles qui ont été générées par mutagenèse dirigée. Le mutant 1 contient une mutation dans la première région coil-coiled (L141P), le mutant 2 contient une mutation dans la deuxième région coil-coiled (I371P) et le mutant trois contient les deux mutations (L141P) et (I371P). Après co-transfection des cellules de la lignée 293A avec ces différentes constructions, celles-ci ont été incubées pendant 48 heures dans du DMEM avec 10% de sérum puis ont été lysées avec un tampon de lyse. Le lysat cellulaire a été partagé en 5 échantillons et à chacun on a ajouté une concentration de DSS (Disuccini-mydil suberate)(167) croissante (0, 5, 10, 25, 50 µg/ml). L'ensemble a été incubé pendant 30 minutes à température de la pièce. Chaque

échantillon a ensuite été chargé dans un puits de gel SDS-PAGE 10% puis le gel transféré sur nitrocellulose a été immunobuvarde en utilisant un anticorps anti-Flag. Le DSS est un réactif bi-fonctionnel qui peut former des liaisons covalentes avec les groupements amines des protéines. Le groupe α -amine présent à l'extrémité N-terminale des peptides réagit avec le NHS-ester, comme les groupes α -amines sont rarement disponibles, alors la réaction se fait de l'autre côté de la chaîne et seulement l' ϵ -amine sur les lysines qui réagit avec le NHS-ester.

2.10 Arbre phylogénétique des protéines à deux domaines SH3 de la famille FCH

L'alignement simultané des séquences nucléotidiques et des séquences d'acides aminés est devenu un outil indispensable en biologie moléculaire. L'alignement multiple est utilisé afin de mieux caractériser une famille de protéines, pour détecter ou démontrer l'homologie entre une nouvelle séquence et une famille de séquences déjà existantes. Pour compléter notre étude, nous avons décidé de comparer les séquences d'ADN et d'acides aminés des protéines de la famille PCH de différents organismes afin de mieux comprendre la raison de la conservation de l'organisation de ces protéines de famille PCH/FCH durant l'évolution. Nous avons fait appel à un algorithme d'alignement de type clustalW. La majorité des alignements automatiques de séquences est maintenant rendue possible grâce à l'apparition de nouvelles approches et méthodes, une de ces nouvelles méthodes est appelée CLUSTAL W qui est rendu accessible et à la portée des ordinateurs et des différents systèmes d'exploitation. Il existe six différents formats de préparation des séquences EMBL/Swiss Prot, NBRF/PIR, Pearson/FASTA, GCG/MSF, GDE (Steven Smith, Harvard University Genome Center) pour l'alignement par ClustalW. Le programme ClustalW offre la possibilité à l'utilisateur de construire un arbre phylogénétique par Neighbour-Joining à partir d'alignements déjà existants (168).

CHAPITRE 3: Résultats

L'objectif de ce projet est de caractériser la partie C-terminale de SH3AP1. En effet, comme décrit précédemment, la partie C-terminale contient des tyrosines phosphorylées. Nous avons voulu comprendre le rôle potentiel de ces tyrosines dans les interactions protéines-protéines et éventuellement leurs rôles biologiques dans la signalisation cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé l'approche moléculaire. Nous avons utilisé le système du double hybride de la levure afin d'identifier les partenaires potentiels, nous avons testé les clones retrouvés avec le double hybride de la levure dans les cellules de mammifères et nous avons confirmé ces interactions par des techniques biochimiques comme la co-immunoprécipitation et le GST pull down.

3.1 Analyse du gène de SH3AP1 et de son produit

La séquence du clone de SH3AP1 identifié par interaction avec le domaine riche en proline de ZRP-1 dans le système du double-hybride contient un seul domaine SH3 en position C-terminale. Cette séquence a été utilisée pour cloner la forme complète de SH3AP1 par RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR). La forme longue possède deux domaines SH3 en position C-terminale (Figure 8).

Une séquence correspondant à celle de SH3AP1 (la forme courte) a été par la suite identifiée. Cette séquence a été déposée sous le nom de KIAA0769 dans la banque de données HUGE (Human Unidentified Gene-Encoded Large Proteins) sur le site web (<http://www.kazusa.or.jp/huge>). Il apparaît en fait que la séquence KIAA0769 est le produit d'un épissage différentiel du gène encodant la forme complète de SH3AP1.

L'analyse du profil d'expression de ce gène encodant pour la protéine SH3AP1 réalisée par RT-PCR-ELISA (RT-PCR-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) par le groupe du *Kazusa cDNA Project*, a confirmé les résultats d'un immunobuvardage Northern obtenus précédemment dans notre laboratoire indiquant que SH3AP1 (la forme longue) est exprimée à un niveau variant de élevé à très élevé dans tous les tissus testés (Figure 9). De plus, en consultant les banques de données du projet de séquençage du génome humain sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), il a été possible d'établir que

le gène qui code pour SH3AP1 était situé sur le chromosome 11, plus précisément au locus 11q13.4. Finalement, la caractérisation du gène a permis d'établir que l'épissage différentiel est responsable de l'obtention des deux formes de la protéine, dont l'une comprend un domaine PCH/FCH et un domaine SH3 et l'autre, plus longue, présente un second domaine SH3, une séquence riche en proline et une séquence consensus de liaison aux domaines PDZ en position C-terminale (Figure11).

3.2 Caractéristiques de la partie Carboxy-terminale de SH3AP1 (appât)

L'analyse de la séquence nucléotidique de SH3AP1 a permis l'identification de deux tyrosines pouvant potentiellement être phosphorylées en position 659 et 708, une séquence riche en prolines et une séquence consensus de liaison aux domaines PDZ en position C-terminale.

Afin de mieux caractériser la partie C-terminale de SH3AP1, nous avons voulu savoir si les deux tyrosines en position 659 et 708 étaient potentiellement phosphorylables.

Les cellules fibroblastiques 293A (lignée cellulaire embryonnaire de rein humain) ont été co-transfectées par lipofectamine avec la forme sauvage de SH3AP1 courte (2-571) utilisée comme contrôle, la forme longue (2-740) type sauvage et SH3AP (2-740) avec la tyrosine 708 mutée, le vecteur pCDNA3 vide et le même vecteur pCDNA3 contenant la kinase c-Src.

Les cellules 293A ont été transfectées séparément par la lipofectamine avec la forme longue de type sauvage SH3AP1 par la forme SH3AP1 dont la tyrosine 659 est mutée et par le vecteur pCDNA3 vide comme contrôle. Les cellules transfectées après 24 heures ont été privées de sérum dans le milieu de culture pour une période de 24 heures puis traitées avec 20% de sérum en présence de 0.1 mM de pervanadate (un inhibiteur des tyrosines phosphatases afin de garder les tyrosines à l'état phosphorylé) (Amersham-Pharmacia Biotech) pendant 30 minutes et tous les lysats cellulaires ont été immunoprécipités et analysés par immunobuvardage Western.

La figure 21 nous montre les deux tyrosines en positions successives 659 et 708 phosphorylées par Src et par addition de sérum.

Ces deux tyrosines ont donc le potentiel d'interagir avec des domaines SH2.

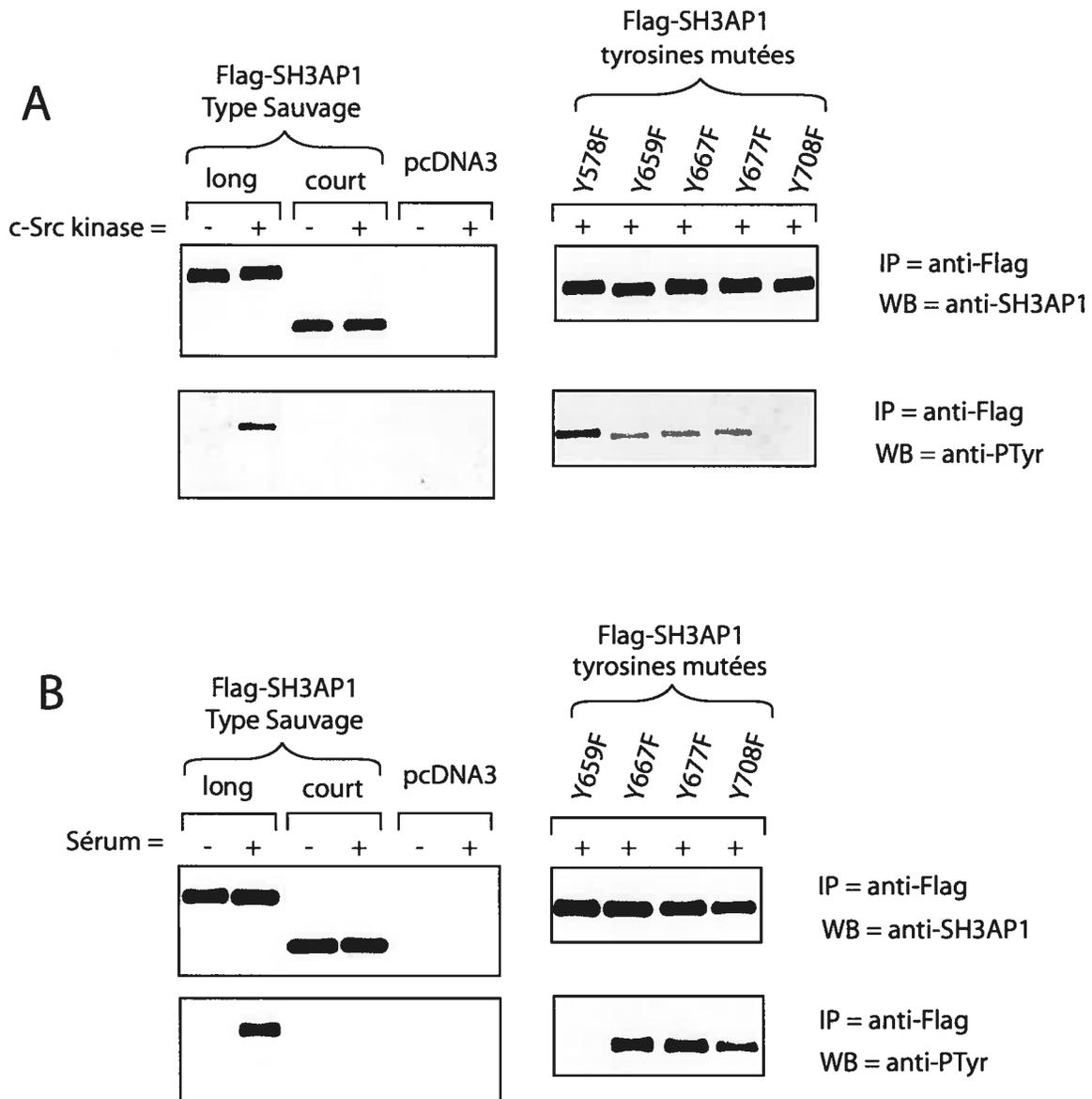


Figure 21. Étude des sites de phosphorylation sur les tyrosines de SH3AP1.

La planche A: L'immunoprécipitation avec un anticorps anti-Flag et un immunobuvardage avec un anticorps anti-pTyr (phospho-tyrosine). On constate que les deux formes de SH3AP1 type sauvage et mutés ont été exprimées et seule la tyrosine en position 708 est phosphorylée par Src.

La planche B: L'immunoprécipitation de Flag-SH3AP1 de type sauvage et mutés et l'immunobuvardage avec un anti-Flag nous montrent que SH3AP a été bien exprimée. La seconde immunoprécipitation avec un anti-pTyr nous montrent que la tyrosine en position 659 est phosphorylée par addition de sérum.

3.3 Résultats des criblages double-hybride chez la levure

La partie C-terminale de SH3AP1 constituée des acides aminés 627 à 737 et riche en prolines a été utilisée comme appât dans un vecteur pBTM116+src contenant le domaine de liaison à l'ADN du gène GAL4. Cette séquence ne contient pas les trois acides aminés TLV (séquence consensus pour les domaines PDZ). Deux bibliothèques ont été criblées, une de poumons et l'autre de glandes mammaires, ce qui correspond environ à 9.6×10^6 clones qui ont été criblés dans la bibliothèque de poumons et 1.3×10^6 de clones criblés dans la bibliothèque de glandes mammaires. De ce nombre, 225 colonies ont été obtenues sur milieu auxotrophe (SD-Trp-Leu-His) dont 115 colonies ont exprimé le deuxième gène rapporteur, LacZ, lors du test β -galactosidase, lors du criblage des bibliothèques de poumons. Lors du criblage de la seconde bibliothèque de glandes mammaires, nous avons obtenu 75 colonies sur milieu auxotrophe dont 55 colonies ont exprimé le deuxième gène rapporteur, LacZ, lors du test de la β -galactosidase. Tous les clones positifs ont été séquencés dans le but d'identifier la protéine à laquelle ils correspondaient après l'alignement de ces séquences dans les banques de données. Après analyse, beaucoup de ces clones étaient des faux positifs car ils n'avaient pas de cadre de lecture ouvert ou codaient pour des protéines déjà connues n'ayant pas d'interaction possible avec SH3AP1.

3.3.1 Description des clones positifs retrouvés dans les deux bibliothèques d'ADNc

Les clones positifs retenus au terme des différentes sélections et confirmations correspondaient aux protéines suivantes :

SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor) (169) est un membre de la famille SPI de type kazal. SLP1 inhibe l'élastase, la cathepsine G, la trypsine, et la chymotrypsine (170) et joue un rôle significatif contre les protéases des neutrophiles durant la réponse inflammatoire (171-174).

La fonction de SLP1 a été l'objet d'une étude massive en raison de sa capacité à inhiber les protéases. *SLPI* exerce une activité pléiotropique dans différents systèmes biologiques tels que la cicatrisation des plaies (175-177) et l'activation de NF- κ B (178). Plusieurs études ont rapporté qu'il y avait une corrélation directe entre le niveau d'expression du

gène *SLPI* et de la progression des tumeurs ovariennes (179-181). Néanmoins il n'a pas encore été démontré que SPL1 contribue au phénotype de malignité des cellules cancéreuses.

CREBBP (Retino-blastoma associated protein) a été identifiée comme interagissant avec des éléments comme CRE (cAMP-regulated enhancer). Il est connu que cet élément se lie aux différents facteurs de transcription incluant CREBBP qui est activé par la protéine kinase A (PKA). La phosphorylation de CREBBP par PKA stimule l'interaction avec un ou des facteurs de transcription ou bien permet le recrutement de co-activateurs (182-185).

DAXX (Fas binding protein) est un clone identifié dans la librairie de poumon; c'est une protéine ubiquitaire de 740 acides aminés. DAXX joue un rôle dans l'apoptose mais ce rôle reste néanmoins peu documenté. Il a aussi été démontré que la partie C-terminale de DAXX joue un rôle de répresseur transcriptionnel. En effet, la partie C-terminale de DAXX contient un domaine acide composé de ser/pro/thr. Ce domaine possède des homologies de séquence avec celui du co-répresseur transcriptionnel Sin-3 chez la levure (186). Alors que la fonction biochimique de DAXX reste matière à débat, sa localisation nucléaire n'est plus à démontrer. Des études ont démontré que DAXX se localise au noyau et qu'il contient deux séquences putatives de localisation nucléaires (187-188).

HCCA3 (HepatoCellular Carcinoma susceptibility protein)(189) et **AD029**, un autre clone identifié mais non encore caractérisé.

Villin 2 (ezrin) (VIL2), est impliquée dans la structure du cytosquelette de la membrane plasmique (190-192) et aussi dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules malignes de l'épithélium oesophagien (193).

Le clone **STIP1/STUB-1/CHIP-1** a été identifié deux fois dans deux librairies différentes, la librairie de poumons et celle de glandes mammaires. STIP1 est une protéine de 303 acides aminés contenant trois domaines tétratricopeptides (TRP) en position N-terminale et un domaine U-BOX en position C-terminale impliqué dans l'ubiquitination. C'est une protéine chaperonne exprimée en état de stress (Heat shock protein) (194) (Tableau 1A et 1B).

Les domaines TRP (tétratricopeptide) ont été décrits pour la première fois chez la levure (Cdc23 régulateur du cycle cellulaire). Ceux-ci comportent une répétition typique d'une

séquence identique de 34 acides aminés formant ainsi des domaines TRP. La fonction de ces domaines semble être liée aux interactions protéine-protéine. Ces domaines ont une préférence pour se lier aux domaines WD40.

Plusieurs autres clones repêchés correspondent à la protéine **hRev7** et **MAD2** qui sont des protéines impliquées dans la réparation des dommages causés à l'ADN chez les mammifères (hREV7) ou bien chez la levure (MAD2). hREV7 interagit avec la sous unité catalytique zêta de l'ADN polymérase (195-196).

ZF (Zinc finger protein) est une protéine qui a été repêchée deux fois, mais compte tenu de sa structure en doigts de zinc, il ne pouvait s'agir que d'un faux positif car elle est capable de se lier à l'ADN et ainsi activer la transcription du gène rapporteur LacZ sans pour autant avoir interagi avec SH3AP1 (197).

Les domaines en doigts de zinc ont été identifiés pour la première fois chez *Xenopus* dans le facteur de transcription TFIIIA. Depuis, ces domaines ont été retrouvés dans différentes protéines qui se lient à l'ADN. Les domaines en doigts de zinc sont composés de 25 à 30 acides aminés incluant deux résidus cystéine et deux résidus histidine conservés dans un motif C-2C-12-H-3-H. Les douze résidus séparant la seconde cystéine et la première histidine sont essentiellement polaire et basique ce qui montre que cette région est impliquée dans la liaison à l'ADN.

Myosine (myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle MYH11), est un autre clone positif intéressant qui a été repêché de la librairie d'ADNc de poumon. En effet Myo3p et Myo5p sont des protéines qui font partie du complexe Arp2/3 impliquée dans la nucléation de l'actine chez *S. cerevisiae* (198-199) L'interaction directe entre Myo3, Myo5 et le complexe Arp2/3 suggère qu'il existe un complexe formé de la chaîne lourde de Myosine et les protéines de la nucléation de l'actine, le tout formant un ensemble fonctionnel de signalisation qui induit l'assemblage de l'actine.

Finalement le clone 73 repêché de la librairie de poumons correspond à la protéine **VAV-1** (200). Ce clone contient seulement la partie C-terminale de Vav-1 constituée de deux domaines SH3 séparés par un domaine SH2. Étant donné que mon appât possède une séquence riche en prolines capable d'interagir avec des domaines SH3 et des tyrosines phosphorylées capables d'interagir avec les domaines SH2 je m'attendais à repêcher un candidat possédant soit un domaine SH2 soit un domaine SH3. C'est pour ces raisons que

j'ai continué mon étude avec la protéine Vav-1. Ce clone représentait donc un bon candidat pour une confirmation de l'interaction *in-vivo* dans les cellules de mammifères. (Figure 22, 23 et tableau 1)

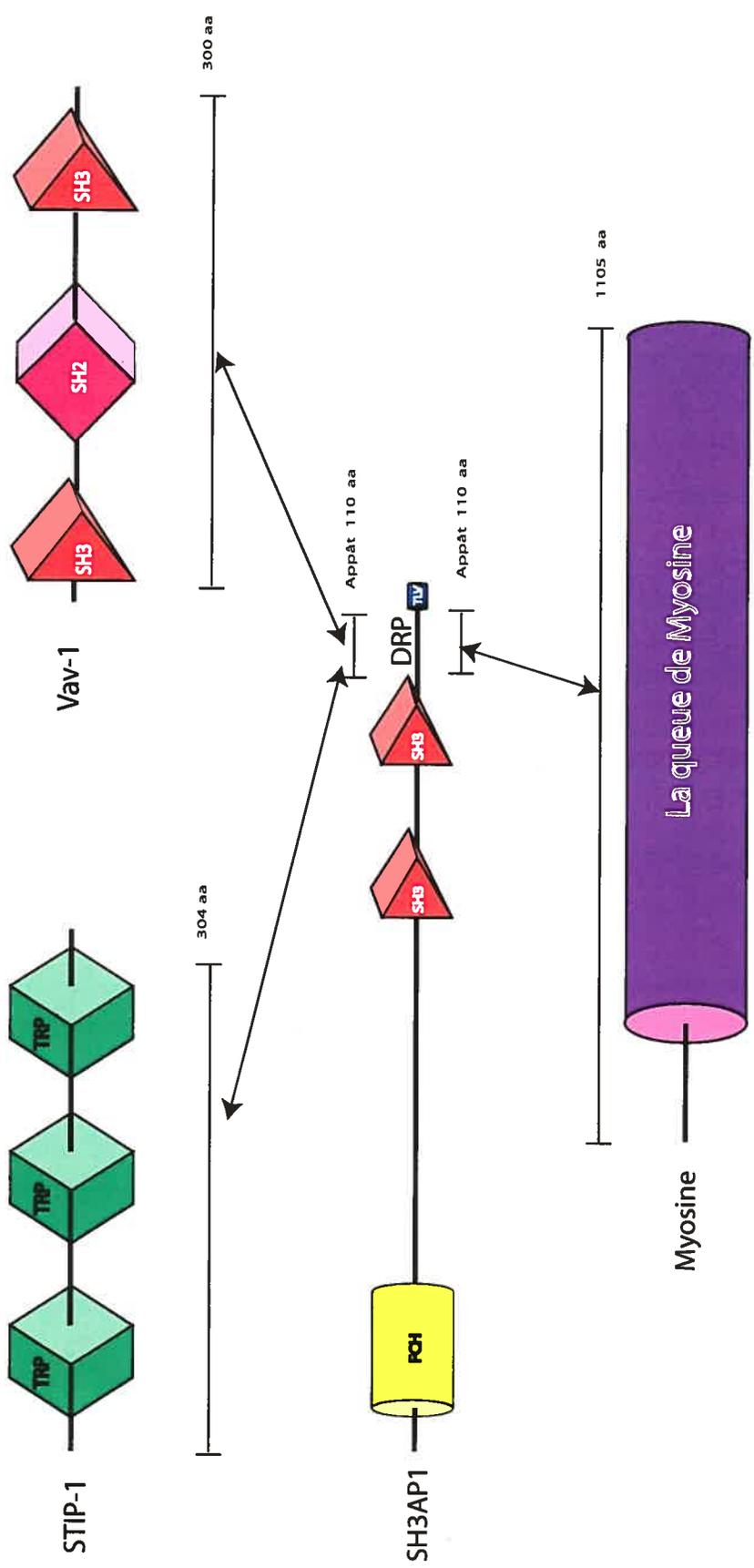


Figure 22. La représentation schématique des fragments de l'ADNc ayant interagi avec la partie C-terminale de SH3AP1 utilisée comme appât dans le système du double hybride chez la levure.
 En haut à gauche les trois domaines TRP (TétraTricoPeptides) de STIP-1, en haut à droite la partie C-terminale (Cassette) de Vav-1, au milieu une représentation de SH3AP1 et la partie ayant servi d'appât contenant un domaine riche en prolines (DRP) et enfin en bas la partie C-terminale de Myosine (Queue).

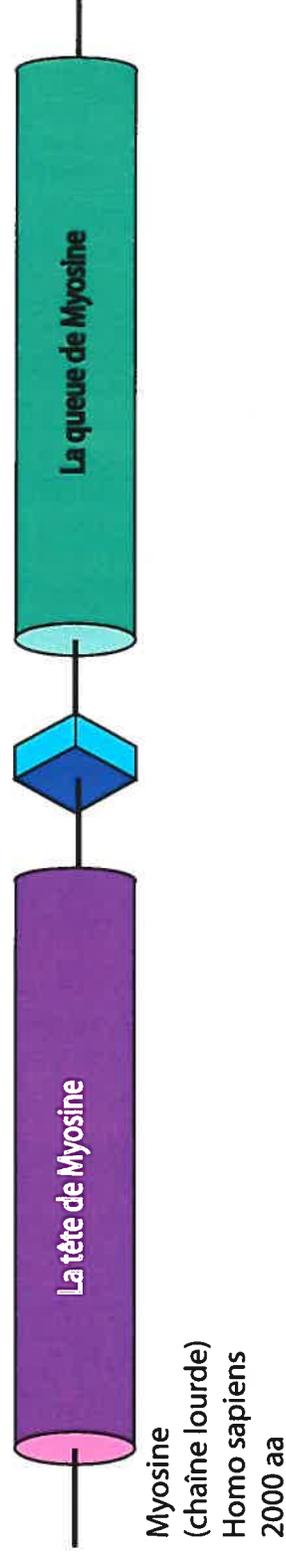
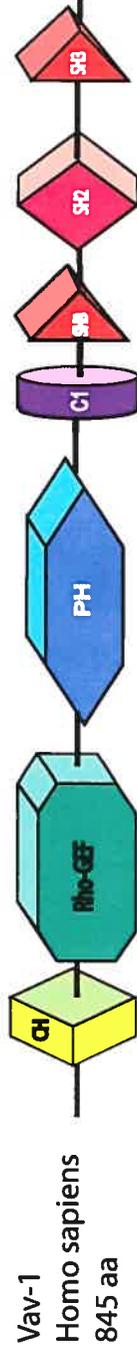
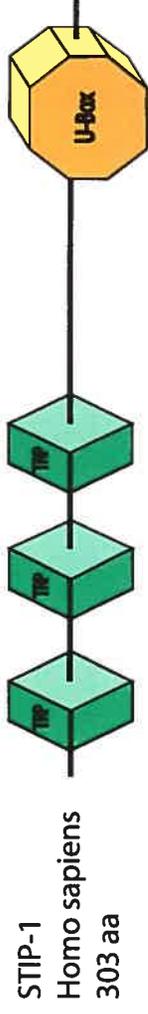


Figure 23 : La structure complète des trois principales protéines repêchées par le système du double hybride chez la levure. En haut la protéine STIP-1 de 303 acides aminés avec les trois domaines TricoPeptides en position N-terminale, en dessous, l'oncoprotéine Vav-1 de 845 aa avec ses domaines SH3 et SH2 en C-terminale et enfin la structure complète de la protéine Myosine de 2000 aa avec en position N-terminale la tête de la myosine.

Tableau 1A : Résultats du criblage de la librairie d'ADNc de poumon

Clones	Proteine	CDS	ORF	Poids (kDa)	mRNA (bp)	Position	Description
3	Myosin H11	oui	oui	95	2574	16p13.2	Joue un rôle dans la nucléation de l'actin
6	Lip-PolySaccharide	oui	oui	34	930		KIAA1704
9	HepatoCarcinomaSuccProt	oui	oui	36	794	18	Aucun rôle démontré
32	DAXX / RasBP	oui	oui	82	2222	6p21	Impliquée dans l'apoptose
61	CREBBP	oui	oui	21	1719	15q21	Protéine associée à la protéine du Retinoblastome
73	VAV-1	oui	oui	107	2888	19p13.2	Impliqué dans divers voies de signalisation cellulaires impliquant les Rho-GTPases
90	STIP1	oui	oui	34	1226	16p13.12	Régule négativement les protéines chaperonnes
138	Villin2	oui	oui	75	3166	6q25.2	Rôle dans le cancer de l'oesophage
148	Antileukoproteinase	oui	oui	22	598	20q12	Inhibiteur potentiel de l'élastase des leucocytes

Tableau 1B : Résultats du criblage de la librairie d'ADNc de glandes mammaires

Clones	Proteine	CDS	ORF	Poids (kDa)	mRNA (bp)	Position	Description
12	STIP1	oui	oui	34	1226	16p13.12	Régule négativement les protéines chaperonnes
13	h-Rev7	oui	oui	23.5	1136	1p36	Interagit avec la sous unité zeta de la polymérase
15	h-Rev7	oui	oui	23.5	1136	1p36	"
20	h-Rev7	oui	oui	23.5	1136	1p36	"
22	h-Rev7	oui	oui	23.5	1136	1p36	"
37	h-Rev7	oui	oui	23.5	1136	1p36	"
61	SNRP (SmallNucRibosomalProt)	oui	oui	19	514	11p15	Protéine ribosomale humaine
62	Zinc Finger	oui	oui				Protéine à doigts de Zinc
66	h-Rev7	oui	oui	23.5	1136	1p36	Interagit avec la sous unité zeta de la polymérase
69	h-Rev7	oui	oui	23.5	1136	1p36	"

3.4 Confirmations des résultats dans les cellules de mammifères

3.4.1 Clonage des constructions dans les vecteurs d'expression avec étiquette HA

Cinq constructions différentes de ce clone Vav-1 ont été réalisées afin d'identifier quel domaine de Vav-1 est impliqué dans l'interaction avec SH3AP1. Les constructions dans le vecteur pACTAG-2-HA sont les suivantes :

- 1) pACTAG2-SH3-SH2- SH3-HA
- 2) pACTAG2-SH2-SH3-HA
- 3) pACTAG2-SH3-HA (C-Ter)
- 4) pACTAG2-SH3-SH2-HA
- 5) pACTAG2-SH2-HA

Comme illustré dans la figure 24.

3.4.2 Immunoprécipitation et immunobuvardage Western

Des expériences de co-immunoprécipitation ont été entreprises pour confirmer, dans les cellules de mammifères, l'interaction identifiée dans la levure à l'aide du système du double hybride. La protéine Vav-1 a été sélectionnée parmi les clones repêchés dans les banques d'ADNc à l'aide de l'appât utilisé, afin d'être validées par des expériences de co-immunoprécipitation.

Les cellules de mammifères ont été co-transfectées simultanément avec la forme complète de SH3AP1 qui a été clonée dans un vecteur pCDNA3-FLAG et VAV-1 qui a été cloné dans le vecteur pACTAG2-HA. Les lysats cellulaires ont par la suite été immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-FLAG ou anti-HA. Des contrôles négatifs ont également été réalisés en transfectant les cellules avec pcDNA3-SH3AP1-Flag seule, le vecteur pACTAG2-HA vide ainsi qu'en immunoprécipitant les extraits cellulaires avec un anticorps anti-IgG. Le but de ces contrôles était de s'assurer de la spécificité des interactions entre SH3AP1 et la protéine candidate (VAV-1) afin de discriminer cette protéine des protéines endogènes en utilisant les anticorps anti-FLAG et anti-HA. Des immunobuvardages Western ont été effectués après le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose en utilisant à nouveau des anticorps anti-FLAG et anti-HA.

Le niveau d'expression de SH3AP1 et de la protéine candidate dans les cellules de mammifères peut être déterminé selon la présence d'une bande correspondant au poids moléculaire de la protéine, et l'intensité de celle-ci. L'expression de SH3AP1 est détectée dans le puits représentant l'immunoprécipitation et l'immunobuvardage Western avec l'anticorps anti-FLAG tandis que celle de Vav-1 est détectée dans le puits représentant l'immunoprécipitation et l'immunobuvardage Western avec l'anticorps anti-HA.

Dans le cas où l'interaction se produirait entre SH3AP1 et VAV-1, une bande correspondant au poids moléculaire de cette protéine Vav-1 peut être observée dans le puits représentant l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-FLAG et l'immunobuvardage Western avec l'anticorps anti-HA et/ou une autre bande correspondant au poids moléculaire de SH3AP1 dans le puits représentant l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-HA et l'immunobuvardage Western avec l'anticorps anti-FLAG.

Dans notre cas, la révélation de ces immunobuvardages sur film a permis d'observer que les protéines SH3AP1 et Vav-1 étaient bien exprimées dans les cellules de mammifères.

En effet, des bandes correspondant au poids moléculaire des protéines candidates (Vav-1 et SH3AP1) ont pu être observées dans les puits représentant les immunoprécipitations avec l'anticorps anti-FLAG et les immunobuvardées avec les mêmes anticorps anti-HA. L'inverse, soit une bande correspondant au poids moléculaire de la protéine SH3AP1 dans le puits représentant l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-HA et l'immunobuvardage Western avec l'anticorps anti-FLAG, n'a toutefois pas pu être démontré. Toutefois, une bande correspondant au poids moléculaire de Vav-1 interagissant avec SH3AP1 dans les cellules de mammifère a pu être détectée. Cependant, cette interaction a été aussi détectée dans les puits représentant les immunoprécipitations avec les anticorps anti-FLAG-SH3AP1 et les immunobuvardages Western avec l'anticorps anti-HA, en l'absence de la protéine SH3AP1 ainsi que lorsque les immunoprécipitations étaient réalisées en utilisant l'anticorps anti-IgG. Ces résultats ne nous ont donc pas permis de confirmer ou bien d'infirmer l'interaction entre SH3AP1 et Vav-1 *in vivo* (résultats non disponibles).

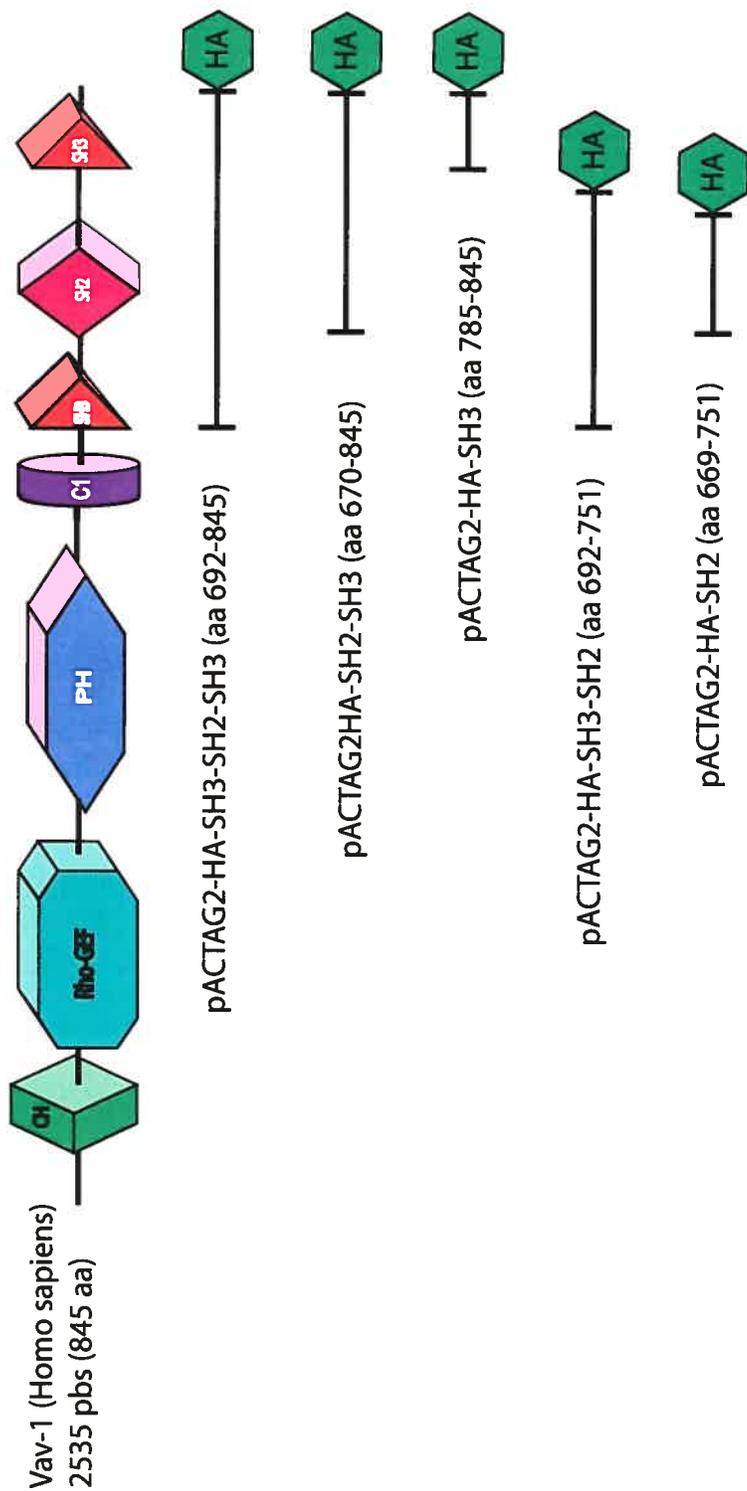


Figure 24. Les clones de Vav-1 dans le vecteur pACTAG2-HA. Tous les clones ont été utilisés dans les cellules 293A pour confirmer l'interaction entre SH3AP1-Flag et Vav-1-HA.

3.5 Confirmation de l'interaction entre SH3AP1 et Vav1 par GST-pull-down

Comme décrit précédemment, la protéine SH3AP1 possède dans sa partie carboxy-terminale une séquence riche en prolines et deux tyrosines phosphorylées. Ces motifs sont capables d'interagir avec des domaines SH2 et SH3 de Vav-1. Vav-1 contient dans la partie clonée ces deux types de domaines. Dans le but de démontrer l'interaction entre Vav-1 et SH3AP1, nous avons donc généré des constructions de Vav-1 incorporant différentes combinaisons de ces domaines afin de déterminer son mode d'interaction avec SH3AP1. Les différentes constructions, GST, GST-SH3N-SH2-SH3C, GST-SH2-SH3C, GST-SH3N-SH2 et GST-SH3C (figure 25) ont été produites et incubées en présence de lysats de cellules 293A transfectées avec un vecteur encodant SH3AP1-myc.

3.5.1 Clonage des constructions dans les vecteurs d'expression avec étiquette GST

Les cinq constructions suivantes ont été réalisées dans le vecteur pGEX-5X-3-GST :

- 1 GST- SH3-SH2- SH3 (692-846)
- 2 GST-SH2- SH3 (670-846)
- 3 GST-C-SH3 (785-846)
- 4 GST- SH3-SH2 (692-751)
- 5 GST-SH2 (669-751)
- 6 GST (seule) comme contrôle négatif

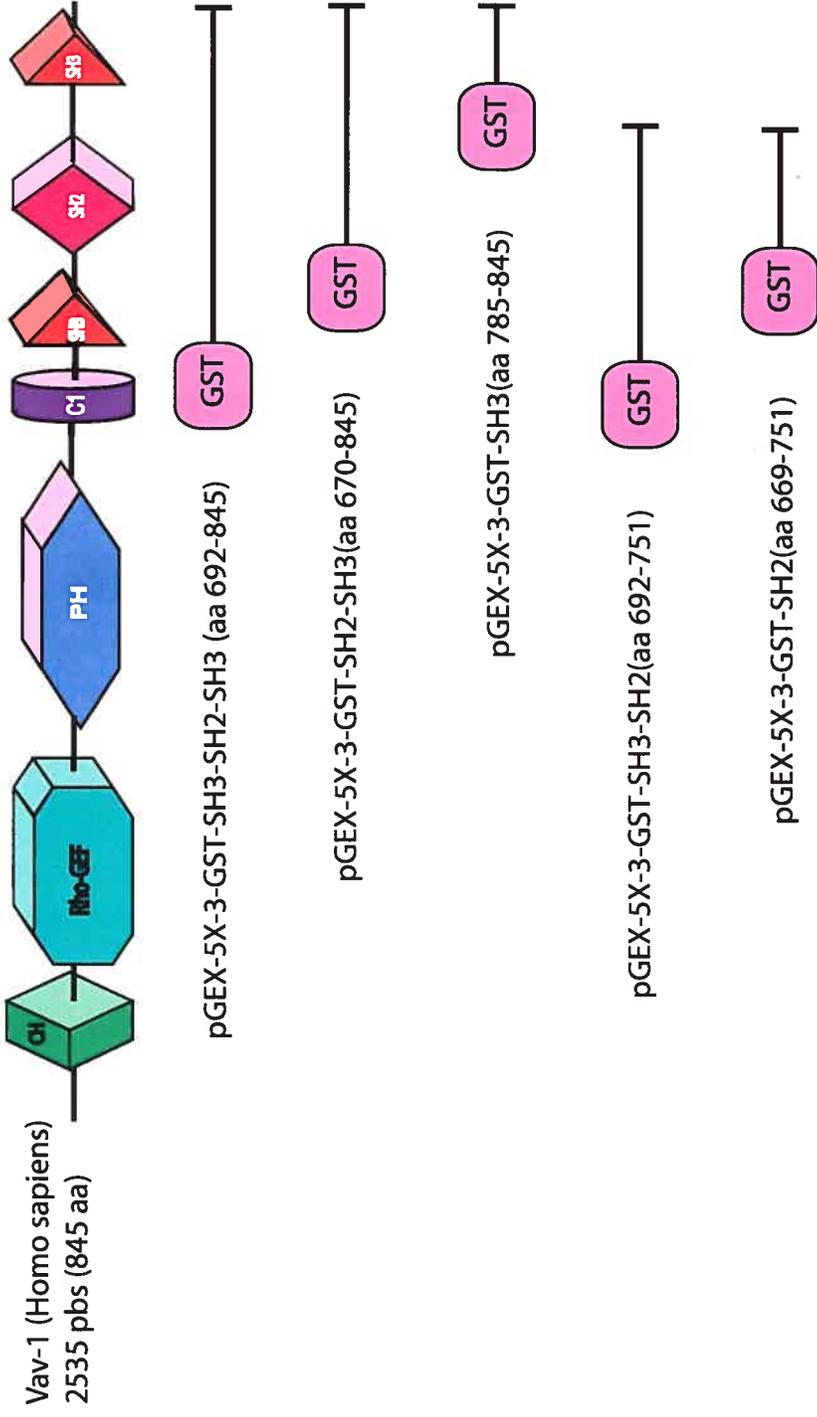


Figure 25. Les clones de Vav-1 dans le vecteur pGEX-5X-3-GST. Tous les clones ont été utilisés pour transformer les bactéries BL21 et produire la protéine GST-Vav-1 après induction à l'IPTG, afin de confirmer l'interaction entre SH3AP1-Flag et GST-Vav-1.

Les résultats montrent que l'interaction entre SH3AP1 et Vav-1 pourrait impliquer le domaine SH3 en position C-terminale de Vav-1 et la partie C-terminale riche en proline de SH3AP1. Cette interaction permettrait le rapprochement des tyrosines phosphorylées en position 659 (pY-Asp-Gln-Pro) et 708 de SH3AP1 (pY-Gly-Lys-Leu) du domaine SH2 de Vav-1 (Figure 26). Le domaine SH2 de Vav-1 se lie préférentiellement aux tyrosines phosphorylées dans un motif pY-Xaa-Glu-Pro ou Xaa peut-être Met, Leu ou bien Glu (211).

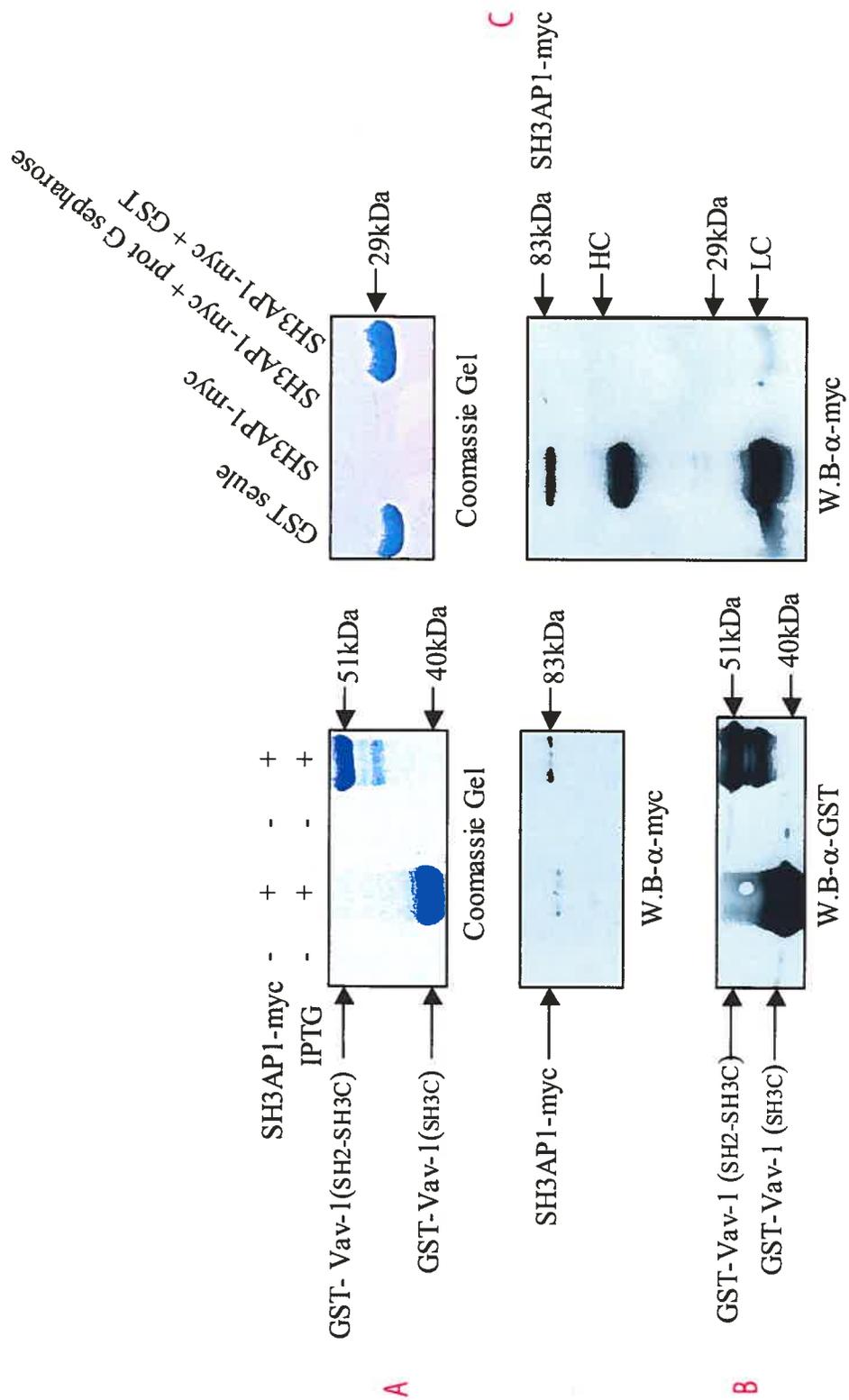


Figure 26. GST pull down

La planche A: Montre l'expression des protéines de fusion GST-Vav-1 (SH2+SH3C et SH3C seul) aux puits 2 et 4 après induction à l'IPTG alors qu'aux puits 1 et 3 il n'y a pas d'expression en absence d'induction à l'IPTG. La planche A Montre aussi l'interaction entre GST-Vav-1 (SH2+SH3C et SH3C) avec SH3AP1 et permettent ainsi son "pull down" ou sa précipitation révélée par un immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-myc.

La planche B: Confirmation de l'expression des protéines GST-Vav-1 (SH2+SH3C et SH3C seul) par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-GST.

La planche C: Confirmation que GST seule est incapable de lier SH3AP1.

3.5 Résultats de la dimérisation et oligomérisation

Afin de déterminer si SH3AP1 est capable de former des oligomères et de caractériser quelle(s) région(s) de SH3AP1 est/sont impliquée(s) dans cette oligomérisation, deux constructions de SH3AP1 ont été préparées. Des constructions de SH3AP1 forme sauvage comportant deux tags différents, soit GFP (Green Fluorescent Protein) et FLAG, ont été réalisées séparément dans un vecteur pCDNA3 pour l'expression dans les cellules de mammifères. Trois autres constructions avec le tag GFP et la forme tronquée de SH3AP1 ont été clonées dans le vecteur pCDNA3 ainsi qu'une autre construction mais contenant seulement l'étiquette GFP pour servir de contrôle négatif.

- 1) Flag-SH3AP1 (2-740)
- 2) SH3AP1 (1-740)-GFP
- 3) SH3AP1 (1-571)-GFP
- 4) SH3AP1 (1-468)-GFP
- 5) SH3AP1 (465-568)-GFP
- 6) GFP

La lignée cellulaire 293A a été co-transfectée avec les deux constructions, Flag-SH3AP1 forme sauvage et une des autres constructions en utilisant le réactif Lipofectamine (Gibco BRL, MD) en accord avec les instructions du fabricant afin de déterminer la région impliquée dans l'oligomérisation. La suite des expériences entre autres la lyse des cellules, le SDS-PAGE et l'immunobuvardage Western ont été effectuées comme décrit dans les sections précédentes.

La figure 27 illustre les différentes constructions utilisées et la position du tag.

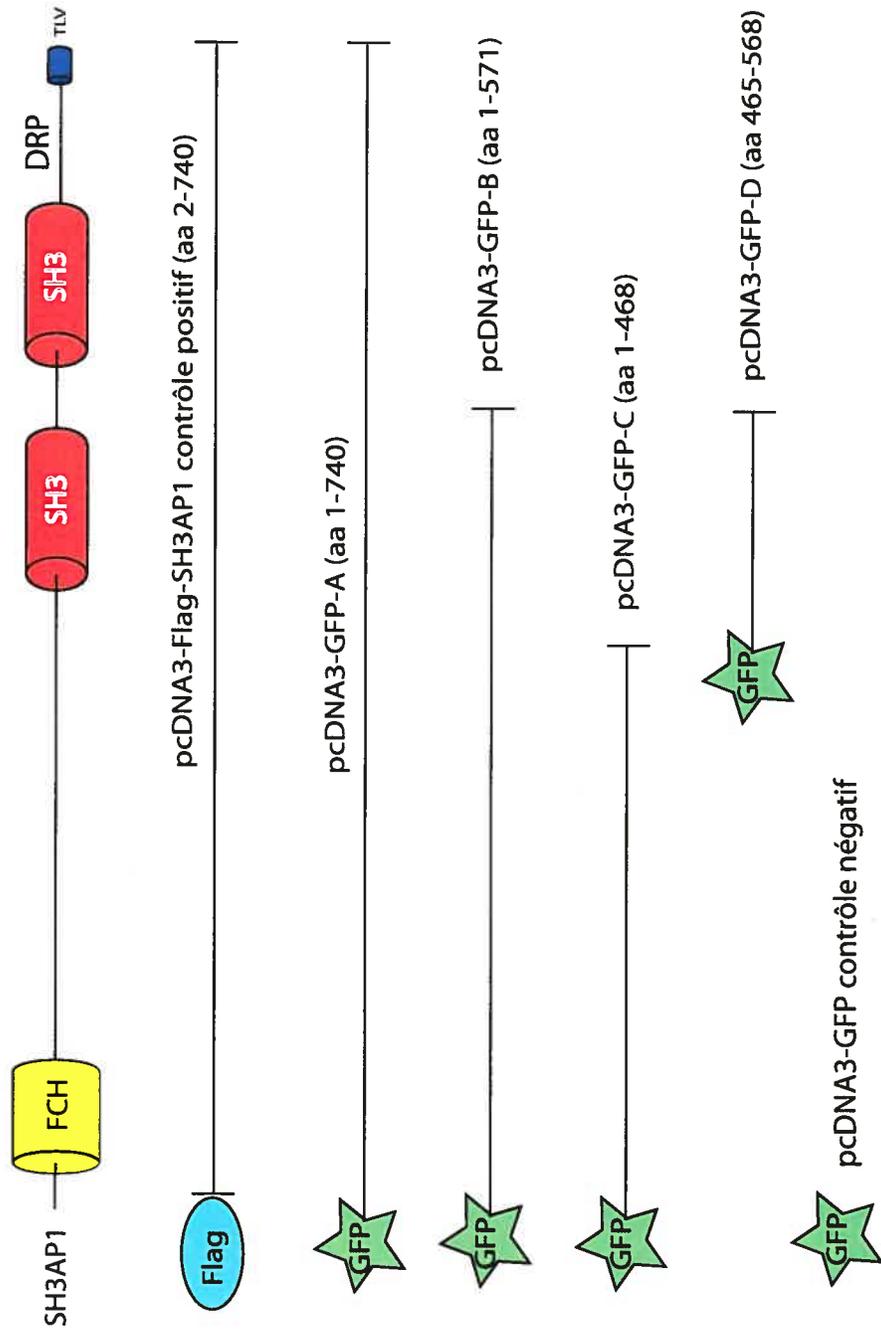


Figure 27. Les clones de SH3AP1 construits dans le vecteur pcDNA3-Flag et pcDNA3-GFP. Ces clones ont été utilisés pour la confirmation de la dimérisation de SH3AP1 dans les cellules 293A transfectées. Cette expérience nous a permis de déterminer la ou les régions impliquées dans la dimérisation. Elle nous a aussi permis d'identifier les résidus qui lorsque mutés entraînent l'abolition totale de la dimérisation de SH3AP1. Nous avons utilisé la GFP seule comme contrôle négatif.

La dimérisation et l'oligomérisation de SH3AP1 ont été démontrées en utilisant un agent cross-linkant chimique le DSS (Dithio bis-Succinimidyl Suberate)(167).

Les cellules 293A exprimant ces constructions ont été rincées avec du PBS puis incubées pendant 30 min avec des concentrations croissantes de DSS (0, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$) dans du PBS. Elles ont ensuite été rincées avec du tampon PBS, lysées et analysées par gel de SDS-PAGE (10%) et par immunobuvardage Western utilisant un anticorps anti-Flag. Nous avons démontré que les deux protéines natives de forme courte et longue formaient des dimères et des oligomères (A) alors que les mutants étaient incapable de former des dimères et encore moins des oligomères (B) (Figure 28).

Le remplacement par mutation ponctuelle de la leucine en position 141 par une proline et de l'isoleucine 371 par une proline abolit la capacité de SH3AP1 à former des dimères (Figure 28).

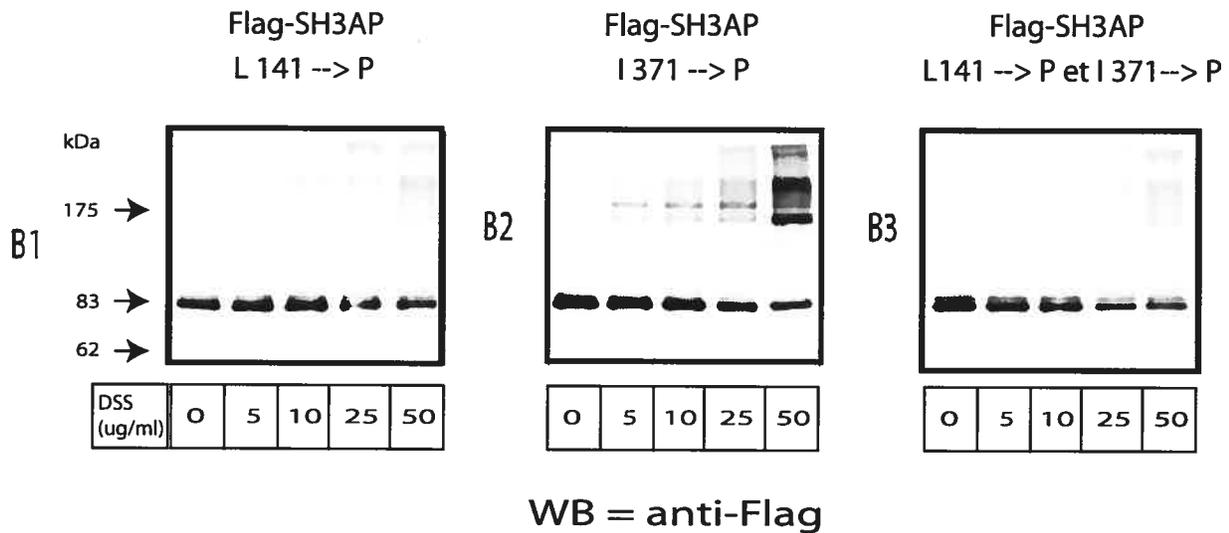
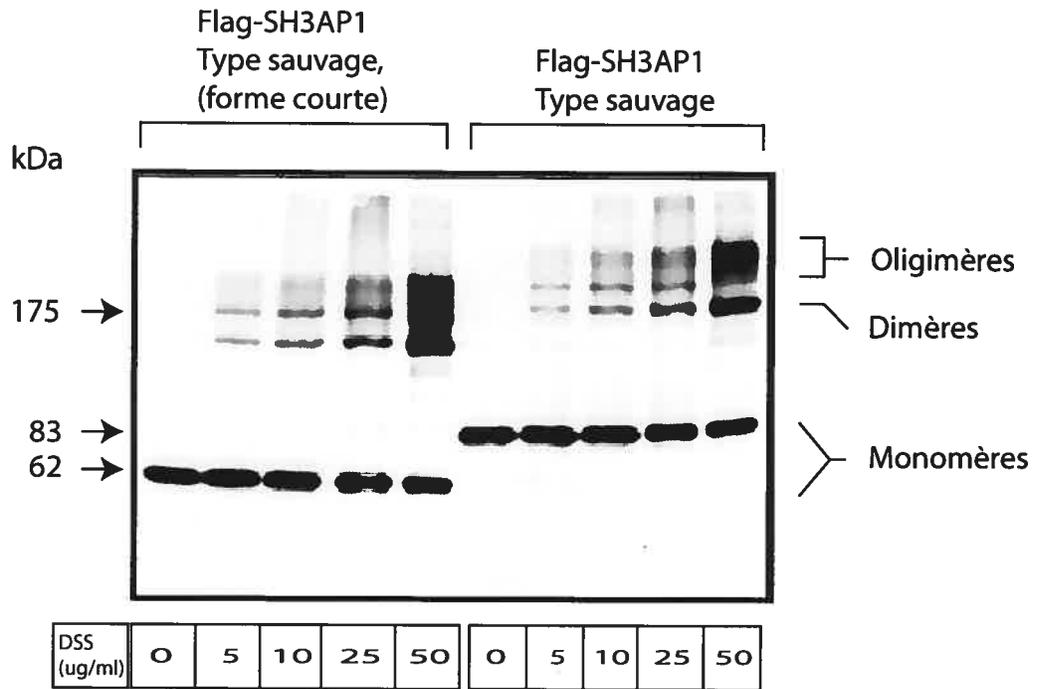


Figure 28. La confirmation de l'oligomérisation de SH3AP1. Le panneau A nous montre que la protéine SH3AP1 peut former des monomères, des dimères et des oligomères. On voit bien que les deux formes de SH3AP1 courte et longue peuvent s'oligomériser. Le panneau B1 nous montre que le mutant L141 -> P abolit partiellement la formation de dimères. Le panneau B2 montre que la mutation I 371 -> P abolit la formation d'oligomères lorsqu'on ne rajoute pas de DSS mais qu'à forte concentration on arrive à en avoir. Sur le panneau B3, on voit que la double mutation L141 -> P et I371 -> P abolit complètement l'oligomérisation de SH3AP1.

3.7 Prédiction de la structure en double hélice (coiled-coil structure)

Nous avons utilisé un programme informatique afin de modéliser schématiquement les régions impliquées dans la formation de dimères et de tétramères. Ce programme prédit la localisation des régions impliquées dans la formation de structure en hélice tour hélice (Coiled-coil) et est basée sur un algorithme qui calcule la probabilité de repliement des structures protéiques (201)(Figure 29).

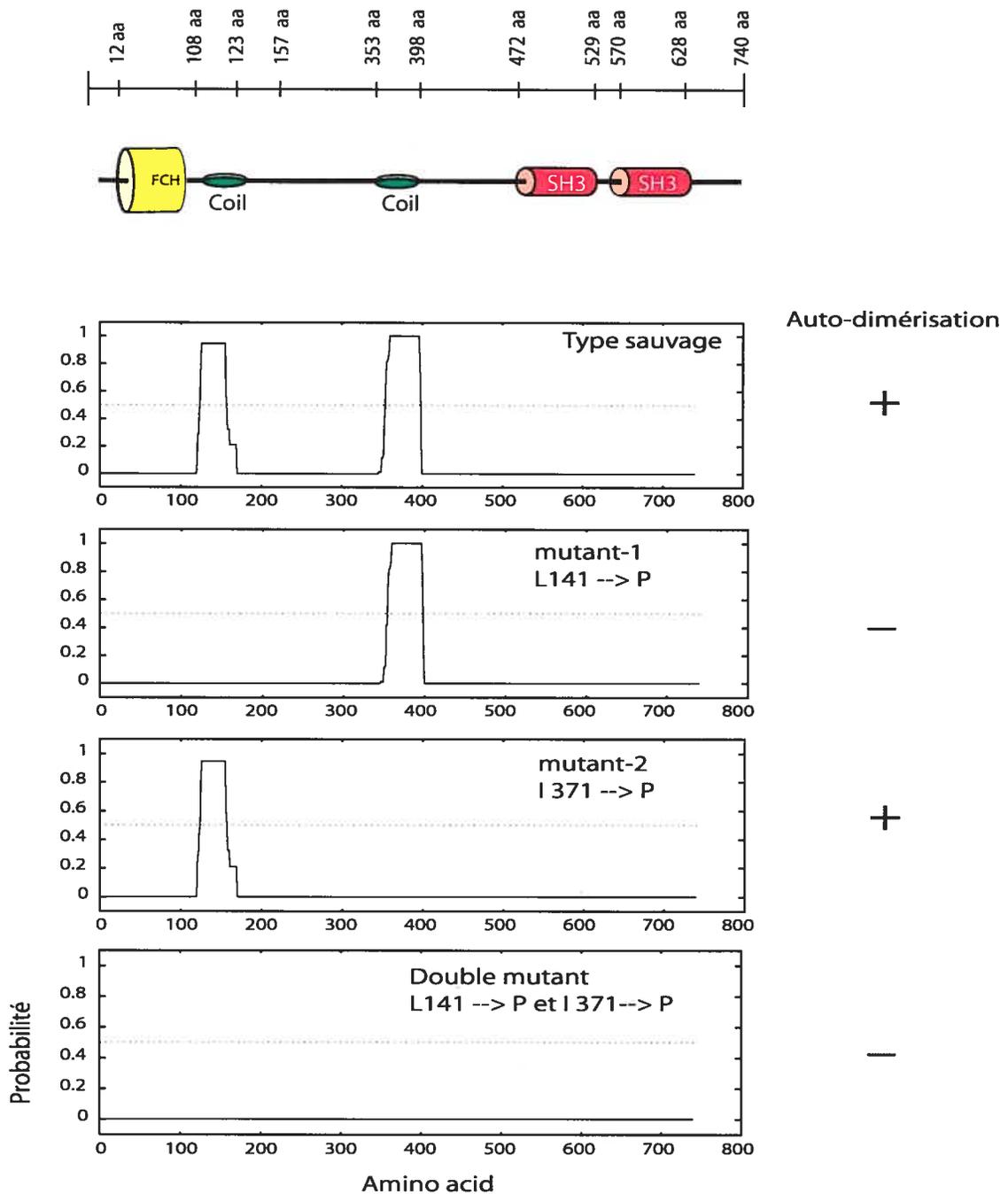


Figure 29. Prédiction de la formation de dimères. L'utilisation du programme de prédiction de formation de dimères 'Paicoil' nous a permis de voir les régions impliquées dans l'auto-dimérisation de SH3AP1. Nous avons identifié les acides aminés impliqués dans cette dimérisation et leur mutation en un autre acide aminé abolit la possibilité de former des dimères.

3.8 Alignement des séquences des protéines de la famille PCH

Nous avons utilisé le programme CLUSTAL W, qui est un programme d'alignement des séquences d'acides aminés, afin de déterminer le lien de parenté et le degré de conservation des structures des différentes protéines à deux domaines SH3 de la famille PCH. Le programme CLUSTAL W utilise l'alignement de Pearson et pour le calcul de l'arbre phylogénétique il utilise la méthode de calcul de Neighbour Joining (Neighbour Joining) (202).

3.8.1 Le Neighbor Joining

Le neighbor joining est un algorithme qui tente de minimiser la longueur totale des branches de l'arbre et ceci à chacune des étapes de regroupement. L'idée ici est de joindre les OTUs (operational taxonomic units) qui sont non seulement proches l'une de l'autre mais sont aussi éloignées du reste des OTUs. À chaque boucle du programme algorithmique celui-ci tente de trouver l'ancêtre direct de deux espèces dans l'arbre.

3.8.2 Le pourcentage de mutation accepté (PAM)

Cette unité de mesure a été introduite par Dayhoff et al (217) afin de mesurer le taux de changement dans les séquences des protéines dû à l'évolution. La matrice PAM est dessinée pour comparer deux séquences en acides aminés de deux protéines. La valeur 0.1 unité PAM représente un pourcentage moyen de changement des acides aminés dans la séquence d'une protéine (0.1 Unité PAM = 1%). La matrice PAM est une table dans laquelle les scores de chaque acide aminé substitué sont calculés sur la base que, chaque substitution dans des protéines apparentées qui ont divergées, ait une valeur X.

1 PAM veut dire une mutation par 100 résidus aminés (1%), 250 PAMs sont l'équivalent de 2.5 mutations par résidu (2.5%). L'utilisation d'une horloge moléculaire de 1 million d'années par mutation nous permet de retrouver les distances séparant les OTUs.

La figure 30 nous illustre les différents degrés de parenté entre les protéines et la distance qui sépare les protéines entre elles et les taxons entre eux.

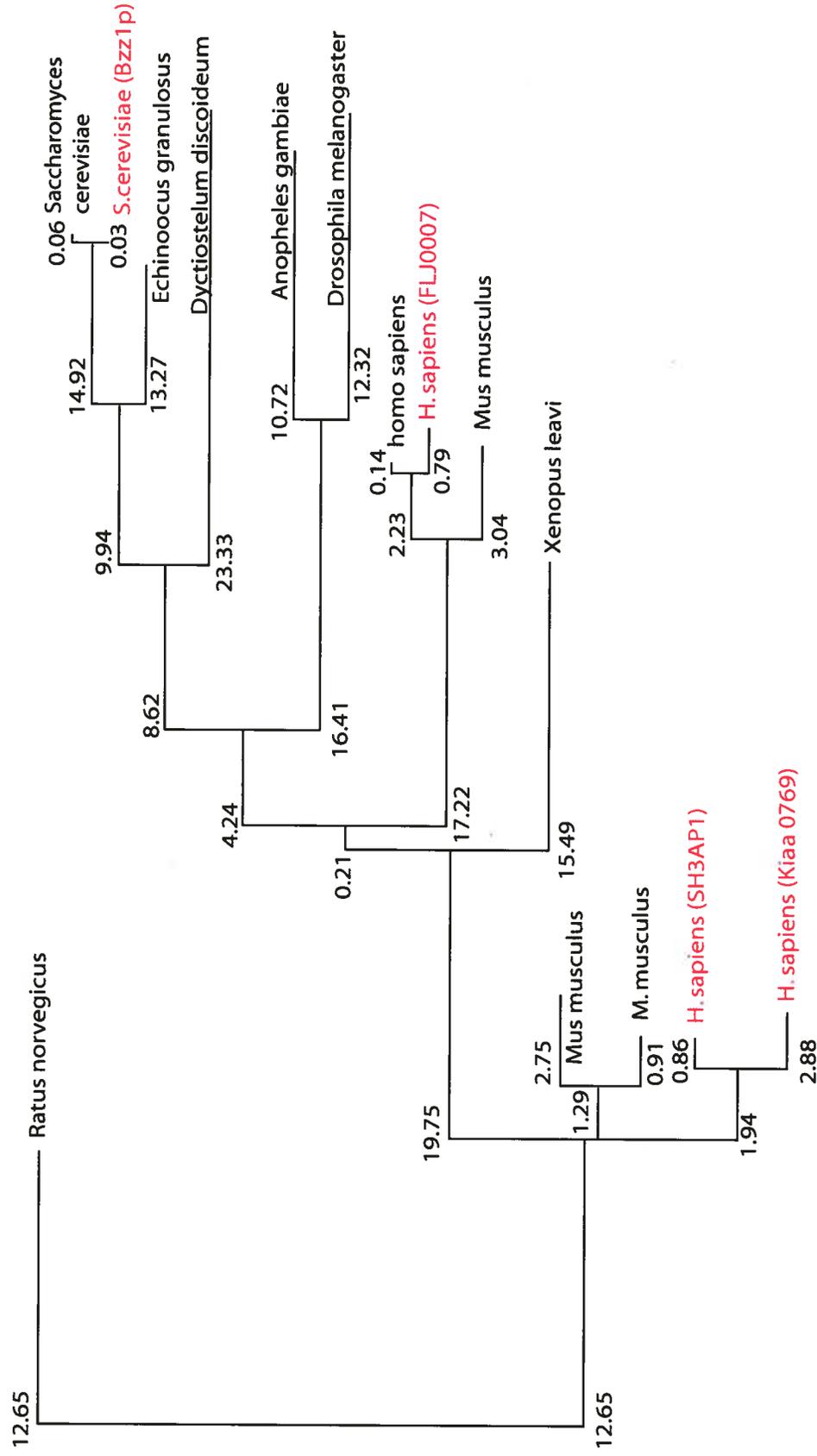


Figure 30. Arbre phylogénétique des protéines de la famille PCH à deux domaines SH3. Les noms des espèces sont représentées en abrégiation. Les protéines qui sont représentées ici possèdent toutes deux domaines SH3. Les noms des espèces sont représentées en abrégiation. Il existe d'autres protéines de la même famille PCH avec 1 domaine SH3 et chez d'autres espèces non représentées sur cet arbre. Les distances représentent le nombre de millions d'années séparant chaque taxon de celui le plus proche. 1 PAM veut dire une mutation par 100 résidus aminés, 250 PAMs sont l'équivalent de 2.5 mutations par résidu. L'utilisation d'une horloge moléculaire de 1 million d'années par mutation nous permet de retrouver les distances séparant les OTUs (operational taxonomic units).

CHAPITRE 4 : Discussion

4.1 Les récents évènements

Dans une étude plus récente, une protéine appelée Carom (203) appartenant à la famille PCH/FCH et correspondant à notre protéine SH3AP1 a été identifiée lors d'un criblage avec le système du double hybride chez la levure en utilisant la protéine MAGI-1 comme appât. MAGI-1 est une protéine de 1462 acides aminés qui possède un domaine MaGuk (membrane-associated guanylate kinase homologs) et six (06) domaines PDZ. Il a été démontré que Carom (SH3AP1) interagit aussi avec CASK (Calcium / calmodulin - dependent serine protein kinase) une protéine de 926 acides aminés avec un domaine sérine/thréonine kinase en position N-terminale, un domaine PDZ, un domaine SH3 et un domaine GuKc (MAGUKs - membrane-associated guanylate kinase homologs) en position C-terminale. Carom interagit avec ces deux protéines de façon compétitive. En effet l'interaction entre Carom (SH3AP1) et MAGI-1 implique la séquence consensus TLV de SH3AP1 et le cinquième domaine PDZ de MAGI-1. Par contre, l'interaction de Carom (SH3AP1) et CASK implique la région riche en proline de Carom et le domaine calcium calmoduline de CASK. Il a été démontré dans cette étude que Carom sert d'adaptateur moléculaire pour le recrutement de ces protéines près des jonctions serrées entre les cellules.

4.2 Les différentes formes de SH3AP1

Nous avons identifié durant l'étude que nous avons menée sur la caractérisation de SH3AP1, que celle-ci existe sous trois formes différentes. Le clone identifié comme interagissant avec MAGI-1 est constitué uniquement de la région centrale et de la partie C-terminale avec les deux domaines SH3. Ceci nous a amené à supposer que la protéine Carom (SH3AP1) existe sous trois formes différentes et non seulement deux (Figure 31). Ce qui a été démontré par la suite lorsque nous avons cherché dans la base de données de PubMed est qu'il existe un clone identifié par Kiaa 0769 (NM_014824) dont la séquence en nucléotides correspond à Carom (SH3AP1) sans le domaine PCH/FCH en position N-terminale en raison de l'existence d'un second codon d'initiation de la traduction (213).

La présence de deux sites d'épissage différentiel permet aussi d'obtenir deux autres protéines, ce qui donne en fait quatre protéines comme illustré dans la figure 31.

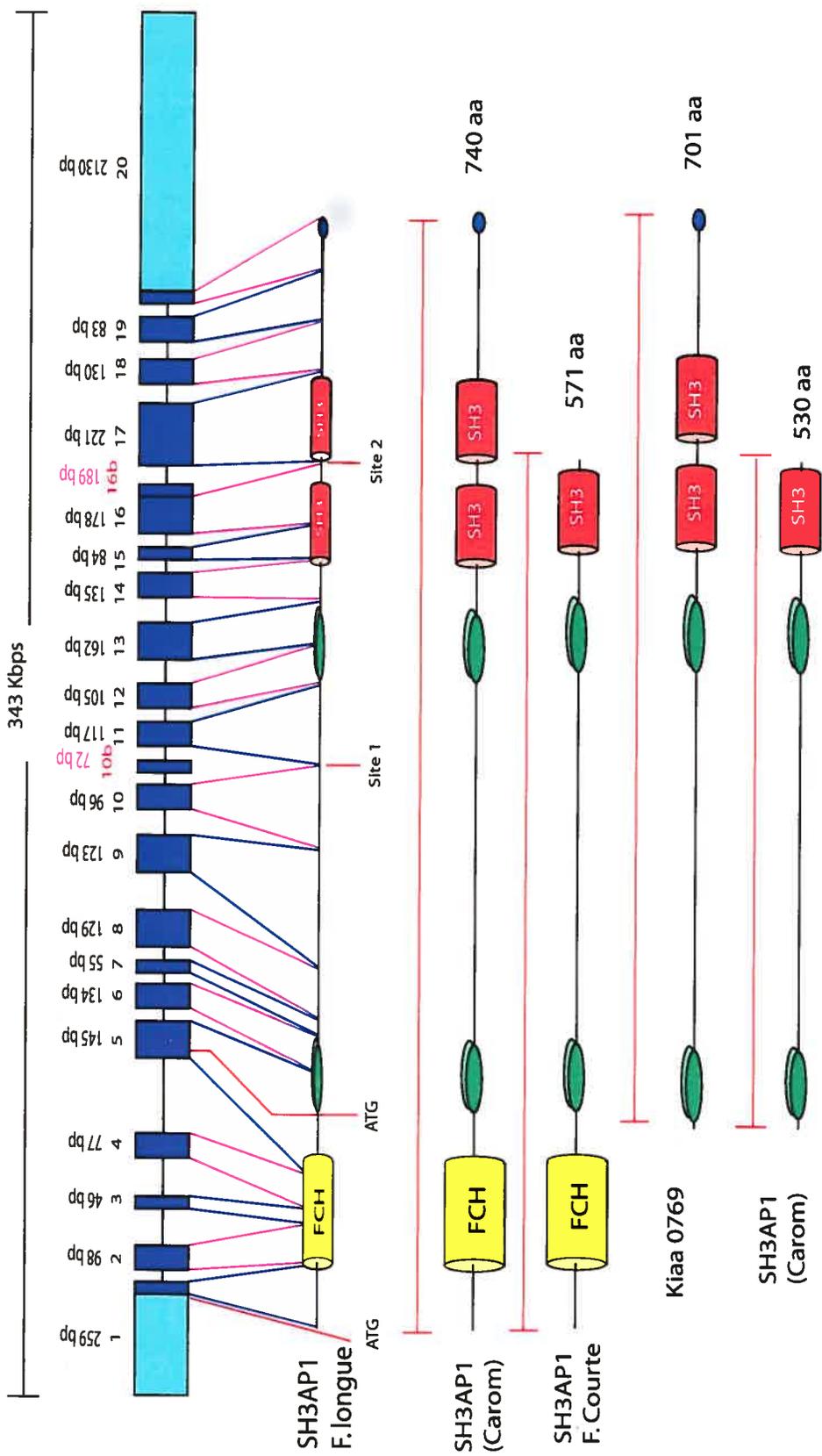


Figure 31. Représentation schématique des trois formes de SH3AP1 (Carom) identifiées jusqu'à présent.

La présence de deux sites d'initiation de la transcription permettent d'obtenir deux transcrits de tailles différentes donnant deux protéines de différentes structures. La présence de deux sites d'épissage alternatif nous permettent d'obtenir deux autres transcrits de tailles différentes.

4.3 Les interactions de SH3AP1 avec les protéines du cytosquelette

La partie C-terminale (100 aa) de SH3AP1 est riche en prolines et contient deux tyrosines phosphorylées en position 659 et 708 (voir le chapitre des résultats). Cette donnée nous a orienté vers la construction d'un nouvel appât. Nous avons cloné ce fragment dans le vecteur pBTM116 + Src qui a servi à cribler d'autres bibliothèques, entre autres la bibliothèque d'ADNc de poumons et de glandes mammaires. Le choix de ces deux bibliothèques découle du fait de l'expression élevée de SH3AP1 (forme longue) dans ces deux tissus (Figure 9). Le criblage de ces deux bibliothèques a permis l'identification de quelques partenaires, entre autres Myosine (Myosin Heavy Chain), une grosse protéine de presque 2000 acides aminés qui joue un rôle dans la formation du complexe Arp2/3 et l'actine (204) et Ezrine (Villin 2) une protéine présente à la périphérie de la membrane cytoplasmique.

L'étude a aussi montré que SH3AP1 interagissait avec des protéines comme WASp (interaction confirmée dans la levure et *in vitro* par GST *pull-down*)(J. Champagne et D. Banville; résultats non publiés). Le clone WASp (Wiskott-Aldrich Syndrome protein) a été repêché en utilisant le premier domaine SH3 de SH3AP1 comme appât dans le système du double hybride de la levure.

Des mutations ou des délétions de WASp sont associées au développement de cette maladie qui est héréditaire dont la transmission récessive est liée au chromosome X et qui est caractérisée par une déficience du système immunitaire. Ce syndrome se caractérise par l'association d'une thrombopénie, d'un eczéma, d'infections à répétition et une prédisposition au développement de leucémies et de lymphomes (205).

La protéine WASP est exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et est vraisemblablement impliquée dans la signalisation et la régulation du cytosquelette en réponse à des stimuli externes. WASP est associée à plusieurs protéines avec des domaines SH3. D'ailleurs, il a été démontré que WASP interagissait avec Cip4 (206-207), un membre de la famille des protéines à domaine PCH/FCH, qui est impliqué dans l'acheminement de WASP près de la membrane plasmique pour intervenir dans le complexe de la nucléation de l'actine avec Cdc42, Rho et Rac (208). Ces interactions suggèrent fortement que SH3AP1 pourrait être impliquée dans le recrutement de

différentes protéines qui font toutes partie de la voie de signalisation qui mène au réarrangement du cytosquelette.

Au niveau de la librairie de poumon, le criblage par double hybride a permis d'isoler un clone contenant un ADNc de 735 pb correspondant à un segment du gène *Vav-1*. La partie C-terminale de la protéine Vav-1 est constituée de deux domaines SH3 séparés par un domaine SH2. Ce résultat est particulièrement intéressant compte tenu que la partie C-terminale de SH3AP1 contient deux tyrosines phosphorylables, soulevant la possibilité que l'une des tyrosines puisse interagir avec le domaine SH2 de Vav-1.

Le domaine SH2 de Vav-1 reconnaît des tyrosines phosphorylées dans un motif précis de 3 à 6 acides aminés en position C-terminale de la tyrosine phosphorylée. Le motif de liaison préféré du domaine SH2 de Vav-1 est pTyr-Xaa-Glu-Pro ou Xaa peut être Met, Leu ou Glu (211). Ce motif est d'ailleurs présent dans la séquence de SH3AP1 en position 658-662 (**YDQP**) (Figure 17). N'empêche que la liaison de Vav-1 à SH3AP1 est médiée par le domaine SH3 en position C-terminale de Vav-1 et la séquence riche en proline de SH3AP1.

Nous n'avons pas pu démontrer l'interaction *in vivo* entre SH3AP1 et Vav-1 par co-immunoprécipitation. Toutefois, le fait que l'interaction *in vivo* n'ait pu être démontrée ne signifie pas que l'interaction n'est pas possible.

Dans le système du double hybride chez la levure nous utilisons une courte séquence comme appât et les proies sont aussi des fragments d'ADNc, de ce fait les interactions retrouvées dans la levure ne sont pas systématiquement confirmées dans les cellules de mammifères. Les conditions physiologiques qui sont présentes dans les cellules de mammifères ne sont pas identiques à celle de la levure. En effet, les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles ne sont pas les mêmes. Les sites d'interaction aussi pourraient être masqués par d'autres protéines les rendant non accessibles. Néanmoins nous avons pu confirmer l'interaction *in vitro* en utilisant le test de GST-pull-down (Figure 26).

En effet, ce système nous permet de lever quelques obstacles, entre autres, de supprimer les autres protéines susceptibles d'interagir. En contrepartie, le fait d'utiliser ce système (GST *pull-down*) ne nous permet pas de dire que l'interaction est à 100 % vraie, car les conditions *in vitro* ne sont pas les mêmes que *in vivo*. Ceci veut dire que chaque système

a ses avantages et ses inconvénients et qu'ils peuvent être complémentaires. Le résultat final devrait être celui qui se rapproche le plus des conditions physiologiques au niveau de la cellule. L'interaction avec Vav-1 confirmée par le test GST pull-down devrait être reproduite avec les deux autres membres de la même famille VAV, étant donné que les trois membres partagent en moyenne 52 % d'identité de séquence en acides aminés et 74 % d'identité de séquence en nucléotides, et que tous les domaines sont conservés ainsi que leurs rôles physiologiques. Ces trois membres sont aussi activés par phosphorylation et sont impliqués dans la voie de signalisation de Ras et c-Src et tous interagissent avec les différents membres de la famille des petites GTPases Rho/Rac/Cdc42 qui jouent un rôle important dans les réarrangements du cytosquelette mais aussi dans la transformation cellulaire. SH3AP1 qui est fortement exprimée dans le tissu pulmonaire et dans les glandes mammaires pourrait éventuellement jouer un rôle dans la transformation cellulaire (Figure 9). La transformation cellulaire implique plusieurs partenaires et nécessite l'altération de plusieurs gènes. Certaines protéines peuvent être des transactivateurs transcriptionnels et permettent la transcription des gènes qui eux vont participer de façon indirecte dans la tumorigénèse. SH3AP1 forme courte ou bien longue pourraient être sur-exprimées de cette manière. Le fait que SH3AP1 soit une protéine du cytosquelette et un adaptateur multifonctionnel font d'elle un candidat idéal qui serait impliqué de façon directe ou indirecte dans la transformation cellulaire. Ceci pourrait expliquer pourquoi on trouve la protéine SH3AP1 sur-exprimée dans différents tissus cancéreux.

Il est fort probable que SH3AP1 interagisse avec les autres protéines Vav-2 et Vav-3 car l'alignement des domaines SH3 en position C-terminale a montré un pourcentage d'identité et de conservation des résidus supérieurs à 68 %. Néanmoins ceci reste à être démontré. Il serait intéressant de voir si SH3AP1 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques voir même s'il peut interagir avec Vav-1 dans ces cellules ou bien en utilisant la lignée cellulaire Jurkat T. On pourrait sur-exprimer ou bien déléter (Knock-down) SH3AP1 par si-RNA et voir si cela entraîne un ou des changements physiologiques. Nous pourrions utiliser la technique du FRET et marquer les deux protéines afin de voir si elles interagissent *in vivo*.

4.4 Arbre phylogénétique de l'évolution et de la conservation des protéines de la famille PCH chez les métazoaires

L'alignement des séquences en acides aminés des protéines à deux domaines SH3 appartenant à la famille PCH de différentes espèces de métazoaires nous a permis d'obtenir un arbre phylogénétique calculé à partir d'une matrice de distance basée sur le principe du neighbour-joining. Cet arbre nous a permis de comprendre le rapprochement phylogénétique entre les protéines appartenant à des espèces qui sont proches entre elles dans le grand arbre du vivant (Figure 20). Néanmoins, nous avons constaté que la séquence de la protéine SH3AP1 était beaucoup plus apparentée à celle de *Mus musculus* et de *Ratus norvegicus* qu'elle ne l'était à celle de FLJ0007 de *Homo sapiens sapiens*. En effet, ces deux protéines semblent avoir divergé depuis longtemps vu la distance qui les sépare. Il semblerait que FLJ0007 est apparue plus récemment que SH3AP1 et que la divergence ne soit pas due à la duplication de ces deux gènes ni à l'accumulation de mutations mais on peut supposer que le gène de SH3AP1 est un gène chimérique. D'après certains scientifiques, les gènes chimères sont le produit de brassage d'exons, ce qui permet à un produit de gène (protéine) d'exister sous des organisations différentes comme dans le cas de SH3AP1 qui existe sous trois formes différentes (comme il a été cité plus haut). Les gènes chimériques sont constitués soit par la fusion d'un élément transposable au sein de tout ou d'une partie d'un gène de structure, soit au niveau des ARN par des mécanismes sophistiqués d'échappement de fin de transcription. Dans ce dernier cas, l'ADN polymérase II ne reconnaît pas le signal d'arrêt entre deux gènes et continue la transcription sur le gène suivant. On obtient ainsi un transcrit primaire très long, contenant l'information de deux gènes, sur lequel intervient l'épissage. Cette hypothèse est basée sur le fait que le gène SH3AP1 contient deux sites d'épissage alternatif avec l'exon 10 et 16 (Figure 11). Elle est aussi basée sur la revue de littérature qui révèle la présence de deux autres formes de SH3AP1, une ne contenant qu'un domaine SH3 et une autre ne possédant pas de domaine PCH/FCH en position N-terminale (Figure 31). On pourrait expliquer ce genre de réarrangements génétiques par la diversité fonctionnelle des protéines. En effet, l'épissage différentiel, le brassage

génétique, les duplications et les gènes chimériques (212) ne font qu'augmenter la diversité des protéines. Comme l'a constaté la communauté scientifique, le génome humain ne contient qu'un nombre limité de gènes. Le dogme 'un gène une protéine' n'est plus à citer, sinon comment expliquer la présence de centaines de milliers de protéines voir plus du million qui sont codées par un nombre limité de gènes, de 26000 à 38000, par rapport à celui prédit avant le séquençage du génome qui était de 50000 à plus de 140000 gènes, si ce n'est que par des phénomènes biologiques encore à l'étude, comme l'épissage alternatif.

CHAPITRE 5 : Conclusion

Ce projet de recherche s'inscrit dans le cadre d'un plus vaste programme visant la caractérisation de la protéine SH3AP1 et celle des partenaires d'interaction de hPTP1E.

En effet tel que mentionné dans l'introduction, hPTP1E, une phosphatase déjà caractérisée dans notre laboratoire interagit avec ZRP-1, qui à son tour interagit avec SH3AP1. Nous avons utilisé SH3AP1 comme appât pour identifier d'autres partenaires d'interaction.

Par cette étude nous avons tenté de comprendre et d'identifier les joueurs impliqués dans cette voie de signalisation et voir si celle-ci est reliée à une autre voie. Nous avons utilisé deux approches, une moléculaire et l'autre biochimique, pour identifier et caractériser les partenaires d'interaction de SH3AP1.

L'approche moléculaire consiste en l'utilisation du système du double hybride chez la levure. Nous avons construit différents appâts en utilisant les différentes régions de SH3AP1 pour cribler les bibliothèques d'ADNc de cellules HeLa, de poumons et de glandes mammaires. Ainsi nous avons trouvés plusieurs bons candidats pouvant avoir une interaction significative avec SH3AP1, tels que WASP, WIP, MAGI-3, Vav-1, ZRP-1 et hPTP1E qui sont tous impliqués dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ces interactions ont d'ailleurs été confirmées *in vitro*, par GST *pull-down* (J.Champagne, Y. Fortin, S. Bouhanik et D. Banville; résultats non publiés). Ces résultats nous ont permis de mieux comprendre comment les différentes régions de la protéine SH3AP1 interagissent avec les différents partenaires et éventuellement comprendre le rôle biologique de SH3AP1. Nous avons aussi étudié la capacité de SH3AP1 à former des dimères et des tétramères. Nous avons aussi caractérisé sa partie C-terminale et la localisation des résidus tyrosines phosphorylés et leur possible implication dans les interactions protéines-protéines. Chacune des régions de SH3AP1 a démontré sa capacité fonctionnelle. En effet lors d'expériences antérieures, nous avons utilisé différentes parties de SH3AP1 comme appât dans le système du double hybride chez la levure et des interactions avec des partenaires ont été identifiées (Voir résumé dans le tableau 2). Nous avons constaté que certaines interactions étaient cohérentes, compte tenu du rôle de

certaines protéines dans le complexe d'actine du cytosquelette, alors que d'autres se sont révélées être des faux positifs suite au test de β -gal. Nous avons choisi de continuer à explorer les interactions qui avaient une logique et qui pourraient aboutir à une voie de signalisation correcte et dont les intervenants étaient soit déjà documentés soit présentaient des domaines d'interaction complémentaires. Comme déjà démontré avec le domaine SH3 de SH3AP1 et la région riche en prolines de WASP, la séquence consensus de liaison au domaine PDZ (TLV) de SH3AP1 et son interaction avec le second domaine PDZ de hPTP1E. La protéine WIP, comme la protéine WASP, possède une région riche en proline et s'associe à l'actine et à la profiline de même qu'à la protéine adaptatrice Nck. Il est à noter que WASP comme WIP s'associent aux domaines SH3 de Nck, WIP au second domaine SH3 et WASP au troisième domaine SH3. Nck, WASP et WIP pourraient former un complexe tri-moléculaire étant donné que les sites de liaisons sont différents pour chaque protéine. On sait déjà que WIP est impliquée dans la polymérisation de l'actine dans les cellules lymphocytaires en favorisant l'échange de l'ADP pour l'ATP sur celle-ci. Nous constatons ici l'existence d'une spécificité d'interaction moléculaire liée aux domaines et surtout une fonction biologique bien déterminée liée au tissu dans lequel ces complexes sont préformés et dans lesquels ils agissent.

Nous avons aussi étudié la localisation cellulaire de SH3AP1 par marquage à la GFP qui a permis d'identifier, après sur-expression de SH3AP1, la localisation de celle-ci dans le cytoplasme et à la membrane plasmique (J. Champagne et D. Banville, résultats non publiés). La protéine SH3AP1 (Carom) possède :

- Un domaine PCH/FCH en position N-terminale qui joue un rôle dans la fixation à l'anneau d'actine durant la cytocinèse.
- Une région centrale qui est impliquée dans la formation de dimères et de tétramères.
- Deux domaines SH3 capables de lier des protéines avec des régions riches en prolines (WASP).
- Une partie C-terminale contenant deux tyrosines phosphorylables pouvant recruter d'autres molécules adaptatrices en interagissant avec des domaines SH2.

- Une partie de cette région est aussi riches en motifs PxxP pouvant interagir avec des molécules possédant des domaines SH3 (Vav-1).
- Une séquence consensus TLV pour les domaines PDZ qui a démontré sa capacité à interagir avec différents partenaires comme hPTP1E, ZRP1, MAGI-1.

Il apparaît clairement maintenant que SH3AP1 est un adaptateur polyvalent capable non seulement de recruter différents partenaires mais aussi d'interagir à différents endroits de la cellule, soit au cytoplasme, soit dans le noyau, soit à la membrane plasmique. Il peut aussi intervenir à différentes étapes de la différenciation cellulaire. Son aptitude à former des dimères et des tétramères lui confère la capacité, avec ces différents domaines, de recruter plusieurs intervenants dans la signalisation cellulaire, leur permettant non seulement de les rapprocher les uns des autres mais aussi de les déplacer d'un compartiment de la cellule vers un autre.

La protéine Vav-1 est essentielle dans les cellules T lymphocytaires lors de l'activation et de la stimulation du récepteur T par l'antigène. L'engagement du récepteur T va enclencher une cascade d'événements et une coopération synergique entre Vav-1, SLP-76, Cdc42 et Rac-1, ce qui mène au développement des filopodes et des lamellipodes. Ces événements font intervenir d'autres composantes entre autres les adaptateurs moléculaires. L'hypothèse que je soulève ici est que l'interaction entre SH3AP1 et Vav-1 interviendrait certainement au début de l'engagement du récepteur T. Des changements au niveau du cytosquelette vont être nécessaires et vont nécessiter des interactions entre les différents partenaires de cette voie, raison pour laquelle je suppose que ces complexes sont prés-formés et prêts à être acheminés aux bons endroits à la demande. Ici intervient donc le rôle des adaptateurs multifonctionnels de la classe de SH3AP1, car comme je l'ai déjà décrit plus haut, les différentes interactions identifiées lors des expériences antérieures ont montré que SH3AP1 doit certainement exister sous forme multimérique et associé à ces partenaires éventuels entre autres : Vav-1, WASP, WIP, ZRP-1 et hPTP1E. Il reste à démontrer que la sur-expression de SH3AP1 pourrait être impliquée directement dans la transformation cellulaire ou indirectement via l'effet de trans-activateurs. Les données collectées concernant SH3AP1, entre autres le fait que SH3AP1 formes courte et longue en plus de la forme tronquée sans le domaines PCH/FCH en position N-terminale (Figure 30), soient sur-exprimées dans les cellules cancéreuses est

un bon indice qui pointe directement vers l'implication de SH3AP1 (11q13.4) dans la transformation cellulaire à la différence de son homologue la protéine FLJ0007 (5q13.3) qui est très peu exprimée dans les mêmes cellules cancéreuses (figure 9).

Tableau 2. Résumé des interactions de SH3AP1 (Carom).

	Domaine d'interaction	FCH	SH3AP1 (Carom)	SH3	DPR TLV
<p>hPTP1E</p>	PDZ1-5	0	0	0	+
<p>ZRP-1</p>	DRP	0	+	0	0
<p>Myosine-1</p>	Queue	0	0	+	0
<p>Vav-1</p>	SH3c	0	0	+	0
<p>STIP-1</p>	TRP	0	0	+	0
<p>WASP</p>	PPP	0	+	0	0
<p>WIP</p>	PPP	0	+	0	0
<p>MAGI-1 & 3</p>	PDZ GukC	0	0	+	+
<p>CASK</p>	CamK	0	0	+	0

Tableau 2. Résumé des interactions de SH3AP1 (Carom). A gauche les protéines identifiées comme interagissant avec SH3AP1 (Carom). La colonne du milieu indique le nom du domaine impliqué dans l'interaction, le signe (+) indique une interaction positive et le chiffre zero (0) indique qu'il n'y a pas d'interaction. Les interactions ont été décrites dans le texte.

REFERENCES

1. Watson J, Crick FH.
A structure for deoxyribose nucleic acid.
Nature 1953; 171: 737-8.
2. Schlaepfer, D.D. & Hunter,
Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?
Trends Cell Biol. 8, 151-157, 1998)
3. Strosberg, A.D.
Structure, function, and regulation of adrenergic receptors.
Protein Science (1993). 2, 1198-1209.
4. Larhammar D, Blomqvist AG, Wahlestedt C, Gilman, A.G. Annual Rev G
Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals
Biochem, 56, 615-649, 1987
5. Hunter T.
The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease
Philosophical Trans: Biol Sci Vol 353, Num 1368 / April 29, 1998
6. Cohen, P.
The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update
Trends Biochem. Sci. 25, 596-601, 2000
7. Hunter, T. & Cooper, J.A.
Protein-Tyrosine Kinases
Annua. Rev. Biochem. 54, 897-930, 1985
8. Pawson, T. & Scott, J.D.
Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins
Science, 278, 2075-2080, 1997
9. Pawson, T., & Gish, G.H.
SH2 and SH3 domains: from structure to function.
Cell 71, 359-362, 1992
10. Van Der Geer, P. & Pawson, T.
The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction.
Trends Biochem. Sci. 20, 277-280, 1995
11. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA.
Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention.
Leukemia. 2003 Jul;17(7):1263-93
12. Shields, J.M. et al.
Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'
Trends Cell Biol. 10. 147-157. 2000
13. Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M.
3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional

- homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase
 Curr Biol. 1997 Oct 1;7(10):776-89
14. Andjelkovic M, Maira SM, Cron P, Parker PJ, Hemmings BA.
 Domain Swapping Used To Investigate the Mechanism of Protein Kinase B
 Regulation by 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 and Ser473 Kinase
 Mol Cell Biol. 1999 Jul;19(7):5061-72
 15. Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B,
 Schlessinger J.
 Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor
 tyrosine kinases to Ras signalling
 Nature. 1993 May 6;363(6424):85-8
 16. Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Bowtell D.
 The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the
 Ras activator mSos1
 Nature. 1993 May 6;363(6424):83-5
 17. Aghazadeh B, Rosen MK.
 Ligand recognition by SH3 and WW domains: the role of N-alkylation in PPII
 helices.
 Chem Biol. 1999 Sep;6(9):R241-6.)
 18. Nguyen JT, Turck CW, Cohen FE, Zuckermann RN, Lim WA.
 Exploiting the Basis of Proline Recognition by SH3 and WW Domains: Design of
 N-Substituted Inhibitors
 Science. 1998 Dec 11;282(5396):2088-92
 19. Tony Pawson and John D. Scott
 Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins
 Science 1997 December 19; 278: 2075-2080.
 20. John Kuriyan and David Cowburn.
 Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling
Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure Jun 1997, Vol. 26, pp.
 259-288.
 21. I. Sadowski, J.C. Stone and T. Pawson.
 A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases
 modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus
 P130gag-fps.
 Mol. Cell Biol. 6 (1986), pp. 4396-4408
 22. D. Anderson, C.A. Koch, L. Grey, C. Ellis, M.F. Moran and T. Pawson.
 Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated
 growth factor receptors.
 Science 250 (1990), pp. 979-982
 23. Z. Songyang, S.E. Shoelson, M. Chadhuri, G. Gish, T. Pawson, F. King, T.
 Roberts, S. Ratnofsky, B. Schaffhausen and L.C. Cantley.
 SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences.
 Cell 72 (1993), pp. 767-778
 24. P. Blaikie, D. Immanuel, J. Wu, N. Li, V. Yajnik and N. Margolis.
 A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine- phosphorylated

- growth factor receptors
J. Biol. Chem. 269 (1994), pp. 32031–32034
25. W.M. Kavanaugh and L.T. Williams.
An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins.
Science 266 (1994), pp. 1862–1865
 26. P. van der Geer, S. Wiley, V.K.M. Lai, J.P. Olivier, G.D. Gish, T. Stephens, D. Kaplan, S. Shoelson and T. Pawson.
A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides.
Curr. Biol. 5 (1995), pp. 404–412
 27. M.B. Yaffe and A. Elia.
Phosphoserine/threonine-binding domains
Curr. Opin. Cell Biol. 13 (2001), pp. 131–138
 28. D.J. Owen, P. Ornaghi, J.C. Yang, N. Lowe, P.R. Evans, P. Ballario, D. Neuhaus, P. Filetici and A.A. Travers.
The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase Gcn5p
EMBO J. 19 (2000), pp. 6141–6149
 29. E. Marmorstein.
Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2 (2001), pp. 422–432
 30. A.J. Bannister, P. Zegerman, J.F. Partridge, E.A. Miska, J.O. Thomas, R.C. Allshire and T. Kouzarides.
Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain
Nature 410 (2001), pp. 120–124
 31. R. Ren, B.J. Mayer, P. Cicchetti and D. Baltimore.
Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site.
Science 259 (1993), pp. 1157–1161
 32. R. Ren, B.J. Mayer, P. Cicchetti and D. Baltimore.
Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site.
Science 259 (1993), pp. 1157–1161
 33. H.I. Chen and M. Sudol. A. Zarrinpar and W.A. Lim.
The WW Domain of Yes-Associated Protein Binds a Proline-Rich Ligand that Differs from the Consensus Established for Src Homology 3-Binding Modules
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), pp. 7819–7823
 34. J.T. Nguyen, C.W. Turck, F.E. Cohen, R.N. Zuckermann and W. Lim.
Exploiting the Basis of Proline Recognition by SH3 and WW Domains: Design of N-Substituted Inhibitors
Science 282 (1998), pp. 2088–2092
 35. M. Sudol.
From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'
Oncogene 17 (1998), pp. 1469–1474

36. Ball LJ, Jarchau T, Oschkinat H, Walter U.
EVH1 domains: structure, function and interactions.
FEBS Lett. 2002 Feb 20;513(1):45-52.
37. Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U, Abo A.
Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization.
Cell. 1996 Mar 8;84(5):723-34.
38. Madania A, Dumoulin P, Grava S, Kitamoto H, Scharer-Brodbeck C, Soulard A, Moreau V, Winsor B.
The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex.
Mol Biol Cell. 1999 Oct;10(10):3521-38.
39. Fishkind and Wang,
New horizons for cytokinesis.
Curr Opin Cell Biol. 1995 Feb;7(1):23-31. Review.
40. Janos Demeter and Shelley sazer
imp2, a New Component of the Actin Ring in the Fission Yeast
Schizosaccharomyces pombe
the JCB, Oct 98, 415-427)
41. Fankhauser C, Reymond A, Cerutti L, Utzig S, Hofmann K, Simanis V.
The *S. pombe* cdc15 gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis.
Cell. 1995 Aug 11;82(3):435-44. Erratum in: Cell 1997 Jun 27;89(7):1185.
42. Aspenstrom Pontus
A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton.
Curr Biol. 1997 Jul 1;7(7):479-87.
43. Janos Demeter and Shelley sazer
Schizosaccharomyces pombe
imp2, a New Component of the Actin Ring in the Fission Yeast
JCB, Oct 98, 415-427
44. Susan Spencer, Donald Dowbenko, Jill Cheng, Wenlu Li, Jennifer Brush, Suzan Utzig, Viesturs Simanis, and Laurence A. Lasky
PSTPIP: A Tyrosine Phosphorylated Cleavage Furrow-associated Protein that Is a Substrate for a PEST Tyrosine Phosphatase
J. Cell Biol. 1997 138: 845-860
45. Spencer S, Dowbenko D, Cheng J, Li W, Brush J, Utzig S, Simanis V, Lasky LA.
PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase.
J Cell Biol. 1997 Aug 25;138(4):845-60.
46. Moiseyeva EP, Weller PA, Zhidkova NI, Corben EB, Patel B, Jasinska I, Koteliansky VE, Critchley DR.
Organization of the human gene encoding the cytoskeletal protein vinculin and the sequence of the vinculin promoter.
J Biol Chem. 1993 Feb 25;268(6):4318-25.

47. Bass MD, Smith BJ, Prigent SA, Critchley DR.
Talin contains three similar vinculin-binding sites predicted to form an amphipathic helix.
Biochem J. 1999 Jul 15;341 (Pt 2):257-63.
48. Markus Plomann, Rita Lange, Gaby Vopper, Harold Cremer, Uwe A. O. Heinlein, Stephen Scheff, Stanley A. Baldwin, Michael Leitges, Matthias Cramer, Mats Paulsson, Dagmar Barthels
PACSIN, a brain protein that is upregulated upon differentiation into neuronal cells
Eur. J. Biochem. 256, 201-211, 1998
49. Cousin, H., Gaultier, A., Bleux, C., Darribere, T., and Alfandari, D.
PACSIN2 Is a Regulator of the Metalloprotease/Disintegrin ADAM13
Dev. Biol. 227, 197-210, 2000
50. Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M., and Plomann, M.
All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis
J. Cell Sci. 113, 4511-4521, 2000
51. Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P. J., and Kelly, R. B.
Syndapin I, a Synaptic Dynamin-binding Protein that Associates with the Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
Mol. Biol. Cell 10, 501-513, 1999
52. Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M., and Plomann, M.
All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis
J. Cell Sci. 113, 4511-4521, 2000
53. Jari Meriläinen, Veli-Pekka Lehto, and Veli-Matti Wasenius
FAP52, a Novel, SH3 Domain-containing Focal Adhesion Protein
J. Biol. Chem. 1997 272: 23278-23284
54. Critchley, D.R.
Focal adhesions – the cytoskeletal connection
2000. *Curr. Opin Cell. Biol.* 12: 133-139,
55. Brigitte Ritter, Jan Modregger, Mats Paulsson and Markus Plomann
PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins
1999, *FEBS Lett* 454: 356-362.
56. Britta Qualmann and Regis B. Kelly
Syndapin Isoforms Participate in Receptor-mediated Endocytosis and Actin Organization
J. Cell. Biol 148 :1047-1062, 2000.
57. John Lippincott, and Rong Li .
Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution.
Cell Biol., Volume 143, Number 7, December 28, 1998, 1947-1960.
58. (c) Fankhauser, C., A. Reymond, L. Cerutti, S. Utzig, K. Hofmann, and V. Simanis. The *S. pombe* cdc15 gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis.
Cell 82: 435-444, 1995.

59. (b) Mulvihill DP, Hyams JS.
Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-like kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint
J Cell Sci. 2002 Sep 15;115(Pt 18):3575-86.
60. Cote JF, Chung PL, Theberge JF, Halle M, Spencer S, Lasky LA, Tremblay ML.
PSTPIP Is a Substrate of PTP-PEST and Serves as a Scaffold Guiding PTP-PEST Toward a Specific Dephosphorylation of WASP
The Journal of Biological Chemistry, vol277,#4 Jan25,2002 p :2973-2986
61. Wu Y, Dowbenko D, Lasky LA.
PSTPIP 2, a Second Tyrosine Phosphorylated, Cytoskeletal-associated Protein That Binds a PEST-type Protein-tyrosine Phosphatase
J Biol Chem. 1998 Nov 13;273(46):30487-96.
62. Fankhauser, C., A. Reymond, L. Cerutti, S. Utzig, K. Hofmann, and V. Simanis.,
The *S. pombe cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis.
Cell 82, 435-444, 1995
63. Susan Spencer, Donald Dowbenko, Jill Cheng, Wenlu Li, Jennifer Brush, Suzan Utzig, Viesturs Simanis, and Laurence A. Lasky
PSTPIP: A Tyrosine Phosphorylated Cleavage Furrow-associated Protein that Is a Substrate for a PEST Tyrosine Phosphatase
*J cell Bio.*138, 845-860-1997
64. Henry N. Higgs and Thomas D. Pollard
Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: Activation by a diverse Array of proteins
*Annu Rev Bioche.*70, 649-676, 2001
65. T Takenawa and H Miki
WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement
*J Cell Scie.*114, 1801-1809, 2001
66. Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K. A., and Rosen, M. K.
Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein
Nature 399, 379-383, 1999
67. Higgs, H. N., and Pollard, T. D.
Activation by Cdc42 and PIP₂ of Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASp) Stimulates Actin Nucleation by Arp2/3 Complex
J. Cell Biol. 150, 1311-1320, 2000
68. Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly
Cell 97, 221-231, 1999
69. Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T., and Takenawa, T.
A Novel Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) Binding Protein,

- WISH, Induces Arp2/3 Complex Activation Independent of Cdc42
J. Cell Biol. 152, 471-482, 2001
70. Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., and Mayer, B. J.
 Nck and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synergistically Activate Actin
 Polymerization through the N-WASP-Arp2/3 Pathway
J. Biol. Chem. 276, 26448-26452, 2001
 71. R Dyché Mullins
 How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals
 into cytoskeletal structures
Curr. Opin. Cell Biol. 12, 91-96, 2000
 72. Castresana J, Saraste M. Hartwig JH.
 Does Vav bind to F-actin through a CH domain
FEBS Lett. 1995 Oct 30;374(2):149-51
 73. Pantaloni, D., Le, Clainche, C., and Carlier, M. F.
 Mechanism of Actin-Based Motility
Science 292, 1502-1506, 2001
 74. Aspenstrom P. A
 Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a
 potential role in regulating the actin cytoskeleton.
Curr Biol. 1997 Jul 1;7(7):479-87.
 75. Lan Tian, David L. Nelson, and Donn M. Stewart,
 Cdc42-interacting Protein 4 Mediates Binding of the Wiskott-Aldrich Syndrome
 Protein to Microtubules
J. Biol. Chem 2000, 275(75)-11-17. 7854-7861.
 76. Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O.,
 Siminovitch, K. A., and Rosen, M. K.
 Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-
 Aldrich syndrome' protein
Nature 399, 379-383, 1999
 77. Higgs, H. N., and Pollard, T. D.
 Activation by Cdc42 and PIP₂ of Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASp)
 Stimulates Actin Nucleation by Arp2/3 Complex
J. Cell Biol. 150, 1311-1320, 2000
 78. Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W.
 Mechanism of N-WASP Activation by CDC42 and Phosphatidylinositol 4,5-
 bisphosphate
J. Cell Biol. 150, 1299-1310, 2000
 79. Schulte RJ, Sefton BM.
 Inhibition of the activity of SRC and Abl tyrosine protein kinases by the binding
 of the Wiskott-Aldrich syndrome protein.
Biochemistry. 2003 Aug 12;42(31):9424-30.
 80. Coppolino MG, Krause M, Hagendorff P, Monner DA, Trimble W, Grinstein S,
 Wehland J, Sechi AS.
 Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP
 and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling

- during phagocytosis.
J Cell Sci. 2001 Dec;114(Pt 23):4307-18.
81. Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA, Rosen MK.
 Auto-inhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein.
Nature. 2000 Mar 9;404(6774):151-8.
 82. Higgs, H. N., and Pollard, T. D.
 Activation by Cdc42 and PIP₂ of Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASp) Stimulates Actin Nucleation by Arp2/3 Complex
J. Cell Biol. 150, 1311-1320, 2000
 83. Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly
Cell 97, 221-231, 1999
 84. Lan Tian, David L. Nelson, and Donn M. Stewart
 Cdc42-interacting Protein 4 Mediates Binding of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein to Microtubules
J. Biol. Chem. 2000 275: 7854-7861
 85. Pontus Aspenström.
 Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton.
Current Biology 13 June 1997, 7:479-487.
 86. Zeng R, Cannon JL, Abraham RT, Way M, Billadeau DD, Bubeck-Wardenberg J, Burkhardt JK. SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site.
J Immunol. 2003 Aug 1;171(3):1360-8
 87. Terry Lechler, Gudrun A. Jonsdottir, Saskia K. Klee, D Pellman, and Rong Li,
 A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast
J. Cel Biol 2001., 155(2) 261-270)
 88. Alexandre Soulard, Terry Lechler, Vladislav Spiridonov, Andrej Shevchenko, Anna Shevchenko, Rong Li, and Barbara Winsor.
Saccharomyces cerevisiae Bzz1p Is Implicated with Type I Myosins in Actin Patch Polarization and Is Able To Recruit Actin-Polymerizing Machinery In Vitro
Mol & Cell Biol 2002, 7889-7906)
 89. Soulard A, Lechler T, Spiridonov V, Shevchenko A, Shevchenko A, Winsor B.
Saccharomyces cerevisiae Bzz1p Is Implicated with Type I Myosins in Actin Patch Polarization and Is Able To Recruit Actin-Polymerizing Machinery In Vitro
Mol Cell Biol. 2002 Nov;22(22):7889-906
 90. D Banville, S Ahmad, R Stocco, and SH Shen
 A novel protein-tyrosine phosphatase with homology to both the cytoskeletal proteins of the band 4.1 family and junction-associated guanylate kinases
J Biol Chem. 1994 Sep 2;269(35):22320-7
 91. Erratum in: *J Biol Chem* 1995 Apr 28;270(17):10359

92. JA Cooper and T Hunter
Similarities and differences between the effects of epidermal growth factor and Rous sarcoma virus
J. Cell Biol. 1981 91: 878-883
93. KL Gould, JA Cooper, A Bretscher, and T Hunter
The protein-tyrosine kinase substrate, p81, is homologous to a chicken microvillar core protein
J. Cell Biol. 1986 102: 660-669
94. S Tsukita, Y Hieda, and S Tsukita
A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell- to-cell adherens junction: purification and characterization
J. Cell Biol. 1989 108: 2369-2382
95. Lankes W, Griesmacher A, Grunwald J, Schwartz-Albiez R, Keller R.
A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation.
Biochem J. 1988 May 1;251(3):831-42.
96. Sophie Louvet-Vallée.
ERM proteins: From cellular architecture to cell signaling
Biology of the cell Volume 92, Issue 5, Pages 305-384 (August 2000)
97. Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB.
The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein.
Neuron. 1992 Nov;9(5):929-42.
98. Woods DF, Bryant PJ.
The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions.
Cell. 1991 Aug 9;66(3):451-64., 1991
99. Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM.
The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Aug 15;90(16):7834-8.
100. Woods DF, Bryant PJ.
The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions.
Cell. 1991 Aug 9;66(3):451-64
101. Maekawa K, Imagawa N, Nagamatsu M, Harada S.
Molecular cloning of a novel protein-tyrosine phosphatase containing a membrane-binding domain and GLGF repeats.
FEBS Lett. 1994 Jan 10;337(2):200-6.
102. Fanning AS, Anderson JM.
Protein-protein interactions: PDZ domain networks.
Curr Biol. 1996 Nov 1;6(11):1385-8.
103. Fanning AS, Anderson JM.
Protein modules as organizers of membrane structure.
Curr Opin Cell Biol. 1999 Aug;11(4):432-9.

104. Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC.
Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains.
Science. 1997 Jan 3;275(5296):73-7. Songyang et al., 1997
105. Murthy KK, Clark K, Fortin Y, Shen SH, Banville D.
ZRP-1, a zyxin-related protein, interacts with the second PDZ domain of the cytosolic protein tyrosine phosphatase hPTP1E.
J Biol Chem. 1999 Jul 16;274(29):20679-87.
106. Yoshimi Takai., Tayuka Sasaki and Takashi Matozaki.
Small GTP-Binding Proteins
Physiological Review, Vol 81, No 1, Jan 2001
107. Whitehead IP, Campbell S, Rossman KL, Der J Channing.
Dbl family proteins
Biochimica et Biophysica Acta 1332 (1997) F1-F23
108. C. D. Nobes and A. Hall,
Rho, Rac and Cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility.
Biochem Soc Trans. 1995 Aug;23(3):456-9.
109. Kristina M. Allen, Joseph G. Gleeson, Shubha Bagrodia, Michael W. Partington, John C. MacMillan, Richard A. Cerione, John C. Mulley, Christopher A. Walsh
PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation
Nature Genetics 20, 25 - 30 (01 Sep 1998)
110. Pasteris NG, Cadle A, Logie LJ, Porteous ME, Schwartz CE, Stevenson RE, Glover TW, Wilroy RS, Gorski JL.
Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor.
Cell. 1994 Nov 18;79(4):669-78
111. Marc Symons, Jonathan M. J. Derry, Brian Karlak, Sharon Jiang, Vanessa Lemahieu, Frank McCormick, Uta Francke, and Arie Abo. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, a Novel Effector for the GTPase CDC42Hs, Is Implicated in Actin Polymerization
Cell 1996 84: 723-734.
112. Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey.
Rho GTPases and signaling networks.
Genes Dev. 1997. 11:2295-2322
113. Zohn, I. M., S. L. Campbell, R. Khosravi-Far, K. L. Rossman, and C. J. Der.
Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested.
Oncogene 1998. 17:1415-1438
114. S Katzav, D Martin-Zanca, and M Barbacid
Vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells.
EMBO J. 1989 8: 2283-2290
115. Sonia Bañuelos, Matti Saraste, and Kristina Djinovi Carugo
Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin

- binding.
Structure (1998) 6(11), 1419-1431
116. Castresana J, Saraste M. Hartwig JH.
Does Vav bind to F-actin through a CH domain?
FEBS Lett. 1995 Oct 30;374(2):149-51
117. M Gimona and R Mital
The single CH domain of calponin is neither sufficient nor necessary for F-actin binding
J Cell Sci. 1998 Jul; 111 (Pt13): 1813-18211995
118. Carugo KD, Banuelos S, Saraste M.
Crystal structure of a calponin homology domain.
Nat Struct Biol. 1997 Mar ; 4(3):175-179
119. Hurlley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y.
Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains
Protein Sci. 1997 Feb;6(2):477-480
120. Adams J.M., Houston H., Allen J., Lints T. & Harvey R.
The hematopoietically expressed vav proto-oncogene shares homology with the dbl GDP-GTP exchange factor, the bcr gene and a yeast gene (CDC24) involved in cytoskeletal organization.
Oncogene (1992) 7, 611-618
121. Gulbins E., Coggeshall K.M., Baier G., Katzav S., Burn P. & Altman A.
Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation.
Science (1993) 260, 822-825
122. Worthylake DK, Rossman KL, Sondek J.
Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1.
Nature (2000) 408, (6813), 682-688
123. Musacchio A., Gibson T., Rice P., Thompson J. & Saraste M.
The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins.
Trends Biochem. Sci. (1993) 18, 343-348
124. Harlan J.E., Hajduk P.J., Yoon H.S & Fesik S.W.
Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.
Nature (1994) 371, 168-170
125. Touhara K., Inglese J., Pitcher J.A., Shaw G. & Lefkowitz R.J.
Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains.
J.Biol Chem (1994) 269, 10217-10220
126. Yao L., Kawakami T.
The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C.
Proc Natl Acad. Sci U.S.A. (1994) 91, 9175-9179
127. Z Ye and D Baltimore
Binding of Vav to Grb2 Through Dimerization of Src Homology 3 Domains.
Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol 91, 12629-12633,

128. Hobert O, Jallal B, Ullrich A.
Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression.
Mol Cell Biol. 1996 Jun;16(6):3066-73.
129. Hobert O, Schilling JW, Beckerle MC, Ullrich A, Jallal B.
SH3 domain-dependent interaction of the proto-oncogene product Vav with the focal contact protein zyxin.
Oncogene. 1996 Apr 4;12(7):1577-81
130. Z Ye and D Baltimore
Binding of Vav to Grb2 Through Dimerization of Src Homology 3 Domains.
Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol 91, 12629-12633,
131. M Alai, AL Mui, RL Cutler, XR Bustelo, M Barbacid and G Krystal
Steel factor stimulates the tyrosine phosphorylation of the proto- oncogene product, p95vav, in human hemopoietic cells
J Biol Chem. 1992 Sep 5;267(25):18021-5.
132. Chardin, P., S. Paris, B. Antony, S. Robineau, S. Beraud-Dufour, C. L. Jackson, and M. Chabre.
A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains.
Nature 1996. 384:481-484
133. Nimnual, A. S., B. A. Yatsula, and D. Bar-Sagi.
Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos.
Science 1998. 279:560-563
134. Bustelo, X. R., and M. Barbacid.
Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in activated B cells.
Science 1992. 256:1196-1199
135. Bustelo, X. R., J. A. Ledbetter, and M. Barbacid.
Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates.
Nature 1992. 356:68-71
136. Margolis, B., P. Hu, S. Katzav, W. Li, J. M. Oliver, A. Ullrich, A. Weiss, and J. Schlessinger.
Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs.
Nature 1992. 356:71-74
137. Movilla, N., and X. R. Bustelo.
Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins.
Mol. Cell. Biol. 1999. 19:7870-7885
138. Crespo, P., K. E. Schuebel, A. A. Ostrom, J. S. Gutkind, and X. R. Bustelo.
Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product.
Nature 1997. 385:169-172
139. Schuebel, K. E., N. Movilla, J. L. Rosa, and X. R. Bustelo.
Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-

- type and oncogenic Vav-2.
EMBO J. 1998. 17:6608-6621
140. Bustelo, X. R., P. Crespo, M. Lopez-Barahona, J. S. Gutkind, and M. Barbacid. Cbl-b, a member of the Sli-1/c-Cbl protein family, inhibits Vav-mediated c-Jun N-terminal kinase activation.
Oncogene 1997. 15:2511-2520
141. Michel, F., L. Grimaud, L. Tuosto, and O. Acuto. Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells.
J. Biol. Chem. 1998. 273:31932-31938
142. Crespo, P., X. R. Bustelo, D. S. Aaronson, O. A. Coso, M. Lopez-Barahona, M. Barbacid, and J. S. Gutkind. Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav.
Oncogene 1996. 13:455-460
143. Crespo, P., K. E. Schuebel, A. A. Ostrom, J. S. Gutkind, and X. R. Bustelo. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product.
Nature 1997. 385:169-172
144. Germani, A., F. Romero, M. Houlard, J. Camonis, S. Gisselbrecht, S. Fischer, and N. Varin-Blank. hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways.
Mol. Cell. Biol. 1999. 19:3798-3807
145. Miranti, C. K., L. Leng, P. Maschberger, J. S. Brugge, and S. J. Shattil. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1.
Curr. Biol. 1998. 8:1289-1299
146. Song, J. S., H. Haleem-Smith, R. Arudchandran, J. Gomez, P. M. Scott, J. F. Mill, T. H. Tan, and J. Rivera. Tyrosine phosphorylation of Vav stimulates IL-6 production in mast cells by a Rac/c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway.
J Immunol. 1999. 163:802-810
147. Teramoto, H., P. Salem, K. C. Robbins, X. R. Bustelo, and J. S. Gutkind. A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha.
J. Biol. Chem. 1997.272:10751-10755
148. Bubeck Wardenburg, J., R. Pappu, J. Y. Bu, B. Mayer, J. Chernoff, D. Straus, and A. C. Chan. Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76.
Immunity 1998. 9:607-616
149. Olson, M. F., N. G. Pasteris, J. L. Gorski, and A. Hall. Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases.
Curr. Biol. 1996. 6:1628-1633

150. Movilla, N., and X. R. Bustelo.
Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins.
Mol. Cell. Biol. 1999. 19:7870-7885
151. Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey.
Rho GTPases and signaling networks.
Genes Dev. 1997. 11: 2295-2322
152. Schaeffer, H. J., and M. J. Weber. 1999.
Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers.
Mol. Cell. Biol. 19:2435-2444
153. Movilla, N., and X. R. Bustelo.
Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins.
Mol. Cell. Biol. 1999. 19:7870-7885
154. Schuebel, K. E., N. Movilla, J. L. Rosa, and X. R. Bustelo.
Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2.
EMBO J. 1998. 17:6608-6621
155. Fackler OT, Luo W, Geyer M, Alberts AS, Peterlin BM.
Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions.
Mol Cell. 1999 Jun;3(6):729-39.
156. Fields S., Song O.
A novel genetic system to detect protein-protein interactions.
Nature 1989, 340 : 245-246
157. Gadhavi PL
DNA binding domain of the yeast transcriptional activator GAL4.
FEBS Lett 1997, 94 : 6042-6047
158. Gardner KH, Pan T, Narula S, Rivera E, Coloeman JE.
Structure of the binuclear metal-binding site in the GAL4 transcription factor.
Biochemistry 1991, 30 : 11292-11302
159. Chien, Bartel, Sternglanz, Fields :
Yeast two hybrid mapping.
PNAS 1991, 88 : 9578-9582
160. Emma Warbrick
Tow's company, three's a crowd: the yeast two hybrid system for mapping molecular interactions.
Structure 1997, 5 : 13-17
161. Keega K, Cooper JA.
Use of the two hybrid system to detect the association of the protein-tyrosine-phosphatase, SHPTP2, with another SH2-containing protein, Grb7.
Oncogene 12:1537-1544, 1996.
162. Breeden L, Nasmyth K.
Regulation of the yeast HO gene.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1985;50:643-50

163. Schneider, S., Buchert, M., Hoven, C.M.
An in vitro assay of beta-galactosidase from yeast.
Biotechniques, 1996. 20, 960-962
164. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A & Struhl, K.
Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc. (1998)
165. Bolivar, F., and K. Backman.
Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors.
Methods Enzymol. 1979. 68:245-267.
166. Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T.(1989) Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*. Cold Spring Harbor, NY
167. Cox, G.W., Mattieson, B.J., Giardina, S.L. and Varesio, L. Characterization of IL-2 receptor expression and function on murine macrophages.
J. Immunol. (1990). 145, 1719-1726
168. Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.(1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.
Nucleic Acids Res. 22:4673-4680
169. Seemuller U, Arnhold M, Fritz H, Wiedenmann K, Machleidt W, Heinzl R, Appelhans H, Gassen HG, Lottspeich F.
The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor.
FEBS Lett. 1986 Apr 7; 199(1): 43-8
170. Zitnik, R. J., Zhang, J., Kashem, M. A., Kohno, T., Lyons, D. E., Wright, C. D., Rosen, E., Goldberg, I., & Hayday, A. C. (1997).
The Cloning and Characterization of a Murine Secretory Leukocyte Protease Inhibitor cDNA
Biochem. Biophys. Res. Commun. 232, 687697
171. McElvaney, N. G., Nakamura, H., Birrer, P., Hebert, C. A., Wong, W. L., Alphonso, M., Baker, J. B., Catalano, M. A., & Crystal, R. G.
Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. In vivo suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerosolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor.
J. Clin. Invest. (1992) 90, 12961301
172. Song, X., Zeng, L., Jin, W., Thompson, J., Mizel, D. E., Lei, K., Billingham, R. C., Poole, A. R., & Wahl, S. M.
Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Suppresses the Inflammation and Joint Damage of Bacterial Cell Wall-induced Arthritis
J. Exp. Med. (1999). 190, 535542
173. Lentsch, A. B., Yoshidome, H., Warner, R. L., Ward, P. A., & Edwards, M. J.
Secretory leukocyte protease inhibitor in mice regulates local and remote organ inflammatory injury induced by hepatic ischemia/reperfusion
Gastroenterology (1999). 117, 953961

174. Gipson, T. S., Bless, N. M., Shanley, T. P., Crouch, L. D., Bleavins, M. R., Younkin, E. M., Sarma, V., Gibbs, D. F., Tefera, W., McConnell, P. C., et al. Regulatory Effects of Endogenous Protease Inhibitors in Acute Lung Inflammatory Injury
J. Immunol. (1999) 162, 3653-3662
175. Ashcroft, G. S., Lei, K., Jin, W., Longenecker, G., Kulkarni, A. B., Greenwell-Wild, T., Hale-Donze, H., McGrady, G., Song, X. Y., & Wahl, S. M. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing
Nat. Med. (2000) 6, 1147-1153
176. Zhang, D., Simmen, R. C., Michel, F. J., Zhao, G., Vale-Cruz, D., & Simmen, F. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Mediates Proliferation of Human Endometrial Epithelial Cells by Positive and Negative Regulation of Growth-associated Genes
J. Biol. Chem. (2002). 277, 29999-30009
177. Badinga, L., Michel, F. J., & Simmen, R. C. Uterine-Associated Serine Protease Inhibitors Stimulate Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Porcine Endometrial Glandular Epithelial Cells of Pregnancy
Biol. Reprod. (1999). 61, 380-387
178. Lentsch, A. B., Jordan, J. A., Czermak, B. J., Diehl, K. M., Younkin, E. M., Sarma, V., & Ward, P. A. Inhibition of NF- κ B Activation and Augmentation of I κ B β by Secretory Leukocyte Protease Inhibitor during Lung Inflammation
Am. J. Pathol. (1999). 154, 239-247
179. Hough, C. D., Sherman-Baust, C. A., Pizer, E. S., Montz, F. J., Im, D. D., Rosenshein, N. B., Cho, K. R., Riggins, G. J., & Morin, P. J. Large-Scale Serial Analysis of Gene Expression Reveals Genes Differentially Expressed in Ovarian Cancer
Cancer Res. (2000). 60, 6281-6287
180. Hough, C. D., Cho, K. R., Zonderman, A. B., Schwartz, D. R., & Morin, P. J. Coordinately Up-Regulated Genes in Ovarian Cancer
Cancer Res. (2001). 61, 3869-3876
181. Shigemasa, K., Tanimoto, H., Underwood, L. J., Parmley, T. H., Arihiro, K., Ohama, K., & O'Brien, T. J. Expression of the protease inhibitor antileukoprotease and the serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE) is coordinated in ovarian tumors.
Int. J. Gynecol. Cancer (2001). 11, 454-461
182. Masanao Tsuda , Shigeru Takahashi , Yuji Takahashi and Hiroshi Asahara Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP
Nature. 1993 Oct 28;365(6449):855-859
183. Masanao Tsuda , Shigeru Takahashi , Yuji Takahashi and Hiroshi Asahara Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9.
Biol. Chem., Vol. 278, Issue 29, 27224-27229, July 18, 2003
184. Dintilhac A, Bihan R, Guerrier D, Deschamps S, Pellerin I. A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the 'typical' Hoxa9 protein during embryogenesis.
Gene Expr Patterns 2004; (4): 215-222

185. Carim L, Sumoy L, Andreu N, Estivill X, Escarceller M.
Identification and expression analysis of C15orf3, a novel gene on chromosome 15q21.1→q21.2
Cytogenet Cell Genet. 2000; 88(3-4): 330-2
186. Hollenbach AD, Sublett JE, McPherson CJ, Grosveld G.
The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx.
EMBO J. 1999 Jul 1;18(13):3702-11.
187. Torii S, Egan DA, Evans RA, Reed JC.
Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs).
EMBO J. 1999 Nov 1;18(21):6037- 49.
188. Michaelson JS.
The Daxx enigma.
Apoptosis. 2000 Jun;5(3):217-20.
189. Wang,Z.X., Wang,H.Y. and Wu,M.C.
Identification and characterization of a novel human hepatocellular carcinoma-associated gene
Br. J. Cancer 85 (8), 1162-1167 (2001)
190. David Reczek, Mark Berryman, and Anthony Bretscher
Identification of EBP50: A PDZ-containing Phosphoprotein that Associates with Members of the Ezrin-Radixin-Moesin Family
J. Cell Biol. 1997 139: 169-179 (1997)
191. Autero,M., Heiska,L., Ronnstrand,L., Vaheri,A., Gahmberg,C.G. and Carpen,O
Ezrin is a substrate for Lck in T cells
FEBS Lett. 535 (1-3), 82-86 (2003)
192. Pakkanen,R. and Vaheri,A.
Cytovillin and other microvillar proteins of human choriocarcinoma cells.
J. Cell. Biochem. 41 (1), 1-12 (1989)
193. Zhong-Ying Shen, Li-Yan Xu,
Upregulated expression of Ezrin and invasive phenotype in malignantly transformed esophageal epithelial cells
World J Gastroenterol 2003 Jun;9(6):1182-1186,
194. Scanlan,M.J., Chen,Y.T., Williamson,B., Gure,A.O., Stockert,E., Gordan,J.D., Tureci,O., Sahin,U., Pfreundschuh,M. and Old,L.J.
Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies
Int. J. Cancer 76 (5), 652-658 (1998)
195. Murakumo Y., Roth T., Ishii H., Rasio D., Numata S., Croce C.M., RA Fishel R.;
A Human REV7 Homolog That Interacts with the Polymerase ζ Catalytic Subunit hREV3 and the Spindle Assembly Checkpoint Protein hMAD2
J. Biol. Chem. 275:4391-4397(2000)
196. Ohashi E, Murakumo Y, Kanjo N, Akagi J, Masutani C, Hanaoka F, Ohmori H.
Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases.
Genes Cells. 2004 Jun;9(6):523-31.

197. Chen,Z., Brand,N.J., Chen,A., Chen,S.J., Tong,J.H., Wang,Z.Y., Waxman,S. and Zelent,A.
Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia
EMBO J. 12 (3), 1161-1167 (1993)
198. Lechler T, Shevchenko A, Li R.
Direct involvement of yeast type I myosins in Cdc42-dependent actin polymerization.
J Cell Biol. 2000 Jan 24;148(2):363-73.
199. Evangelista M, Klebl BM, Tong AH, Webb BA, Leeuw T, Leberer E, Whiteway M, Thomas DY, Boone C.
A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex.
J Cell Biol. 2000 Jan 24;148(2):353-62.
200. S Katzav, D Martin-Zanca, and M Barbacid
Vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells.
EMBO J. 1989 8: 2283-2290
201. Bonnie Berger, David B. Wilson, Ethan Wolf, Theodore Tonchev, Mari Milla, and Peter S. Kim, "Predicting Coiled Coils by Use of Pairwise Residue Correlations", Proceedings of the National Academy of Science USA, vol 92, aug 1995, pp. 8259-8263. Ethan Wolf, Peter S. Kim, and Bonnie Berger, "MultiCoil: A Program for Predicting Two- and Three-Stranded Coiled Coils", Protein Science 6:1179-1189. June 1997
202. Naruya Saitou et Masatoshi Nei,
The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987 Jul;4(4):406-25.
203. Hideki Ohno, Susumu Hirabayashi, Ai Kansaku, Ikuko Yao, Makiko Tajima, Wataru Nishimura, Hirohide Ohnishi, Hirosato Mashima, Toshiro Fujita, Masao Omata and Yutaka Hata
Carom: a novel membrane-associated guanylate kinase-interacting protein with two SH3 domains.
Oncogen. 20 November 2003, Volume 22, Number 52, Pages 8422-8431
204. Soulard A, Lechler T, Spiridonov V, Shevchenko A, Shevchenko A, Winsor B.
Saccharomyces cerevisiae Bzz1p Is Implicated with Type I Myosins in Actin Patch Polarization and Is Able To Recruit Actin-Polymerizing Machinery In Vitro
Mol Cell Biol. 2002 Nov;22(22):7889-906
205. Cooper, M. D.; Chae, H. P.; Lowman, J. T.; Krivit, W.; Good, R. A. :
Wiskott-Aldrich syndrome: an immunologic deficiency disease involving the afferent limb of immunity. Am. J. Med. 44: 499-513, 1968.
206. Lan Tian, David L. Nelson, and Donn M. Stewart,
Cdc42-interacting Protein 4 Mediates Binding of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein to Microtubules
J. Biol. Chem 2000, 275(75)-11-17. 7854-7861.

207. Pontus Aspenström.
Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton.
Current Biology 13 June 1997, 7:479-487.
208. Miki H, Takenawa T.
Regulation of actin dynamics by WASP family proteins.
J Biochem (Tokyo). 2003 Sep;134(3):309-13.
209. Naoyuki Yabana and Masabumi Shibuya.
Adaptor protein APS binds the NH2-terminal autoinhibitory domain of guanine nucleotide exchange factor Vav3 and augments its activity.
Oncogene. 2002 Oct 31;21(50):7720-9.
210. Kornel E. Schuebel, Nieves Movilla, José Luis Rosa and Xosé R. Bustelo.
Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2.
The EMBO Journal Vol. 17, pp. 6608-6621, 1998
211. Martin Turner & Daniel D. Billadeau VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors
Nature Reviews Immunology 2, 476 -486 (2002); doi:10.1038/nri840
212. Z Ye and D Baltimore
Binding of Vav to Grb2 Through Dimerization of Src Homology 3 Domains
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1994). 91, 12629-12633,
213. Katoh M, Katoh M.
Identification and characterization of human FCHSD1 and FCHSD2 genes in silico.
Int J Mol Med. 2004 May;13(5):749-54.
214. Onodera, H., D. G. Motto, G. A. Koretzky, D. M. Rothstein.
Differential regulation of activation-induced tyrosine phosphorylation and recruitment of SLP-76 to Vav by distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase.
J. Biol. Chem. 1996. 271:22225
215. Tuosto, L., F. Michel, O. Acuto.
p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells.
J. Exp. Med. 1996. 184:1161-1166
216. Wu, J., D. G. Motto, G. A. Koretzky, A. Weiss.
Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation.
Immunity 1996. 4:593-602
217. Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., and Orcutt, B. C.
A model for evolutionary change in proteins.
Atlas of Protein Sequence and Structure, Ed : 1978 volume 5, pages 345-352.
218. Lopez-Lago M, Lee H, Cruz C, Movilla N, Bustelo XR.
Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav.
Mol Cell Biol. 2000 Mar;20(5):1678-91.
219. Begum R, Nur-E-Kamal MS, Zaman MA.
The role of Rho GTPases in the regulation of the rearrangement of actin

- cytoskeleton and cell movement.
Exp Mol Med. 2004 Aug 31;36(4):358-66.
220. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF.
RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 May;5(5):355-66.
221. Villalonga P, Guasch RM, Riento K, Ridley AJ.
RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation.
Mol Cell Biol. 2004 Sep;24(18):7829-40.
222. Liu SY, Yen CY, Yang SC, Chiang WF, Chang KW. Overexpression of Rac-1 small GTPase binding protein in oral squamous cell carcinoma.
J Oral Maxillofac Surg. 2004 Jun;62(6):702-7.
223. Crowe DL.
Overlapping functions of Ras and Rac GTPases in regulating cancer cell proliferation and invasion.
Anticancer Res. 2004 Mar-Apr;24(2B):593-7.
224. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y.
Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 May 18;101(20):7618-23. Epub 2004 May 05.
225. Guo F, Zheng Y.
Rho family GTPases cooperate with p53 deletion to promote primary mouse embryonic fibroblast cell invasion.
Oncogene. 2004 Jul 22;23(33):5577-85.
226. Cheng TL, Symons M, Jou TS.
Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1.
Exp Cell Res. 2004 May 1;295(2):497-511.
227. Basseres DS, Tizzei EV, Duarte AA, Costa FF, Saad ST.
ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein.
Biochem Biophys Res Commun. 2002 Jun 14;294(3):579-85.
228. *J Biol Chem.* 2000 Oct 13;275(41):31786-91.
Biochemical characterization of Rab3-GTPase-activating protein reveals a mechanism similar to that of Ras-GAP.
Clabecq A, Henry JP, Darchen F.

