

Université de Montréal

Caractérisation moléculaire des petites protéines G
de la famille Rho dans le rein

par
Diane Bilodeau

Département de physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

septembre 1998

© Diane Bilodeau, 2000



W

4

U58

2000

v. 072

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation moléculaire des petites protéines G
de la famille Rho dans le rein

présentée par
Diane Bilodeau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Mme Madhu Anand-Srivastava, Président-rapporteur

M. Richard Béliveau, Directeur de recherche

Michel Bouvier, Membre du jury

Sylvain Bourgoin, Examineur externe

Thèse acceptée le :

SOMMAIRE

Les petites protéines G de la famille Rho jouent un rôle primordial dans l'organisation de la morphologie cellulaire qu'elles accordent aux besoins de la cellule. Elles constituent également une voie importante de signalisation vers le noyau, participent à la régulation du cycle cellulaire et sont impliquées lors du phénomène apoptotique. Ces protéines oscillent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Le passage de l'un à l'autre est assisté par des protéines stimulant (GDS) ou inhibant (GDI) l'activité d'échange des nucléotides et par des protéines stimulant leur activité GTPasique (GAP) intrinsèquement faible. Ce cycle d'activation s'accompagne d'un cycle de localisation, les protéines Rho étant actives à la membrane et inactives dans la fraction soluble. La protéine GDI, elle-même cytosolique, sert de navette aux protéines Rho lors de leur transit cytoplasmique.

Nous avons caractérisé l'activité de solubilisation des protéines Rho par la protéine de fusion GST-GDI *in vitro*, utilisant comme modèle les membranes à bordure en brosse rénales. Deux petites protéines G de la famille Rho, RhoA et Cdc42, sont spécifiquement extraites en présence de GST-GDI. Cette activité d'extraction est cependant saturable. Une fraction importante (près de 50%) des protéines RhoA et Cdc42 ne peut être extraite suggérant la présence de sous-populations membranaires. L'activité de solubilisation des protéines Rho par GST-GDI s'est avérée sensible à la force ionique et est complètement inhibée en conditions physiologiques de température et de sel. La présence de sel n'empêche pas la liaison des protéines Rho à GST-GDI puisque les complexes GST-GDI/Rho coprécipitent sur billes de glutathion-sépharose, en milieu de force ionique physiologique. D'autre part, un prélavage des membranes avec une solution saline inhibe l'extraction subséquente des Rho par GDI, suggérant fortement qu'un facteur essentiel soit inhibé ou perdu lors du traitement. Ces faits suggèrent que la translocation des protéines Rho par GDI soit normalement inhibée *in vivo* et nous amènent à proposer un modèle de régulation de leur cycle d'activation.

Nos travaux ont également mis en évidence une protéolyse de GST-GDI au cours des essais d'extraction en présence de membranes à bordure en brosse rénales. Le phénomène est observé en présence de quelques autres tissus et dans tous les cas, un fragment protéolytique majeur de 17 kDa est généré, révélant la présence d'une zone de vulnérabilité protéolytique sur GDI. Le fragment ne peut extraire les Rho des membranes, suggérant que l'activité GDI puisse être régulée par protéolyse. L'intégrité de GST-GDI est préservée en présence de Ac-YVAD-CHO, un inhibiteur spécifique de caspases. Le séquençage du fragment généré a cependant révélé que le site de coupure sur GST-GDI ne correspond pas à un site d'activité caspase. Ces faits suggèrent que l'activité des protéines Rho puisse être régulée par une cascade protéolytique incluant une caspase endogène à la membrane à bordure en brosse rénale.

D'autre part, notre étude de la stimulation par le $GTP\gamma S$ d'une activité de carboxyméthylation des protéines du rein a démontré que l'activité stimulée implique une isoaspartyle méthyltransférase (PIMT). Cette enzyme catalyse le transfert de groupements méthyles provenant du S-adénosyl-L-méthionine, vers la fonction carboxylique portée par la chaîne latérale de résidus isoaspartyles. La PIMT est réputée participer à la réparation de protéines endommagées issues de modifications spontanées de résidus asparagines et aspartates. L'effet stimulateur du $GTP\gamma S$ sur l'activité PIMT est modulé par le vanadate et complètement inhibé par la génistéine et le tyrphostin. L'analyse des profils de méthylation sur gel révèle des modes d'action différents. La génistéine prévient l'accroissement du rythme des cycles de méthylation/déméthylation sur l'ensemble des substrats tel qu'observé habituellement en présence de $GTP\gamma S$, tandis que le tyrphostin agit plutôt en bloquant une étape de déméthylation. Les résultats obtenus en présence de vanadate et de génistéine suggèrent fortement l'implication d'une activité tyrosine kinase lors de la stimulation de l'activité PIMT par le $GTP\gamma S$ au niveau du rein.

Mots clés: petites protéines G; Rho; GDI; translocation; méthylation; rein.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xv
REMERCIEMENTS	xvii
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1 Les petites protéines G	1
1.1.1 Classification	1
1.1.2 La famille des protéines Rho	3
1.1.3 La maturation des protéines Rho	6
1.1.3.1 L'isoprénylation	6
1.1.3.2 La protéolyse du tripeptide	9
1.1.3.3 La méthylation des cystéines isoprénylées	9
1.2 Les protéines régulatrices de l'activité Rho	11
1.2.1 Les protéines GDS	12
1.2.1.1 Rôle du domaine DH	12
1.2.1.2 Rôle du domaine PH	14
1.2.1.3 Autres domaines	15
1.2.1.4 Potentiel oncogénique des protéines GDS	17

1.2.2 Les protéines GAP	18
1.2.3 Les protéines GDI.....	20
1.3 Les effecteurs des protéines Rho.....	25
1.3.1 Les effecteurs à domaine CRIB	25
1.3.2 Les effecteurs à domaine REM1.....	27
1.3.3 Les effecteurs à domaine REM2.....	28
1.3.4 Les effecteurs orphelins	29
1.4 Fonctions cellulaires des protéines Rho	36
1.4.1 Transmission des signaux.....	36
1.4.1.1 <i>Signalisation en amont</i>	36
1.4.1.1.1 <i>Voie des protéines G hétérotrimériques</i>	37
1.4.1.1.2 <i>Voie des tyrosines kinases</i>	40
1.4.1.2 <i>Signalisation co-latérale</i>	41
1.4.1.3 <i>Signalisation en aval</i>	42
1.4.2 Transcription et cycle cellulaire	45
1.4.3 Apoptose.....	47
1.4.4 Organisation du cytosquelette.....	48
1.4.4.1 <i>Polymérisation de l'actine</i>	48
1.4.4.2 <i>Contractilité et motilité</i>	51
1.4.4.3 <i>Adhérence au substrat</i>	53
1.4.5 Cytokinèse.....	55
1.5 Pathologies associées aux protéines Rho.....	55
1.5.1 Pathologies congénitales	56
1.5.2 Pathologies vasculaires.....	57
1.5.3 Cancer	58

1.6 Le rein.....	59
1.6.1 Physiologie rénale	59
1.6.2 La cellule épithéliale	62
1.6.3 Les petites protéines G dans le rein	64
1.6.4 La carboxyméthylation des protéines rénales	64
1.7 Hypothèses de travail et objectifs expérimentaux.....	66
1.7.1 Hypothèses de travail.....	66
1.7.2 Objectifs expérimentaux.....	67
CHAPITRE II : ARTICLES.....	69
2.1 Regulation of cytoskeletal functions by Rho small GTP- binding proteins in normal and cancer cells	70
2.2 Regulation of Rho protein binding to membranes by rhoGDI: inhibition of releasing activity under physiological ionic conditions	80
2.3 Regulation of rhoGDI activity by proteolysis in kidney membranes.....	125
2.4 Inhibition of GTPγS-dependent L-isoaspartyl protein methylation by tyrosine kinase inhibitors in kidney	164
CHAPITRE III : DISCUSSION	199
3.1 Contrôle de l'activité des petites protéines G de la famille Rho par leur localisation intracellulaire	199
3.2 Contrôle de l'activité des petites protéines G de la famille Rho par la protéolyse	204
3.3 Régulation de la stimulation GTPγS-dépendante de la méthylation des protéines sur résidus isoaspartyles	207

CHAPITRE IV: CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES.....	209
CHAPITRE V: BIBLIOGRAPHIE	214
ANNEXE	250
Contribution des coauteurs	250
CURRICULUM VITAE.....	251

LISTE DES TABLEAUX

Thèse

TABLEAU I.	Classification des petites protéines G chez les mammifères	2
TABLEAU II.	Liaison, activité d'échange nucléotidique, et distribution des protéines à domaine DH.....	13
TABLEAU III.	Les motifs de liaison sur les protéines régulatrices de l'activité Rho	16
TABLEAU IV.	Spécificité d'action et distribution tissulaire des protéines RhoGap.....	19
TABLEAU V.	Spécificité des effecteurs de la famille Rho.....	26
TABLEAU VI.	Pathologies associées aux protéines Rho	59
TABLEAU VII.	Fonctions rénales	61
Article 1		
TABLE I	Regulators of Rho-related small GTP-binding proteins	73
TABLE II	Cellular functions of Rho-related proteins	74
TABLE III	Physiological roles and pathologies associated with Rho-regulated cytoskeletal organisation.....	76
Article 2		
TABLE I	Quantification of Cdc42, RhoA and GDI in kidney BBM and soluble fractions	115

Article 4	
TABLE I	Nucleotide dependency of PIMT activity in kidney cytosol	189
TABLE II	Effect of phosphatase and kinase inhibitors on PIMT activity in kidney cytosol	190

LISTE DES FIGURES

Thèse

FIGURE 1. Analyse phylogénique des petites protéines G de la famille Rho	4
FIGURE 2. La voie métabolique du mévalonate.....	7
FIGURE 3. Vésiculation des membranes golgiennes.....	32
FIGURE 4. Formation du complexe de la NADPH oxydase durant la phagocytose.....	34
FIGURE 5. Activation des petites protéines G par les protéines G hétérotrimériques.....	39
FIGURE 6. Cascade d'activation des MAPkinases.....	44
FIGURE 7. Activation de la transcription sur <i>c-fos</i>	46
FIGURE 8. Régulation de la polymérisation de l'actine par les protéines Rho.....	50
FIGURE 9. Rôle des protéines Rho dans la contraction du muscle lisse.....	52
FIGURE 10. La cellule épithéliale rénale.....	63
FIGURE 11. Réparation de résidus isoaspartyles par méthylation.....	65
FIGURE 12. Modèle du cycle de translocation des protéines Rho.....	203

Article 1	
FIGURE 1. Features of Rho GTP-binding proteins.....	71
FIGURE 2. Processing of small GTP-binding proteins.....	72
FIGURE 3. Regulation of Rho small GTP-binding proteins.....	73
FIGURE 4. Biochemical pathways involving Rho-related GTP-binding proteins.....	74
Article 2	
FIGURE 1. GST-GDI-stimulated release of Cdc42 and RhoA from BBM	116
FIGURE 2. Concentration dependence of Cdc42 and RhoA extraction from BBM by GST-GDI	117
FIGURE 3. Sequential extraction of Cdc42 and RhoA from BBM by GST-GDI	118
FIGURE 4. Ionic strength inhibits the release of Cdc42 and RhoA from BBM induced by GST-GDI	119
FIGURE 5. Tissue distribution of the KCl inhibition of Rho protein extraction activity of GST-GDI.....	120
FIGURE 6. Effect of temperature on the release of Cdc42 and RhoA from BBM by GST-GDI	121
FIGURE 7. Kinetics of Cdc42 and RhoA release from kidney BBM by GST-GDI	122
FIGURE 8. Effects of protease inhibitors on Cdc42 and RhoA release from kidney BBM by GST-GDI.....	123
FIGURE 9. Inhibition of GST-GDI release activity on Cdc42 and RhoA following KCl pre-treatment of kidney BBM.....	124

Article 3	
FIGURE 1. GDI and GST-GDI cleavage in the presence of BBM.....	156
FIGURE 2. Kinetic analysis of GST-GDI cleavage in the presence of BBM.....	157
FIGURE 3. Stimulation of BBM-mediated GST-GDI cleavage by increasing ionic strength.....	158
FIGURE 4. Tissue distribution of GST-GDI proteolysis	159
FIGURE 5. Effects of protease inhibitors on GST-GDI cleavage in BBM.....	160
FIGURE 6. Dose-dependent inhibition of GST-GDI cleavage by the tetrapeptide Ac-YVAD-CHO	161
FIGURE 7. Schematic structure and fragments resulting from proteolytic cleavage of GDI and D4GDI.....	162
FIGURE 8. Proteolytic cleavage of GST-GDI inhibits it from releasing Rho proteins from BBM.....	163

Article 4	
FIGURE 1. Competition by DSIP-isoD of basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol.....	194
FIGURE 2. Effects of divalent cations on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol.....	195
FIGURE 3. Dose-response effect of vanadate on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol.....	196
FIGURE 4. Dose-response effect of genistein and tyrphostin on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol.....	197
FIGURE 5. Effect of phosphorylation on the methylation of soluble proteins in kidney	198

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
BBM	membrane à bordure en brosse
CNF	"cytotoxic necrotizing factor"
CRIB	"Cdc42 and Rac interacting binding motif"
DH	"Dbl homology domain"
ERK	"extracellular regulated kinase"
FAK	"focal adhesion kinase"
FT	farnésyle transférase
GAP	protéine stimulant l'hydrolyse du GTP
GDI	protéine inhibant l'échange des nucléotides
GDS	protéine stimulant l'échange des nucléotides
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GEF	facteur d'échange des nucléotides
GGT	géranylgéranyle transférase
GTP	guanosine 5'-triphosphate
HEK	"human embryonic kidney"
ICE	"cysteine aspartate protease"
JNK	"c-Jun N-terminal kinase"
LPA	acide lysophosphatidique
MBS	"myosin binding subunit"
MLC	"myosin light chain"
MLCK	"myosin light chain kinase"
NHE	échangeur Na-H
NK	"natural killer"
PCMT	prénylcystéine méthyltransférase
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
P-gp	P-glycoprotéine
PH	"plekstrin homology domain"
PIMT	protéine isoaspartyle métyltransférase
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol biphosphate

PIP-5K	phosphatidylinositol 4-phosphate-5 kinase
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
REM	"Rho effector motif"
SAPK	"stress-activated protein kinase"
SH2	"Src homology domain type 2"
SH3	"Src homology domain type 3"
SRF	"serum response factor"
SRE	"serum response element"
TCF	facteur tertiaire
TPCK	"N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone"

REMERCIEMENTS

Cette thèse de doctorat est l'aboutissement d'un cheminement personnel. Cependant, je n'aurais jamais pu mener ce projet à terme sans le soutien de mon entourage. L'occasion m'est donnée ici de reconnaître cet apport. Merci donc à mon directeur de recherche, le Dr Richard Béliveau pour la qualité de son encadrement professionnel, technique et humain. Je me considère privilégiée d'avoir pu bénéficier d'un tel modèle d'engagement, de rigueur intellectuelle et de discipline, doublé d'un enthousiasme absolument contagieux. Je remercie le Conseil de Recherches Médicales du Canada et la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour leur soutien financier. Merci également à toute l'équipe, si dynamique, du laboratoire d'oncologie moléculaire. Un merci plus particulier encore au Dr Dominique Boivin pour avoir partagé avec moi ses connaissances, son amitié, son humour, avec en prime souvent, une pointe d'esprit critique. Merci à mes collègues et complices depuis le baccalauréat: au Dr Edith Beaulieu pour son efficacité, au Dr Christian Boyer pour son rire salvateur et à feu Mario Plouffe pour son imagination sans borne. Je remercie aussi avec tendresse mes enfants, Christiane et François, pour avoir toujours appuyé une mère quelque peu différente. Finalement je remercie affectueusement mon compagnon de longue date, Raynald Voyer, qui plus que tout autre a eu à subir les contrecoups des décisions et indécisions ayant marqué cette période de ma vie et qui malgré tout a su demeurer disponible.

À ma mère,

Irène Lépine

parce que les absents ont parfois raison

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Pour la cellule, percevoir et réagir adéquatement aux modifications de son environnement, est une question de vie ou de mort. La meilleure façon d'y parvenir est d'élaborer et d'entretenir un réseau de communication parfaitement intégré lui permettant d'enregistrer et d'harmoniser les événements internes et externes. Ces voies de signalisation, dont on commence à peine à soupçonner toute la complexité, constituent un champ d'investigation absolument fascinant. Je vous invite donc à venir fureter avec moi du côté des petites protéines G, acteurs moléculaires importants de l'organisation cellulaire.

1.1 Les petites protéines G

1.1.1 Classification

Les petites protéines G sont ainsi nommées en raison de leur faible poids moléculaire (pouvant varier de 20 à 35 kDa) et de la propriété qu'elles ont de lier les nucléotides guanylés. Les produits du gène *Ras* furent les premières petites protéines G reconnues comme telles, au début des années 1980. La reconnaissance de leur potentiel oncogénique a favorisé le développement rapide de ce champ de recherche. Depuis, plus de 60 petites protéines G ont été identifiées et regroupées en six familles: Ras, Rho, Rab, Arf, Ran et Rad. En plus de partager une homologie de séquence au niveau de leur composition en acides aminés, les membres d'une même famille se répartissent les commandes de fonctions biologiques apparentées (Tableau I). Les protéines de la famille Ras jouent un rôle primordial dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaires. Les protéines de la famille Rho assument la responsabilité de l'organisation du cytosquelette tout en participant également à la régulation de la croissance cellulaire. Les protéines Rab et Arf collaborent au transport vésiculaire. Les protéines Ran supervisent l'importation de protéines et d'ARN au noyau. Les fonctions des protéines Rad, qui sont de découverte récente, n'ont pas encore été clairement définies, mais leur expression présente la particularité d'être sous

TABLEAU I. Classification des petites protéines G chez les mammifères

Famille	Membres	Fonctions biologiques
Ras	H-Ras, K-Ras, N-Ras, R-Ras, TC21 Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B, RalA, RalB,	Croissance et prolifération cellulaires
Rho	RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE RhoH/TTF RhoG Cdc42/G25K, TC10 Rac1, Rac2, Rac3	Morphologie cellulaire, activation génique, prolifération cellulaire, flambée oxydative et apoptose
Rab	Rab1A, Rab1B, Rab2, Rab3A, Rab3B, Rab3C, Rab3D Rab4A, Rab4B, Rab5A, Rab5B, Rab5C, Rab6, Rab7, Rab8, Rab9, Rab10, Rab11	Transport vésiculaire compartimentalisé
Arf	Arf1, Arf2, Arf3, Arf4, Arf5, Arf6	Transport vésiculaire
Ran	Ran/TC4	Importation de protéines et d'ARN vers le noyau
Rad	Rad, Gern, Kir, Rem	Contrôle de voies kinases dépendantes du calcium?

contrôle transcriptionnel.

1.1.2 La famille des protéines Rho

Les protéines de la famille Rho sont ubiquitaires. Chez les mammifères, cette famille s'est ramifiée en six classes principales regroupant quatorze membres (Fig. 1). La classe Rho englobe RhoA, RhoB, RhoC et RhoD. Les protéines Rnd1, Rnd2 et Rnd3/RhoE forment une branche distincte. RhoH/TTF constitue une autre classe, tout comme RhoG. La classe Cdc42 comprend Cdc42/G25K et TC10. La classe Rac est formée de Rac1, Rac2 et Rac3. L'expression des protéines de la famille Rho n'est pas restreinte aux mammifères. Les organismes inférieurs tels *C. elegans*, *Drosophila* et *Aplysia* expriment aussi les différentes classes de la famille. Cependant, les protéines Rac sont absentes chez *Saccharomyces cerevisiae*, qui possède en contrepartie de multiples isoformes de Rho, dont certains lui sont spécifiques (Lim *et al.*, 1996).

RhoA est ubiquitaire et son expression est stable. RhoB a une localisation vésiculaire et périnucléaire (Zalcman *et al.*, 1995). C'est une protéine instable dont l'expression est stimulée lors de la transition G1 vers S du cycle cellulaire. Elle est induite par les facteurs de croissance, de même que par le traitement des cellules aux rayons ultraviolets ou à la cisplatine (Fritz *et al.*, 1995). RhoC est fortement homologue à RhoA. Son expression est induite par les cytokines et cette induction est bloquée par les corticoïdes, suggérant un rôle dans les processus inflammatoires (Schwiebert *et al.*, 1997). RhoD est présente au niveau des membranes plasmiques et des endosomes, dont elle régule la motilité (Murphy *et al.*, 1996). Les protéines Rnd se distinguent par leur faible affinité pour le GDP et leur incapacité à hydrolyser le GTP ce qui leur confère un état d'activation permanent (Foster *et al.*, 1996; Nobes *et al.*, 1998). Elles sont présentes au niveau des plaques d'adhérence d'où elles semblent contrôler l'adhérence cellulaire (Nobes *et al.*, 1998; Guasch *et al.*, 1998). L'expression de RhoH/TTF est restreinte au tissu hématopoïétique (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997) et le gène codant pour cette protéine est sujet à un type de translocation observé au cours du développement de certains lymphomes (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1995).

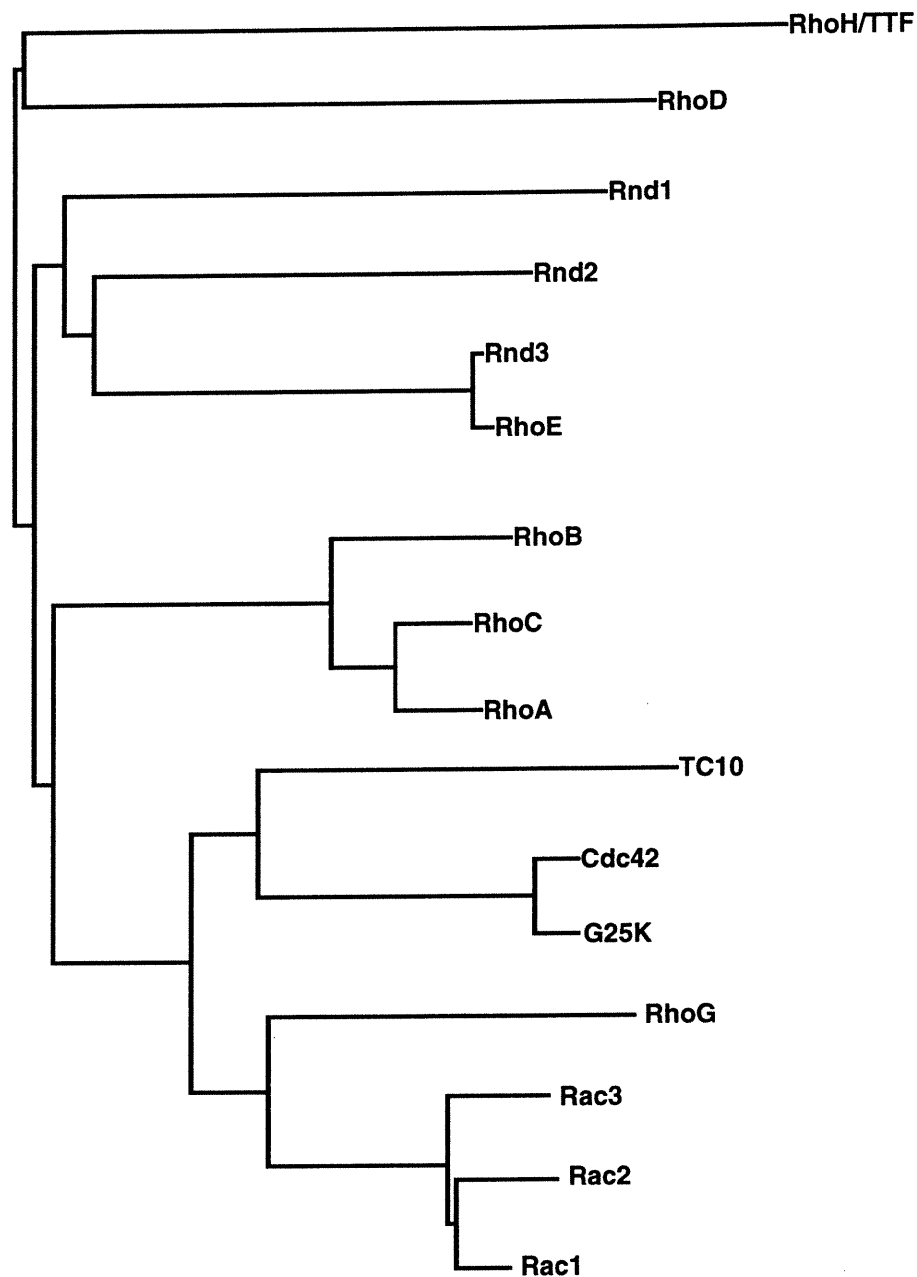


FIGURE 1. Analyse phylogénique des petites protéines G de la famille Rho

Le degré de parenté des protéines Rho a été déterminé par comparaison de leur séquence en acides aminés, à l'aide de la méthode CLUSTAL. La longueur relative des branchements est proportionnelle à leur niveau de divergence. D'après Zohn *et al.*, (1998).

RhoG est une protéine ubiquitaire dont l'expression est régulée en fonction du cycle cellulaire, avec accumulation en phase G1 tardive (Vincent *et al.*, 1992). RhoG, qui est intrinsèquement activée, stimule certaines fonctions de Cdc42 et Rac chez les fibroblastes, soulignant la présence de cascades d'activation à l'intérieur de la famille (Gauthier-Rouvière *et al.*, 1998). Cdc42 est également ubiquitaire et comme dans le cas de RhoA, son expression est stable. TC10 a été identifiée en tant que protéine apparentée à Cdc42, dans une lignée de tétrocarcinomes humains (Drivas *et al.*, 1990). Rac1 et Rac2 participent à la phagocytose et à la flambée oxydative résultant de l'activation du complexe de la NADPH oxydase. Rac1 est ubiquitaire, par contre l'expression de Rac2 est restreinte aux cellules de la lignée hématopoïétique. Pour sa part, Rac3 est induite par le sérum et cette protéine participe à la signalisation cellulaire (Haataja *et al.*, 1997).

Toutes les protéines de la famille Rho participent à la réorganisation du cytosquelette à différents niveaux. Elles ont également d'autres fonctions qui seront décrites plus loin. Une caractéristique importante de certains membres de la famille, dont Cdc42 et RhoA, est leur association cyclique aux membranes. Ce cycle de localisation est, selon toute vraisemblance, un facteur important pour le contrôle de leur activité.

Les protéines Rho sont la cible de nombreuses toxines bactériennes. La toxine C3, un produit de *Clostridium botulinum*, modifie RhoA, RhoB et RhoC par ADP-rybosylation d'une asparagine, située dans la région effectrice (Aktories, 1997). Cette modification inactive la protéine et pour cette raison est couramment utilisée pour mettre en évidence la participation des protéines Rho à certains événements cellulaires. Rac et Cdc42 ne sont cependant pas ciblées par la toxine. A l'opposé, les toxines CNF (cytotoxic necrotizing factors) de *Escherichia coli* stimulent de façon drastique les fonctions de RhoA (Flateau *et al.*, 1997). Elles agissent en catalysant la désamidation d'un résidu glutamine sur la petite protéine G, ce qui cause l'inhibition de l'activité GTPasique, qu'elle soit intrinsèque ou stimulée. La protéine s'en trouve donc intrinsèquement activée. Des données récentes indiquent que les CNF modifient également Cdc42 et Rac. Les toxines C3 et CNF sont donc des

outils de choix pour l'étude des fonctions des protéines Rho. Les fonctions de l'ensemble des protéines de la famille Rho sont aussi étudiées à l'aide de mutants. La mutation d'une glycine pour une valine en position 14 sur RhoA et en position 12 sur Cdc42 et Rac les active de façon constitutive, tandis que la mutation d'une thréonine pour une asparagine en position 17 sur Cdc42 et Rac les inactive.

1.1.3 La maturation des protéines Rho

Les petites protéines G de la famille Rho, tout comme celles de la famille Ras, ont à leur extrémité C-terminale un motif particulier commandant une série de modifications post-traductionnelles. Le motif est de type CXXX (où C est une cystéine et X un acide aminé quelconque). Suivant leur synthèse, la maturation des protéines à motif CXXX se fait en trois étapes: isoprénylation du groupement thiol de la cystéine par une isoprényltransférase, clivage protéolytique des trois derniers acides aminés par une endoprotéase et méthylation de la fonction carboxylique libérée sur la cystéine par une méthyltransférase (Article 1, Fig. 2). Les trois enzymes nécessaires à la maturation des petites protéines G sont présentes chez les eucaryotes, mais absentes chez les procaryotes tels *E. coli* (Volker *et al.*, 1992).

1.1.3.1 L'isoprénylation

Les prényltransférases sont des enzymes cytosoliques. Les groupements isoprènes transférés sur les protéines G sont issus de la voie du mévalonate menant à la synthèse du cholestérol (Fig. 2). Selon la nature de l'isoprène utilisé, on distingue deux types de prényltransférases. La farnésyle transférase (FT) catalyse le transfert du groupement farnésyle (C₁₅) provenant du farnésyle pyrophosphate vers la cystéine de protéines se terminant en CXXX, via la formation d'un lien thioether. C'est une métalloenzyme requérant la présence de Zn²⁺ et de Mg²⁺. L'enzyme est un hétérodimère composé d'une sous-unité α de 49 kDa et d'une sous-unité β de 46 kDa. La sous-unité β est responsable de la liaison au substrat protéique,

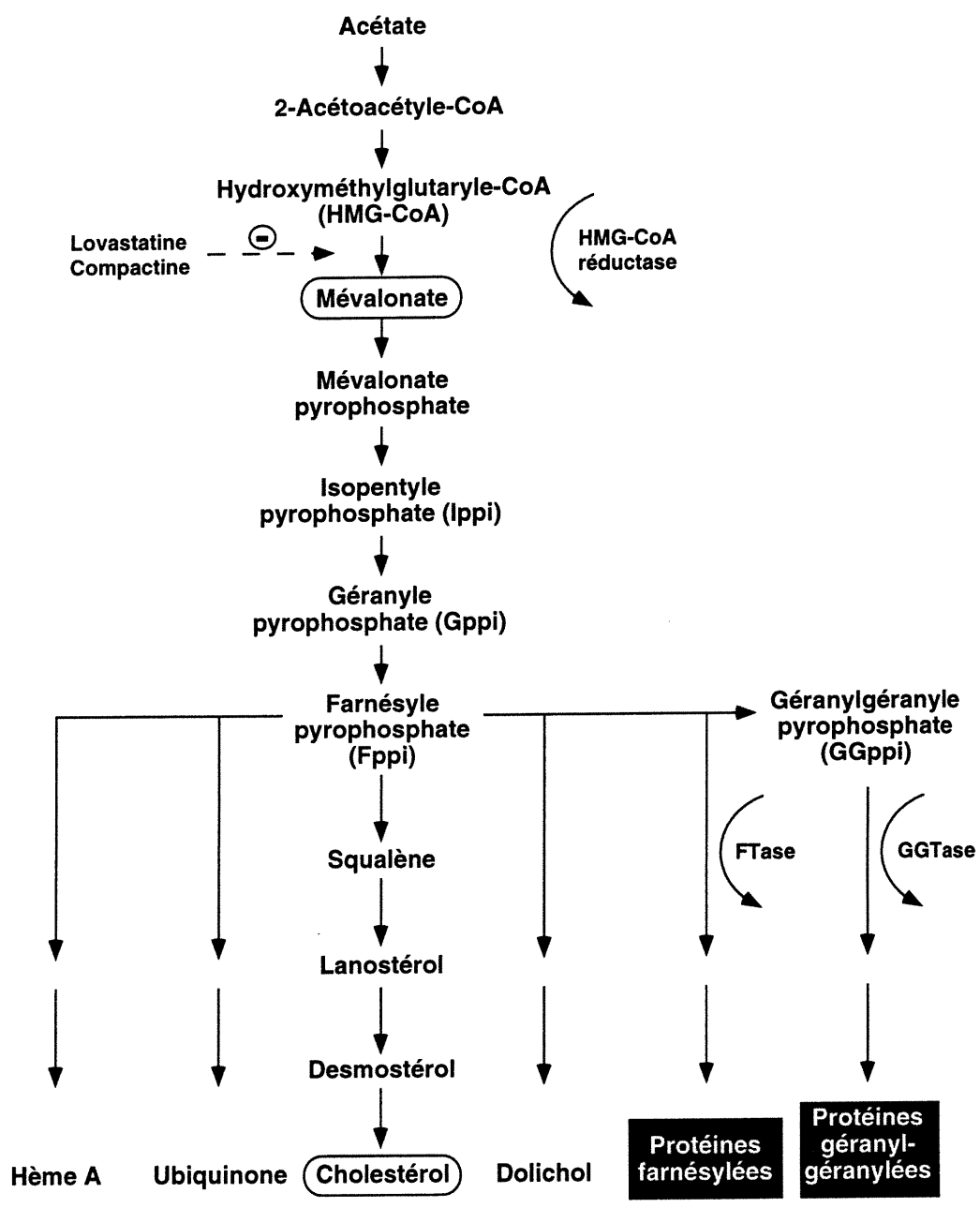


FIGURE 2. La voie métabolique du mévalonate.
D'après Russell (1992)

tandis que la sous-unité α lie le farnésyle diphosphate (Newman et Magee, 1993).

L'autre type de prényltransférase, la géranylgéranyle transférase, comprend deux classes. La géranylgéranyle transférase de classe I (GGTI) catalyse le transfert du groupement géranylgéranyle (C_{20}) provenant du géranylgéranyle pyrophosphate vers la cystéine de protéines se terminant en CXXX, via la formation d'un lien thioether. GGTI est également une métalloenzyme, dépendante de la présence de Zn^{2+} et de Mg^{2+} , et c'est aussi un hétérodimère $\alpha\beta$ (Newman et Magee, 1993). Les sous-unités α de la géranylgéranyle transférase I et de la farnésyle transférase sont identiques, mais les sous-unités β sont distinctes (Moomaw et Casey, 1992). La géranylgéranyle transférase de classe II (GGTII) catalyse le transfert du groupement géranylgéranyle (C_{20}) provenant du géranylgéranyle pyrophosphate vers la cystéine de protéines se terminant en XXCC, en CCXX ou en CXC, comme c'est le cas pour les protéines Rab (Glomset et Farnsworth, 1994). Contrairement aux deux autres prényltransférases, cette enzyme est inhibée par le Zn^{2+} (Seabra *et al.*, 1992). La GGTII se distingue également par sa composition hétérotrimérique. Les sous-unités α et β , d'un poids de 60 et 38 kDa respectivement, sont responsables de la catalyse. La troisième sous-unité de 95 kDa est une protéine accessoire servant d'escorte aux protéines Rab nouvellement synthétisées (Alexandrov *et al.*, 1994).

Les protéines à motif CXXX peuvent donc être soit farnésylées ou géranylgéranylées. La nature du dernier acide aminé de la séquence protéique détermine habituellement la spécificité de la réaction (Glomset et Farnsworth, 1994). Ainsi les protéines se terminant par une sérine ou une méthionine sont farnésylées, alors que celles se terminant par une isoleucine ou une leucine sont géranylgéranylées. Le groupement isoprène transféré sur les Rho est de type géranylgéranyle, sauf sur Rnd3/RhoE qui est farnésylée (Foster *et al.*, 1996) et sur RhoB qui peut être soit farnésylée ou géranylgéranylée (Armstrong *et al.*, 1995; Lebowitz *et al.*, 1997). Si la farnésylation de Rnd3/RhoE est prévisible, le dernier acide aminé de la protéine étant une méthionine, celle de RhoB est pour le moins inattendue, la

protéine se terminant par une leucine. Pour ajouter à l'étonnement, il semble que le transfert du farnésyle sur RhoB puisse être catalysé soit par FT ou par GGTI (Armstrong *et al.*, 1995; Lebowitz *et al.*, 1997). Plusieurs rôles ont été avancés pour l'isoprénylation des protéines. De façon générale, l'isoprénylation des protéines Rho assure l'hydrophobicité nécessaire à leur ancrage dans la membrane. Elle est également prérequis à leur interaction avec les protéines régulatrices de leur activité (Zhang et Casey, 1996). De plus, dans le cas de RhoB la nature de l'isoprène transféré semble moduler les fonctions de cette petite protéine G (Lebowitz *et al.*, 1997).

1.1.3.2 La protéolyse du tripeptide

Une activité endoprotéolytique spécifique aux peptides prénylés a été partiellement purifiée à partir de la fraction microsomiale du foie de boeuf (Chen *et al.*, 1996). Une même enzyme catalyse indifféremment la protéolyse des trois acides aminés C-terminaux de protéines farnésylés et géranylgéranylés. La protéolyse du substrat libère le tripeptide intact. L'enzyme est inactivée par le Zn^{2+} , par les agents modificateurs de groupements sulfhydryles, par le N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK) et les agents alkylants, ainsi que par des substrats aldéhydés, suggérant qu'il puisse s'agir d'une sérine ou d'une cystéine protéase (Rando, 1996).

1.1.3.3 La méthylation des cystéines isoprénylées

L'enzyme catalysant la méthylation des petites protéines G est une prénylcystéine méthyltransférase (PCMT). Le groupement méthyle provient de la S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet), un donneur universel pour toutes les réactions de méthylation. Le transfert du méthyle se traduit par la formation d'un lien ester sur le groupement α -carboxylique libre de la cystéine prénylée. Le gène codant pour la prénylcystéine méthyltransférase a été récemment cloné chez *Xenopus laevis* (Imai *et al.*, 1997). La protéine, détectée en immunobuvardage, a une taille apparente de 33 kDa et est ubiquitaire (Dai *et al.*, 1998). Au niveau subcellulaire, la méthyltransférase est immunodétectée

dans la fraction microsomiale (Dai *et al.*, 1998) tandis qu'une activité PCMT est également notée au niveau des membranes plasmiques (Li *et al.*, 1996; Boivin et Béliveau, 1995). La réaction de méthylation est réversible et une activité méthylestérasique a été observée dans les fractions soluble et membranaire du cerveau (Dunten *et al.*, 1995). Des trois modifications survenant lors de la maturation des petites protéines G, la méthylation est la seule qui soit réversible, ce qui lui confère un potentiel régulateur.

Le rôle de la méthylation demeure cependant nébuleux. L'ajout du méthyle a pour effet de masquer la charge négative C-terminale de la protéine G tout en augmentant légèrement son hydrophobicité. Bien que non requise pour la translocation des petites protéines G du cytosol vers les membranes (Kowluru *et al.*, 1996), cette modification demeure susceptible d'améliorer l'affinité de la protéine pour la membrane. La contribution de la méthylation à l'ancrage membranaire a été étudiée en présence de liposomes et de peptides prénylés. Il ressort de ces études que la méthylation augmente effectivement l'affinité des peptides pour les vésicules d'un facteur pouvant aller jusqu'à 150 (Ghomashchi *et al.*, 1995; Sylvius et L'Heureux, 1994). L'effet de la méthylation est plus important lorsque les peptides sont farnesylés plutôt que géranylgeranylés, ce qui s'explique par la plus grande hydrophobicité du groupement géranylgeranyle. Cet effet de la méthylation est toutefois maximal seulement lorsque les vésicules contiennent des lipides anioniques (Ghomashchi *et al.*, 1995). Ceci suggère que la méthylation puisse exercer une modulation fine de l'attachement membranaire des petites protéines G dans un contexte lipidique particulier, tel celui pouvant résulter de l'activation de la phospholipase D, qui a la propriété de libérer l'acide phosphatidique, un lipide anionique.

Par ailleurs, des études indiquent que la méthylation semble nécessaire à certaines interactions protéine-protéine. *Saccharomyces cerevisiae* nous fournit quelques indications en ce sens. Chez cette levure, le gène STE14 code pour une PCMT (Hrycyna *et al.*, 1991) dont un des substrats est le facteur d'accouplement α . Lorsque ce gène est muté négativement, la phéromone n'est plus exportée, ce qui suggère que la

méthylation du facteur α soit nécessaire à la liaison de la phéromone par son transporteur, STE6 (Sapperstein *et al.*, 1994). Chez les mammifères, l'équivalent à STE6 est la P-glycoprotéine (P-gp), une protéine bien connue pour sa participation au phénomène de résistance multiple aux médicaments anticancéreux observé chez les cellules tumorales. Cette protéine transporte *in vitro* des peptides farnésylés et méthylés dont la présence stimule son activité ATPasique et, comme pour STE6, la méthylation des peptides transportés est une condition essentielle à leur interaction avec le transporteur (Zhang *et al.*, 1994). Par extension, ces études suggèrent que la méthylation des petites protéines G puisse moduler leur interaction avec certaines de leurs protéines régulatrices.

La méthylation semble également affecter le taux de renouvellement des protéines modifiées. Ainsi la demi-vie de RhoA est significativement diminuée lorsque sa méthylation est bloquée en présence d'un inhibiteur (Backlund P.S. Jr., 1997). Divers mécanismes sont susceptibles d'expliquer cet effet. La méthylation pourrait diminuer la dégradation de RhoA en interférant directement avec l'activité de carboxypeptidases. D'autre part, la méthylation en modifiant l'affinité de cette protéine pour des partenaires membranaires ou autres pourrait la placer à l'abri de l'action de protéases. Finalement, l'absence de méthyle sur cette protéine pourrait agir comme un signal commandant sa destruction protéolytique. Quoiqu'il en soit, l'activité méthyltransférase est susceptible d'affecter certaines voies de signalisation cellulaire en modifiant la stabilité de protéines signalisatrices telles les petites protéines G de la famille Rho.

1.2 Les protéines régulatrices de l'activité Rho

Le modèle généralement admis veut que les protéines Rho oscillent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP (Article 1, fig. 3). Le passage de l'un à l'autre est favorisé par des facteurs d'échange des nucléotides (GEF). Certains de ces facteurs stimulent (GDS) l'échange du GDP pour le GTP, alors que d'autres l'inhibent (GDI). La désactivation de Rho est sous la responsabilité de protéines GAP qui catalysent l'hydrolyse du

GTP. Cette intervention est rendue nécessaire par le faible taux d'hydrolyse intrinsèque de ces petites protéines G. Ce modèle de régulation de type commutateur binaire apparaît toutefois simplificateur à la lumière de résultats récents dont nous discuterons plus loin.

1.2.1 Les protéines GDS

Les protéines GDS sont cytosoliques. Une activité GDS a bien été rapportée au niveau des membranes synaptiques du cerveau, cependant la protéine responsable de cette activité n'est pas encore bien caractérisée (Mutsada *et al.*, 1996). Les protéines GDS lient les petites protéines G avec, généralement, une plus grande affinité pour l'état nucléotide vide qu'elles stabilisent. Le ratio intracellulaire élevé de GTP/GDP favorise subséquemment le chargement en GTP sur la petite protéine G, ce qui a pour effet de l'activer.

1.2.1.1 Rôle du domaine DH

La catalyse de cette activité d'échange sur les protéines de la famille Rho est le fait d'un domaine particulier, d'environ 250 acides aminés. Il s'agit du domaine DH (pour Dbl homology domain), identifié à l'origine sur la protéine Dbl isolée d'une lignée lymphocytaire sur la base de ses propriétés transformantes (Eva et Aaronson, 1985). La reconnaissance de ce domaine a conduit à l'identification d'une vingtaine de rhoGDS potentielles, constituant la famille Dbl, dont dix ont également des propriétés oncogéniques (Tableau II). Bien que l'expression de l'activité rhoGDS exige un domaine DH, la présence du motif n'est cependant pas garante d'une activité d'échange nucléotidique *in vitro*. Ainsi Ras-GEF, une protéine à activité rasGDS reconnue, arbore un domaine DH apparemment inactif sur la famille Rho. Par ailleurs, bien que Ect2 puisse lier RhoA et Rac, cette GDS potentielle n'a encore démontré aucune activité d'échange (Miki *et al.*, 1993). Il est bien sûr possible que sa protéine Rho cible n'ait tout simplement pas été identifiée. D'autre part, ceci peut également suggérer que certaines conditions

TABLEAU II. Liaison, activité d'échange nucléotidique, et distribution des protéines à domaine DH

	RhoA	Cdc42	Rac	Expression tissulaire
Abr	E/L	E/L	E/L	te, es, th, mo, oeil, ce, co, po
Bcr	E	E	E	te, co, po, es, th, mo, oeil, ce
Dbl*	E/L	E/L	E/L	ce, su, te, ov
Dbs*	E	E	nd	ce, fo, th, ra, re, co, po, es, mo, ms
Ect2*	L	nd	L	re, fo, ra, te
FGD-1	nd	E/L	nd	ce, po, re, pl, fo
Kalirin	nd	nd	L	ce, ra, re
Lbc*	E/L	nd	nd	ms, co, po, le
Lfc*	E/L	nd	L	ce, th, ra, re, co, es, mo, ms, po
Lsc*	E/L	nd	nd	th, ra, re, co, es, mo, po, le
p190RhoGEF	E/L	nd	nd	ce, re, po, co
Net1*	E	nd	nd	co, ce, pl, po, fo, ms, re, pa
Ost*	E	E	L	co, re, fo, po, rét, ml, ce
rasGEF	nd	nd	nd	ce
Sos	nd	nd	E	te, ce, ra, th, fo, co, po, re, ms, in
Tiam-1	E	E	E	ce, te, ra, su, ut, th, gs, re
Tim*	nd	nd	nd	pl, re, po, fo, pa
Trio	E	nd	E	co, ce, ms, pa, pl, fo, re, po
Vav*	E?	E?	E	le, ra, po

Note: *oncogènes

Abréviations: E=activité d'échange nucléotidique reconnue; L=liaison; nd=activité non détectée; ce=cerveau; co=coeur; es=estomac; fo=foie; gs=glandes salivaires; in=intestin; le=leucocytes; ml=muscle lisse; mo=moëlle osseuse; ms=muscle squelettique; ov=ovaires; pa=pancréas; pl=placenta; po=poumon; ra=rate; re=rein; rét=rétine; su=surrénales; ut=utérus; te=testicules; th=thymus.

physiologiques d'activation ne soient pas toujours respectées dans les essais *in vitro*. À l'inverse, Ost montre une activité GDS envers RhoA et Cdc42 qu'elle ne lie pas de façon stable, alors qu'elle lie Rac (sous sa forme GTP) sans lui manifester d'activité GDS, suggérant qu'elle puisse lui servir d'effecteur (Horii *et al.*, 1994). Ces propriétés font de Ost un pivot potentiel de l'activation en cascade de certaines Rho. Dans les cas de FGD-1, Abr et Bcr (ces deux dernières possédant de surcroît un domaine rhoGAP actif), une activité d'échange a bien été observée en présence d'une portion réduite de ces protéines englobant le domaine DH, mais pas en présence de protéines entières (Chuang *et al.*, 1995). Ce fait suggère que l'activité GDS du domaine DH puisse dans certains cas être modulée par d'autres régions voisines.

1.2.1.2 Rôle du domaine PH

Au moins un domaine PH (plekstrin homology domain) est toujours retrouvé en tandem avec le domaine DH sur les protéines rhoGDS, ce qui laisse présager une action coordonnée. La réciproque n'est cependant pas toujours vraie, puisque des domaines PH existent sans domaine DH sur des protéines à vocation différente, telle la plekstrine. Chaque domaine PH englobe une centaine d'acides aminés de séquence hautement variable à l'exception d'un résidu tryptophane conservé au site de liaison. Malgré cette disparité de structure primaire, les domaines PH arborent une structure tridimensionnelle similaire. Chaque domaine PH forme un site compact doté d'une cavité peu profonde pouvant lier certains lipides. Cette cavité est bordée, en surface, d'une forte concentration de résidus basiques pouvant interagir avec d'autres résidus protéiques chargés. Les domaines PH sont reconnus en tant que médiateurs d'interactions protéine-protéine et protéine-lipide. Ce domaine permet de cibler la protéine porteuse vers la membrane cellulaire et possiblement de l'orienter dans une position favorisant les interactions avec le substrat, comme c'est le cas pour la protéine kinase du récepteur β -adrénergique (β -ARK) (Shaw, 1996). Par analogie, le domaine PH pourrait faciliter l'activité GDS des protéines de la famille Dbl en les recrutant à la membrane à proximité de leurs protéines Rho cibles. Par ailleurs, la proximité structurale des domaines PH et DH suggère que le

domaine PH puisse réguler l'activité du domaine DH par interaction moléculaire. Une telle interaction pourrait vraisemblablement inhiber l'activité GDS et cette inhibition pourrait être levée au besoin par la liaison de lipides par le domaine PH. À l'appui de cette hypothèse, l'activité d'échange nucléotidique de Vav est régulée par les produits de la PI3K (Han *et al.*, 1998).

1.2.1.3 Autres domaines

Outre les domaines DH et PH invariablement présents, la plupart des rhoGDS portent aussi d'autres motifs facultatifs (Tableau III). Ainsi BCR et ABR possèdent un domaine GAP inhibiteur de l'activité Cdc42 et Rac, suggérant la possibilité d'une régulation coordonnée de l'activité des différentes Rho (Chuang *et al.*, 1995). Similairement, RasGEF et Sos ont chacune un domaine rasGDS actif suggérant la possibilité d'une régulation coordonnée de l'activité de différentes familles de petites protéines G (Shou *et al.*, 1992; Bowtell *et al.*, 1992). De fait, une telle interaction impliquant les domaines rasGDS et DH de Sos vient d'être démontrée *in vitro* et *in vivo* chez les cellules COS où Sos démontre une activité GDS envers Rac en présence de Ras activée (Nimnual *et al.*, 1998). Tiam-1 contient deux domaines PEST reconnus pour conférer une instabilité accrue aux protéines porteuses (Habets *et al.*, 1994). Lbc possède un motif IQ pouvant lier la calmoduline (Toksoz et Williams, 1994). Kalirin, p190RhoGEF, Lsc/p115RhoGEF, Trio et Vav présentent chacune une séquence hautement chargée, structurée en hélice (coiled-coil), d'un type également retrouvé sur de nombreuses protéines du cytosquelette et réputé assurer certaines interactions protéine-protéine (Alam *et al.*, 1997; Gebbink *et al.*, 1997; Hart *et al.*, 1996; Debant *et al.*, 1996; Ye et Baltimore, 1994). Bcr et Trio ont un domaine sérine-thréonine kinase et Trio a de plus un domaine de type immunoglobuline (Maru et Witte, 1991; Debant *et al.*, 1996). FGD1, Lfc, p190RhoGEF et Vav arborent un domaine riche en résidus cystéine pouvant lier le diacylglycérol et d'autres lipides (Pasteris *et al.*, 1994; Whitehead *et al.*, 1995a; Gebbink *et al.*, 1997; Ye et Baltimore, 1994). FGD1 porte en supplément une séquence riche en résidus proline susceptible de lier les domaines SH3 (Src homology domain

TABLEAU III. Les motifs de liaison sur les protéines régulatrices de l'activité Rho

Motif	Description	Fonction
DH	~250 acides aminés (a.a.)	catalyse de l'échange des nucléotides sur Rho
PH	~100 a.a.; séquence variable; structure 3-D conservée	interactions protéine-lipide et protéine-protéine
GAP	~150 a.a.; séquence spécifique à chaque famille de petites protéines G	catalyse de l'activité GTPasique des petites protéines G
SH2	~100 a.a.	liaison aux sites phosphotyrosylés
SH3	~50 a.a.	liaison aux séquences riches en prolines
Prolines	11 a.a.; séquence de type XPXXPPPAXPX (A=aliphatique)	liaison aux domaines SH3
Cystéines	~50 a.a.; séquence de type H-X ₁₂ -C-X ₂ -C-X ₁₀₋₁₄ -C-X ₂ -C-X ₄ -H-X ₂ -C-X ₆₋₇ -C	fixation des esters de phorbol et du diacylglycérol; liaisons protéine-ADN et protéine-protéine
IQ	23-25 a.a.; séquence de type IQXXXRGXXXR	liaison de la calmoduline
Coiled-coil	domaine structuré de type hélice-boucle-hélice	

type 3) (Pasteris *et al.*, 1994). À l'inverse, Dbs et Vav ont des domaines SH3 pouvant lier les séquences riches en résidus proline (Whitehead *et al.*, 1995b; Ye et Baltimore, 1994). Vav a également un module SH2 (Src homology domain type 2), domaine reconnu pour lier les tyrosines phosphorylées (Ye et Baltimore, 1994). Plusieurs GDS montrent de plus des sites potentiels variés de phosphorylation. Cette présence simultanée de différents domaines catalytiques et/ou de liaison sur de nombreuses protéines de la famille Dbl suggère fortement qu'elles puissent agir comme régulateurs multifonctionnels.

1.2.1.4 Potentiel oncogénique des protéines GDS

Les protéines GDS participent au développement de certains cancers. Il a été montré que le gène codant pour BCR est sujet à des réarrangements croisés avec celui codant pour ABL, une tyrosine kinase. Les chimères p210BCR-ABL et p185BCR-ABL ainsi créées sont à l'origine de leucémies myélogéniques chroniques et de leucémies lymphoblastiques aiguës (Lugo *et al.*, 1990). De nombreux autres membres de la famille Dbl font preuve d'un potentiel oncogénique lorsque transfectés dans des cellules NIH 3T3, qui sont particulièrement sensibles à ce type de transformation. Les cellules ainsi transformées par Dbl (Eva et Aaronson, 1985), Dbs (Whitehead *et al.*, 1995b), Ect2 (Miki *et al.*, 1993), Lbc (Toksoz et Williams, 1994), Lfc (Whitehead *et al.*, 1995a), Lsc (Whitehead, *et al.*, 1996), Net1 (Chan *et al.*, 1996), Ost (Horii *et al.*, 1994), Tim (Chan *et al.*, 1994) et Vav (Katzav *et al.*, 1989) ont typiquement une croissance dont la dépendance à l'ancrage et au sérum est réduite. Les cellules transfectées forment des foyers denses même après confluence et favorisent la formation de tumeurs lorsque injectées chez les souris immunodéprimées. Le phénotype des cellules ainsi transformées correspond à celui observé en présence de formes intrinsèquement activées des protéines RhoA ou Rac, bien que le potentiel transformant de la famille Dbl soit beaucoup plus marqué que celui des Rho elles-mêmes (Khosravi-Far *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1996). Des mutants négatifs pour RhoA, Cdc42 ou Rac bloquent l'activité transformante des protéines de la famille Dbl, appuyant l'hypothèse voulant que ces rhoGDS soient à l'origine du potentiel

oncogénique des protéines Rho (Michiels *et al.*, 1995; Whitehead *et al.*, 1996).

1.2.2 Les protéines GAP

Les protéines GAP catalysent l'hydrolyse du GTP sur les protéines G, ce qui a pour effet de mettre un frein à la stimulation de ces dernières. C'est une activité essentiellement membranaire. Jusqu'à présent, une quinzaine de protéines rhoGAP ont été identifiées (Billuart *et al.*, 1998; Hilderbrand *et al.*, 1996; Homma et Emori, 1995; Jullien-Flores *et al.*, 1995; Lamarche et Hall, 1994; Reinhard *et al.*, 1995a; Saras *et al.*, 1997; Touré *et al.*, 1998; Tribioli *et al.*, 1996; Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997) et toutes partagent un domaine catalytique similaire d'environ 170 acides aminés. Leur spécificité varie, certaines ayant une activité GAP envers plusieurs membres de la famille Rho, alors que d'autres affichent une certaine sélectivité (Tableau IV). Ces protéines sont généralement de forte taille et, comme les GDS, possèdent plusieurs domaines à fonctions variées.

Notons au passage quelques traits particuliers suggérant la possibilité de fonctions additionnelles à la catalyse de l'activité GTPasique. Certaines activités GAP semblent coordonner les voies Rho et Ras. Ainsi, p190rhoGAP coprécipite avec p120rasGAP (Settleman *et al.*, 1992). L'interaction entre les deux GAP a lieu via les domaines SH2 de p120 et certains résidus phosphotyrosylés de p190. L'association des deux protéines induit un changement de conformation chez p120 ayant pour effet d'accroître l'accessibilité de son domaine SH3 (Hu et Settleman, 1997). Par ailleurs, RLIP présente également une certaine dualité fonctionnelle, cette rhoGAP servant aussi d'effecteur à Ral, une petite protéine G de la famille Ras (Jullien-Flores *et al.*, 1995). Une fonction effectrice pour certaines rhoGAP est suggérée par leur capacité à lier certains éléments régulateurs de l'organisation du cytosquelette. Ainsi, Graf est localisée aux plaques d'adhérence focale et lie FAK, une tyrosine kinase située sur la voie de signalisation des intégrines (Hildebrand *et al.*, 1996). Similairement Myr5, une myosine d'un type non conventionnel, à la capacité de lier l'actine offrant un

TABLEAU IV. Spécificité d'action et distribution tissulaire des protéines RhoGap

Nom	Spécificité	Distribution tissulaire
Abr	Cdc42, Rac	cerveau
Bcr	Cdc42> Rac	cerveau
Chimaerin	Cdc42, Rac	cerveau, testicules
Graf	Rho, Cdc42	ubiquitaire
MgcRacGap	Rac	testicules
Myr5	Rho> Cdc42, Rac	ubiquitaire
Oligophrenin	Rho> Cdc42> Rac	cerveau fétal
PARG-1	Rho>Cdc42, Rac	muscle, coeur, placenta, foie, pancréas
p50rhoGap	Cdc42> Rho, Rac	ubiquitaire
p85 (PI3K)	?	ubiquitaire
p115rhoGap	Rho?	cellules sanguines
p122rhoGap	Rho	nd
p190rhoGap	Rho> Cdc42, Rac	ubiquitaire
RaIBP1/RLIP76/Rip1	Cdc42> Rac	ubiquitaire
3-BP1	Rac, Cdc42> RhoG	rate, rein, poumon, cerveau, coeur

potentiel effecteur pour les Rho (Reinhard *et al.*, 1995). Enfin p122GAP lie la phospholipase C δ (PLC δ) et stimule son activité d'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) (Homma et Emori, 1995). Étant donné que de nombreuses protéines associées à la polymérisation de l'actine voient leur interaction à celle-ci modulée par la liaison de PIP2 (Stossel, 1993), cette GAP pourrait être un régulateur important de l'organisation du cytosquelette d'actine.

Ajoutons finalement que la structure cristalline de p50rhoGAP complexée à Cdc42 en présence de GMP-PNP (un analogue non-hydrolysable de GTP) montre la participation d'une région de la protéine reconnue pour son réarrangement structural suite à l'hydrolyse du GTP (Rittinger *et al.*, 1997). Ceci suggère que l'action GAP de p50rhoGAP ait pour conséquence de rompre son lien à la petite protéine G. RhoGAP semble donc être un partenaire éphémère de Rho.

1.2.3 Les protéines GDI

De façon un peu surprenante, compte tenu du grand nombre de GDS et de GAP spécifiques aux protéines Rho, seulement trois rhoGDI (GDP dissociation inhibitor) ont été identifiées jusqu'à présent. GDI (GDI-1, GDI α) fut d'abord purifiée, sur la base de son activité d'inhibition de l'échange nucléotidique, comme une protéine cytosolique ayant un poids moléculaire apparent d'environ 28 kDa (Fukumoto *et al.*, 1990; Leonard *et al.*, 1992), bien que le gène code pour une protéine de 23 kDa. L'expression de GDI est ubiquitaire et la protéine est réputée active sur tous les membres de la famille Rho. Puis, par hybridation différentielle, un gène homologue fut cloné et la protéine correspondante nommée D4/GDI (GDI-2, GDI β) (Lelias *et al.*, 1993; Scherle *et al.*, 1993). Cette dernière présente une forte homologie de séquence avec GDI (67%), est également cytosolique et est active sur les mêmes substrats *in vitro* avec cependant une affinité réduite. Son expression est restreinte au tissu hématopoïétique et semble régulée au cours de l'hématopoïèse (Lelias *et al.*, 1993). L'inactivation du gène codant pour D4/GDI dans les cellules souches embryonnaires (ES) exprimant GDI ne

provoque qu'une subtile diminution de leur capacité de production de l'ion superoxide, suggérant une certaine redondance fonctionnelle entre les deux protéines (Guillemot *et al.*, 1996). Le dernier membre reconnu de la famille, GDI γ (GDI-3), a été identifié à l'aide d'un système à double hybrides utilisant RhoB comme appât (Zalcman *et al.*, 1996) et par criblage de banques d'ADN en conditions permissives utilisant GDI et D4/GDI (Adra *et al.*, 1997). La protéine offre 50% d'homologie avec les deux autres rhoGDI et possède une séquence additionnelle de 21 acides aminés en N-terminal. Contrairement aux autres rhoGDI, GDI γ est membranaire et son activité est sélective à certaines Rho. Un premier groupe a rapporté une activité envers RhoB et RhoG (Zalcman *et al.*, 1996), alors qu'un second groupe a montré une activité réduite par rapport à GDI envers RhoA et Cdc42, mais non Rac *in vitro* (Adra *et al.*, 1997). La distribution tissulaire (cerveau, rein, testicules et pancréas) et subcellulaire de GDI γ est cependant en accord avec une activité dirigée vers RhoB et RhoG *in vivo* (Sasaki et Takai, 1998).

Les protéines GDI remplissent essentiellement trois fonctions. 1) Comme leur nom l'indique, elles inhibent l'échange des nucléotides sur les petites protéines G Rho avec lesquelles elles sont complexées. 2) Elles ont le potentiel de contrecarrer la liaison des GAP aux protéines Rho, ce qui maintient les petites protéines G activées. 3) Elles contrôlent la localisation intracellulaire des Rho en les extrayant de la membrane, en les maintenant sous forme de complexe cytosolique inactif et en les réacheminant à la membrane lors d'une stimulation. Toutes ces fonctions requièrent cependant que la petite protéine G soit isoprénylée (Nomanbhoy et Cerione, 1996).

On comprend mieux le fonctionnement de GDI depuis que sa structure a récemment été déterminée par cristallographie aux rayons X et spectroscopie de résonance magnétique (RMN) (Keep *et al.*, 1997; Gosser *et al.*, 1997). La protéine comporte deux domaines distincts aux fonctions complémentaires. Les 60 premiers résidus en N-terminal forment une région hautement flexible et peu structurée en solution, alors que la portion restante a une structure organisée et présente un motif s'apparentant à celui des immunoglobulines. La portion C-terminale (résidus 60-204) est suffisante et

nécessaire à la liaison de Rho (Gosser *et al.*, 1997). On y retrouve une poche hydrophobe où vient s'enfouir la queue isoprène de la petite protéine G. Cependant, la portion N-terminale (comprenant les acides aminés 26-42) est requise de concert avec la portion C-terminale pour les activités d'inhibition de l'échange nucléotidique et d'extraction des Rho des membranes (Keep *et al.*, 1997; Gosser *et al.*, 1997). La délétion des 25 premiers résidus en N-terminal ou des 4 derniers acides aminés en C-terminal est sans effet sur les fonctions de GDI, mais la délétion des 8 acides aminés C-terminaux les suppriment (Platko *et al.*, 1995). Ces données sont compatibles avec un modèle où la portion C-terminale de GDI, suivant sa liaison aux Rho, oriente la portion N-terminale vers la petite protéine G pour recouvrir le site de liaison du nucléotide permettant ainsi l'extraction de Rho et l'inhibition de l'activité d'échange.

La flexibilité de la portion N-terminale suggère qu'elle puisse être particulièrement sensible à l'action de protéases. Les premières indications à cet effet découlent de l'observation de la copurification de formes tronquées de D4/GDI avec une activité ICE ("Interleukin-1 β Converting Enzyme") chez les cellules THP-1 (une lignée monocytaire) (Na *et al.*, 1996). ICE est une protéase appartenant à la famille des caspases ("cysteine aspartate protease") dont l'activation participe à l'apoptose cellulaire (Nicholson et Thornberry, 1997). Ces protéases reconnaissent diverses séquences de 4 ou 5 acides aminés se terminant invariablement par une aspartate dont elles rompent le lien peptidique du coté C-terminal. Un examen attentif de la séquence de D4/GDI a révélé deux sites potentiels de clivage par les caspases. Un clivage aux sites caspases DELD¹⁹/S et LLGD⁵⁵/G sur D4/GDI est compatible avec la longueur des fragments observés (environ 23 et 17 kDa) lors de la copurification.

Ces observations ont incité les chercheurs à tenter de démontrer que D4/GDI est bel et bien un substrat de caspases au cours de l'apoptose. Expérimentalement, l'apoptose peut être induite chez les cellules Jurkat (une lignée lymphocytaire), par simple incubation en présence d'anticorps anti-Fas. Dans ces conditions, D4/GDI est clivée en un fragment de 23 kDa avec une cinétique qui parallèle celle de l'apoptose (Na *et al.*, 1996). L'apoptose et le

clivage de D4/GDI sont tous deux inhibés en présence de Ac-YVAD-cmk, un peptide inhibiteur de ICE, démontrant qu'une activité caspase est requise *in vivo* dans les deux cas. Le clivage de D4/GDI par une activité caspase de type CPP32 a par la suite été confirmé *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes (Na *et al.*, 1996). Le site de coupure a été déterminé comme étant DELD¹⁹/S par séquençage du fragment généré *in vitro* et par inhibition de la protéolyse en présence d'un mutant D¹⁹N.

Un fragment de 17 kDa est également généré *in vitro*, par clivage de D4/GDI au site LLGD⁵⁵/G par la caspase recombinante ICE (Danley *et al.*, 1996). L'inhibiteur Ac-YVAD-CHO empêche la formation du fragment de 17 kDa dans ces conditions, confirmant une activité caspase potentielle à ce site. Cette forme tronquée de D4/GDI ne peut accomplir ses fonctions habituelles d'inhibition de l'échange nucléotidique et de l'activité GAP sur les Rho. *In vivo*, un fragment similaire est produit chez les monocytes et les neutrophiles humains, en conditions pro-inflammatoires reconnues pour promouvoir l'activation de caspases. Dans ces conditions cependant, Ac-YVAD-CHO s'est avéré incapable de protéger D4/GDI de la protéolyse au site D⁵⁵, suggérant que ICE lui-même ne soit pas responsable de ce clivage, *in vivo*.

Les motifs DELD¹⁹/S et LLGD⁵⁵/G ne sont pas conservés sur les protéines GDI et GDI γ suggérant que la protéolyse par l'action des caspases est l'apanage de D4/GDI. Dans la même foulée, l'intégrité de GDI est préservée lors de la stimulation pro-apoptotique des cellules Jurkat et n'est pas non plus affectée par ICE *in vitro* (Na *et al.*, 1996; Danley *et al.*, 1996). La région charnière entre la portion N-terminale flexible et celle C-terminale structurée de GDI n'en demeure pas moins sensible à la protéolyse, puisque la protéine est clivée *in vitro* par la trypsine en position G⁵⁴/R⁵⁵ (Keep *et al.*, 1997). La perte de la portion flexible mène inéluctablement rhoGDI à l'inactivation, suggérant que la protéolyse des différentes rhoGDI soit un des moyens utilisés par la cellule pour réguler l'activité des Rho.

D'autres types de modifications post-traductionnelles sont également susceptibles d'affecter les fonctions des protéines rhoGDI. Une étude montre

que la phosphorylation de GDI observée *in vivo* chez les neutrophiles stimulés à l'aide d'anaphylatoxines et *in vitro* sur des protéines partiellement purifiées stabilise la formation des complexes GDI/RhoA suivie en électrophorèse bi-dimensionnelle (Bourmeyster et Vignais, 1996). Une autre étude rapporte que la stimulation de lymphocytes à l'aide des esters de phorbol provoque une phosphorylation de D4/GDI sur un résidu thréonine (Scherle *et al.*, 1993). Toutefois, la phosphorylation de D4/GDI ne module pas son affinité pour les protéines Rho (Gorvel *et al.*, 1998). La phosphorylation de D4/GDI pourrait cependant réguler sa fonction de chaperon, en modifiant l'affinité des complexes Rho/D4/GDI pour les membranes.

La fonction navette de rhoGDI semble affectée également par l'état de phosphorylation des protéines Rho. La phosphorylation de RhoA sur la sérine en position 188 par la protéine kinase A active son extraction de la membrane de cellules NK ("natural killer") par la protéine GDI (Lang *et al.*, 1996). Chez les cellules HEK ("human embryonic kidney") la stimulation des récepteurs muscariniques induit la translocation d'un pool cytosolique de RhoA vers les membranes (Keller *et al.*, 1997). Cette relocalisation est cependant inhibée en présence de tyrphostin et de génistéine, suggérant la participation d'une voie tyrosine kinase lors de l'activation des Rho.

Par ailleurs, une étude suggère que les interactions entre GDI et Rho soient modulables par l'état de méthylation de Rho. La liaison *in vitro* de RhoA et de Rac avec GST-GDI couplé à des billes de glutathion agarose est en effet légèrement plus forte lorsque les petites protéines G ne sont pas méthylées (Hancock et Hall, 1993). Déméthylation et phosphorylation de la protéine G ont en commun d'introduire une charge négative pouvant déstabiliser les interactions entre le domaine polybasique C-terminal des Rho et la membrane cellulaire. De plus, l'énergie de liaison de GDI pour Rho étant similaire à l'énergie de partition membrane/eau de peptides géranylgéranylés (Sylvius et L'Heureux, 1994), une modification de charge si légère soit-elle risque fort de modifier la délicate balance thermodynamique régissant la partition des Rho.

1.3 Les effecteurs des protéines Rho

Les premières tentatives de caractérisation des voies effectrices des protéines Rho ont fait appel à des inhibiteurs spécifiques ou encore à des protéines Rho activées ou inactivées de manière constitutive. Malgré leurs limites, ces techniques ont tout de même mis en évidence la mobilisation de protéines tyrosine kinases (Ridley et Hall, 1994; Nobes *et al.*, 1995), de lipides kinases telles la PI 3-kinase (Kumagai *et al.*, 1993) et la PI 5-kinase (Chong *et al.*, 1994) et de la phospholipase D (Malcolm *et al.*, 1994), en aval de ces petites protéines G. Au cours des trois dernières années, des efforts considérables ont été mis à l'identification d'effecteurs directement liés par les protéines Rho activées (Tableau V). On y est parvenu par le biais de techniques variées telles: "l'overlay", la chromatographie d'affinité, le criblage de banques d'expression et le système à double hybrides.

1.3.1 Les effecteurs à domaine CRIB

La sérine/thréonine kinase PAK, une cible de Cdc42 et Rac, fut l'une des premières à être identifiées par interaction directe (Manser *et al.*, 1994). PAK est homologue au produit du gène STE20, une kinase immédiatement en amont de la cascade MAP kinase chez la levure (Martin *et al.*, 1995). Par analogie, PAK pourrait donc participer à l'activation de voies similaires chez les eucaryotes. De fait, PAK semble initier certaines cascades de kinases menant à l'activation des facteurs de transcription p38 et c-Jun (Frost *et al.*, 1996). On sait de plus que PAK interagit avec la phospholipase C γ (PLC γ) *in vitro* (Bagrodia *et al.*, 1995a) et Nck *in vivo* (Bokoch *et al.*, 1996a). La PLC γ est activée par les facteurs de croissance et Nck est une protéine servant d'adaptateur qui est recrutée vers certains récepteurs à activité tyrosine kinase suivant leur stimulation par ces mêmes facteurs de croissance. Ces résultats désignent PAK comme un médiateur clé des effets des protéines Rho sur la croissance cellulaire.

TABLEAU V. Spécificité des effecteurs de la famille Rho

	RhoA	Cdc42	Rac	Commentaire/fonction
CIP4	-	+	-	Polymérisation de l'actine
IQGAP 1,2	-	+	+	Polymérisation de l'actine
Kinectine	+	+	+	Récepteur de la kinésine
MEKK1	-	+	+	Activation de JNK
MBS	+	-	-	Contraction et motilité
Ost	-	-	+	Cascade d'activation Rho?
p67phox	-	-	+	Élément de NADPH oxydase
p140mDia	+	-	-	Polymérisation de l'actine
POR-1	-	-	+	Formation de lamellipodes
PI3K (p85)	-	+	+	Activité stimulée
PIP5K	+	-	+	Activité kinase copurifiée
PLD	+	+	+	Activité stimulée
POSH	-	-	+	Apoptose
pp70S6K	-	+	+	Activité stimulée
Tubuline	-	-	+	Élément du cytosquelette
Domaine CRIB				
ACK 1,2	-	+	-	Tyrosine kinases
MEKK4	-	+	+	Activation de JNK
MLK 1,2,3	-	+	+	Activation de JNK et p38
MSE55	-	+	+	Fonction inconnue
PAK	-	+	+	Activation de JNK et p38
WASP	-	+	+	Polymérisation de l'actine
Domaine REM1				
PKN	+	-	-	Assemblage neurofilaments
PRK2	+	-	+	Activation du SRF
Rhophilin	+	-	-	Fonction inconnue
Rhotekin	+	-	-	Fonction inconnue
Domaine REM2				
Citron	+	-	+?	Cytokinèse
ROK/p160Rock	+	-	+?	Contraction et motilité

Abbreviations: ACK= "activated Cdc42-associated kinase; CIP= "Cdc42 interacting protein"; CRIB= "Cdc42/Rac interacting binding"; IQGAP= GAP contenant des motifs Ile-Gln; mDia= "mammalian homolog of diaphanous"; MLK= "mixed-lineage kinase"; MSE55= "marrow stromal/endothelial cell protein" (55kDa); MBS= myosine-binding subunit; PLD= phospholipase D; POSH= "plenty of SH3"; POR-1= "partner of Rho"; REM= "Rho effector motif".

La caractérisation du motif (CRIB) de liaison à Cdc42 et Rac chez PAK a permis la reconnaissance de nombreux autres effecteurs potentiels possédant une séquence comparable (Burbelo *et al.*, 1995). Une interaction directe avec ces petites protéines G a été montrée pour certains d'entre eux. C'est le cas pour ACK, une tyrosine kinase phosphorylée en réponse à l'EGF et au choc osmotique (Manser *et al.*, 1993; Satoh *et al.*, 1996), pour MLK1, 2 et 3, un groupe de tyrosine kinases appartenant à la famille des MAPK dont la surexpression active la voie menant à la phosphorylation de c-Jun et p38 (Burbelo *et al.*, 1995; Teramoto *et al.*, 1996), pour MEKK4, une sérine/thréonine kinase également membre de la famille des MAPK (Franger *et al.*, 1997), pour MSE55, le produit d'un ADN non caractérisé (Burbelo *et al.*, 1995), et pour WASP, une sérine/thréonine kinase dont la défecion est en cause dans le syndrome de Wiskott-Aldrich (Aspenström *et al.*, 1996). De manière générale, il semble que les effecteurs à motif CRIB soient surtout utilisés pour relayer les signaux émanants de Cdc42/Rac vers le noyau cellulaire, à l'exception de WASP, reconnu pour affecter l'organisation du cytosquelette d'actine.

1.3.2 Les effecteurs à domaine REM1

Un domaine d'interaction spécifique à RhoA et dénommé REM1 est présent sur la région N-terminale de quelques effecteurs dont PKN (Watanabe *et al.*, 1996), PRK2 (Quilliam *et al.*, 1996), Rhophilin (Watanabe *et al.*, 1996) et Rhotekin (Reid *et al.*, 1996). Mis à part le motif REM1, Rhophilin et Rotekin n'ont pas de domaine particulier pouvant nous renseigner sur leur fonction. PKN est une sérine-thréonine kinase dont le domaine catalytique présente une forte homologie avec celui de la protéine kinase C. Suivant sa

liaison à RhoA-GTP, PKN lie et phosphoryle l' α -actinine en présence de phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) (Mukai *et al.*, 1997), de même que les têtes de neurofilaments (Mukai *et al.*, 1996) *in vitro*. Ces résultats suggèrent que PKN puisse être un des médiateurs de l'action de RhoA sur le cytosquelette.

Pour sa part, PRK2 est fortement apparentée à PKN au niveau de sa composition en acides aminés. C'est aussi une sérine-thréonine kinase dont l'activité est stimulée par la liaison aux petites protéines G. Cependant, son interaction avec RhoA est indépendante de l'état nucléotidique de cette dernière et de plus, contrairement aux autres effecteurs à domaine REM1, elle lie également la forme GTP de Rac (Vincent et Settleman, 1997). Toutefois, PRK2 ne lie pas RhoA et Rac simultanément, suggérant que la réponse activée dans chaque cas diffère. Il est donc possible que RhoA et Rac recrutent PRK2 à des localisations différentes, vers des substrats différents. En plus d'être un effecteur de RhoA et Rac, PRK2 interagit de manière spécifique avec la protéine Nck, via un domaine proline *in vitro* (Quilliam *et al.*, 1996). L'activité kinase de PRK2 est inhibée par sa liaison à Nck, suggérant la possibilité d'une modulation négative de l'activité Rho par les voies des récepteurs à activité tyrosine kinase.

1.3.3 Les effecteurs à domaine REM2

Un second domaine d'interaction préférentielle avec Rho, nommé REM2 (Fujisawa *et al.*, 1996), réunit les effecteurs Citron (Madaule *et al.*, 1995) de même que p160Rock (Ishizaki *et al.*, 1996) et son isoforme ROK α également nommé Rho kinase ou ROCKII (Leung *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 1996; Nakagawa *et al.*, 1996). Citron est sujet à deux épissages alternatifs. L'une des formes retient un domaine d'activité sérine/thréonine kinase apparenté à celui également présent chez ROK. Chez les cellules HeLa, Citron est mobilisé au sillon d'étranglement lors de la cytokinèse où il participe à la contraction de l'anneau (Madaule *et al.*, 1998). ROK est une sérine/thréonine kinase qui, suite à l'activation de RhoA, est recrutée à la membrane où elle phosphoryle une sous-unité de la myosine phosphatase

(MBS) de même que la chaîne légère des myosines (Kimura *et al.*, 1996; Amano *et al.*, 1996).

1.3.4 Les effecteurs orphelins

Sont regroupés sous ce vocable les effecteurs dont le domaine d'interaction à Rho est dépourvu d'homologie avec celui des autres effecteurs. Dans cette catégorie, on retrouve CIP4, IQGAP1 et 2, Kinectine, MEKK1, MBS, Ost, p67phox, p140mDia, POR-1, PI3K, PIP5K, PLD, POSH, S6Kinase et Tubuline. Plusieurs de ces effecteurs sont de toute évidence reliés à l'organisation de la morphologie cellulaire ou à des fonctions mobilisant le cytosquelette. CIP4 présente une homologie de séquence avec la famille ezrin/radixin/moesin (ERM) (Aspenström, 1997) dont les membres servent de protéines d'ancrage de l'actine à la membrane plasmique. CIP4 possède également des domaines d'homologie avec les tyrosine kinases oncogènes de la famille Fes/Fps et sa surexpression chez les fibroblastes provoque la dissolution des fibres de stress (Aspenström, 1997) suggérant son implication dans le remodelage du cytosquelette d'actine en réponse à certaines stimulations.

La tubuline est une protéine du cytosquelette dont la polymérisation est responsable de la formation de microtubules le long desquels circulent les cargos vésiculaires. Rac1-GTP interagit directement avec la tubuline sans toutefois affecter sa capacité de polymérisation (Best *et al.*, 1996). Le rôle effecteur de cette protéine n'est donc pas clairement établi. Il est possible que la tubuline soit simplement mobilisée comme support pour l'acheminement d'autres protéines interagissant avec Rac. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les protéines Rho lient la kinectine, une protéine d'ancrage vésiculaire de la kinésine qui, elle-même, est une ATPase participant au transport de vésicules le long des microtubules (Hotta *et al.*, 1996). L'interaction des Rho avec la kinectine est compatible avec leur participation au transport vésiculaire lors de l'exocytose, tel que rapporté chez les cellules PC12 (Komuro *et al.*, 1996).

MBS est cette sous-unité de la myosine phosphatase phosphorylée par ROK, un autre effecteur dont il a été question un peu plus haut. L'interaction de RhoA-GTP avec MBS permet son recrutement à proximité de ROK. L'effecteur p140mDia est une protéine ubiquitaire qui lie la profiline de façon constitutive et RhoA sous sa forme GTP *in vitro* (Watanabe *et al.*, 1997). L'un des rôles de la profiline est de favoriser la polymérisation de l'actine en stimulant son activité d'échange ADP/ATP. p140mDia, profiline et RhoA colocalisent aux sites de formation de replis sur la membrane et la surexpression de p140mDia induit la polymérisation de l'actine. Ces faits suggèrent un modèle où la mobilisation de p140mDia par RhoA-GTP favorise la polymérisation de l'actine au site d'activation en augmentant la concentration locale de profiline. POR-1 est un effecteur de Rac-GTP dont on sait encore peu de choses (Van Aelst *et al.*, 1996). Cependant, une version tronquée de la protéine inhibe la formation de replis membranaires, suggérant que POR-1 puisse être un médiateur des effets de Rac sur le cytosquelette d'actine. IQGAP interagit avec Cdc42 et Rac, préférentiellement sous leur forme GTP (McCallum *et al.*, 1996). Chez la levure, les protéines IQGAP participent à la cytokinèse (Machesky, 1998). Une telle fonction chez les mammifères n'a pas encore été démontrée. Cet effecteur lie directement l'actine dont il favorise la polymérisation *in vitro* (Bashour *et al.*, 1997). *In vivo*, IQGAP est présent aux zones de contact intercellulaire. On le retrouve également au niveau des replis cellulaires, des lamellipodes et des filopodes, qui sont des structures contrôlées par Rac et Cdc42. IQGAP lie aussi la calmoduline en absence de Ca^{2+} , via un domaine IQ, et cette liaison inhibe la polymérisation de l'actine. Ces résultats suggèrent que IQGAP est un médiateur important des effets de Cdc42 et de Rac sur le cytosquelette et que son activité est modulée négativement par la calmoduline et positivement par le calcium.

D'autres effecteurs de Rho régissent le métabolisme cellulaire des lipides. Ainsi, l'immobilisation de RhoA sur support retient l'activité de la phosphatidylinositol 4-phosphate-5 kinase (PIP-5K) et ce, indépendamment de l'état nucléotidique (Ren *et al.*, 1996). Cependant, la kinase n'est stimulée que par la forme GTP de RhoA (Chong *et al.*, 1994). De façon similaire, Rac

interagit également avec cette kinase *in vitro* et *in vivo* (Tolias *et al.*, 1995). L'un des produits de l'activation de PIP-5K est le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) et ce lipide influence directement plusieurs des protéines associées à la polymérisation de l'actine (Stossel, 1993). Il en découle que le contrôle du niveau de PIP2 par Rho module très certainement l'état d'organisation du cytosquelette.

L'immobilisation de Rac et Cdc42 sur support retient également l'activité de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) de manière GTP-dépendante, suggérant une interaction de ces protéines Rho avec la kinase (Tolias *et al.*, 1995). Cette kinase est composée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa et d'une sous-unité catalytique de 100 kDa. p85 possède dans sa structure un domaine GAP interagissant avec Cdc42, bien qu'aucune activité GAP n'ait encore été démontrée (Zheng *et al.*, 1994). Une interaction directe a été rapportée entre Rac et p85 (Bokoch *et al.*, 1996b), de même qu'entre Ras et p100 (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994). L'activité de la kinase n'est que modestement influencée par sa liaison à Rac, suggérant que son rôle principal soit de recruter PI3K à certains sites particuliers (Bokoch *et al.*, 1996b). Le scénario inverse est aussi plausible et PI3K pourrait recruter Rac-GTP. A l'appui de cette dernière hypothèse, lors de l'induction de replis membranaires suite à une stimulation des fibroblastes par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), l'activation de Rac est consécutive à l'activation de PI3K par Ras. (Hawkins *et al.*, 1995; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996).

La phospholipase D (PLD) est également un effecteur potentiel des protéines Rho puisque son activité est stimulée par la forme GTP de RhoA, Cdc42 et Rac *in vitro* (Hammond *et al.*, 1997). Cependant, aucune interaction directe entre la PLD et ces Rho n'a encore été démontrée. En fait, le stimulateur le plus puissant de la PLD est plutôt le facteur d'ADP-ribosylation (ARF) qui est une autre petite protéine G (Frohman et Morris, 1996). Les protéines ARF et Rho agissent en synergie lors de l'activation la PLD, suggérant une modalité d'action différente. Certaines données permettent de croire que l'action de Rho sur la PLD est indirecte, probablement assurée par

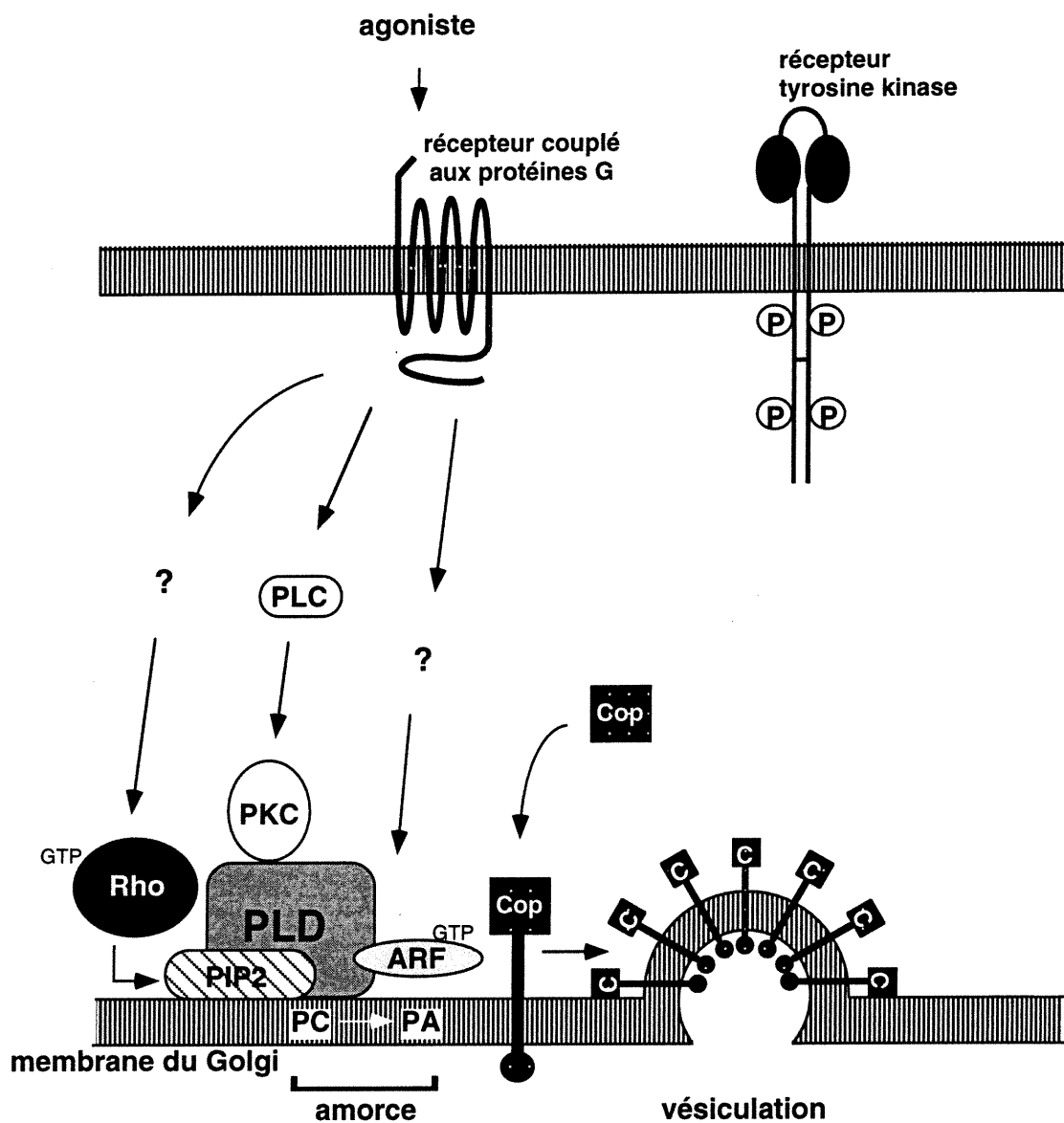


FIGURE 3. Vésiculation des membranes golgiennes.

D'après Frohman et Morris (1996)

Légende: ARF= facteur d'ADP ribosylation; Cop/C= cotomères; PA= acide phosphatidique; PC= phosphatidylcholine; PIP2= phosphatidylinositol biphosphate; PKC= protéine kinase C; PLD= phospholipase D

la production de phospholipides. L'activité de la PLD nécessite en effet la présence de PIP2 (Liscovistch *et al.*, 1994), dont la production par PIP-5K est au moins partiellement contrôlée par Rho (Chong *et al.*, 1994). L'activation de la PLD par l'action coordonnée de Rho et Arf permet le recrutement des coatomères à l'origine de la vésiculation des membranes golgiennes (Fig. 3).

p67phox, une des composantes de la NADPH oxydase, est aussi un effecteur de Rho. La NADPH oxydase est le système à l'origine de la bouffée oxydative créée par le transfert d'électrons de la NADPH oxydase vers l'oxygène O₂ générant l'ion superoxyde O₂⁻. L'activation de la NADPH oxydase assure la destruction des bactéries phagocytées par les leucocytes. Le complexe de la NADPH oxydase est formé au total de quatre protéines: le cytochrome *b*, les oxydases p47phox et p67phox, de même que Rac2. La forme GTP de Rac2 interagit avec p67phox et possiblement aussi avec le cytochrome *b* (Bokoch, 1995). Le système a pu être entièrement reconstitué, ce qui prouve que ces quatre protéines sont nécessaires et suffisantes pour en assurer l'activation *in vitro*. Dans ce système, Rac2, p47phox et p67phox sont simultanément recrutées du cytosol vers la membrane, où Rac est activée (Fig. 4). La translocation de Rac peut être bloquée par certains inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase tel la génistéine, sans toutefois nuire à celle de p47phox et p67phox, suggérant que Rac2 ne régule pas l'assemblage de la NADPH oxydase (Bokoch, 1995). Il est probable cependant, que l'état nucléotidique de Rac2 détermine la capacité du système à assurer le transfert des électrons, puisque la formation d'oxydant est bloquée par l'ajout de rhoGDI, alors qu'elle est stimulée en présence d'une rhoGDS (Mizuno *et al.*, 1992).

pp70S6K est un autre effecteur de Rho. Cette kinase phosphoryle une des sous-unités ribosomiales en réponse aux agents stimulateurs de la synthèse protéique tels l'insuline et les facteurs de croissance comme le PDGF. pp70S6K est importante pour la progression normale du cycle cellulaire au moment du passage de la phase G1 vers S. L'activité kinase de pp70S6K est stimulée *in vivo*, en présence de mutants activés de Cdc42 et Rac (Chou et Blenis, 1996). De plus les formes GTP de Cdc42 et Rac lient

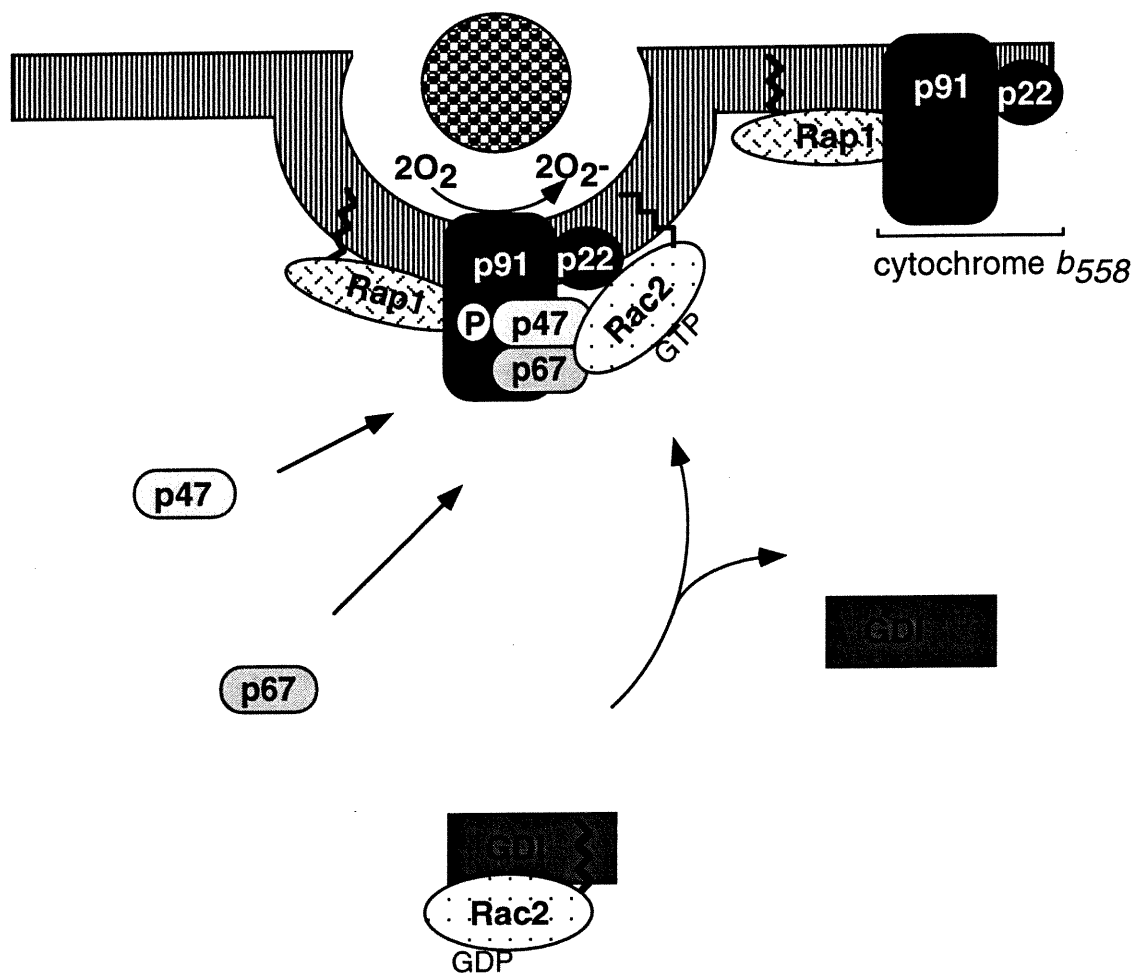


FIGURE 4. Formation du complexe de la NADPH oxydase durant la phagocytose.

D'après Bokoch (1995)

directement la forme non phosphorylée de pp70^{S6K} *in vivo* et *in vitro*. Cependant, l'interaction de la kinase avec Cdc42 ou Rac *in vitro* n'est pas suffisante pour assurer son activation, suggérant la participation d'une kinase reconnaissant le complexe. La PI-3K et/ou la phospholipase C γ (PLC γ) agissent en amont mais ne phosphorylent pas directement pp70^{S6K}. La protéine kinase B (PKB) qui est régulée par PI3K (Franke *et al.*, 1995) serait une bonne candidate pour cette fonction. L'association de Cdc42 et Rac à pp70^{S6K} suggère que la famille Rho participe à la régulation du cycle cellulaire.

Le tout dernier effecteur, identifié à l'aide d'un système à double hybrides utilisant RacGTP comme appât, est une protéine ubiquitaire baptisée POSH en référence à la présence de quatre domaines SH3 (Tapon *et al.*, 1998). Son expression ectopique chez les cellules COS-1 active la cascade kinase menant à la phosphorylation de JNK, tandis que la microinjection de POSH chez les fibroblastes stimule la translocation du facteur de transcription NF- κ B vers le noyau cellulaire (Tapon *et al.*, 1998). Ces fonctions sont abrogées en présence d'un mutant Rac dont l'interaction avec POSH est spécifiquement rompue. POSH est donc un médiateur des effets de Rac sur la transcription cellulaire. De plus, la surexpression de POSH est un puissant inducteur d'apoptose, suggérant que cette protéine soit un facteur important dans la balance des signaux régissant la survie cellulaire.

Jusqu'à tout récemment, l'identification d'effecteurs a reposé principalement sur leur capacité à interagir avec la forme GTP des petites protéines G ciblées. Le dogme veut en effet que les petites protéines G, y compris celles de la famille Rho, fonctionnent selon un mode binaire, l'état GDP étant inactif et l'état GTP actif. Compte tenu de résultats récents, ce modèle est cependant de moins en moins satisfaisant. Par exemple, chez la drosophile, l'expression neuronale de mutants dominants inactifs et actifs de Rac engendre un même phénotype où la croissance de l'axone est bloquée (Luo *et al.*, 1994). Ceci suggère qu'un cycle rapide entre les formes GDP et GTP de Rac soit essentiel à la réorganisation du cytosquelette au cours de la croissance axonale. De plus, comme on l'a vu plus haut, certains effecteurs

sont indifférents à l'état nucléotidique de la petite protéine G. Ceci a été démontré pour p140mDia, PIP5-K, IQGAP et MEKK4. Il est intéressant de noter qu'au moins trois de ces protéines sont reconnues pour participer à l'organisation du cytosquelette d'actine. Une explication plausible serait que, dans le contexte de l'organisation du cytosquelette, la forme GTP des petites protéines G favorise la polymérisation de l'actine et la forme GDP sa dépolymérisation. À l'appui de cette hypothèse, une étude récente montre que la petite protéine G Bud1 chez la levure possède deux états actifs (Park *et al.*, 1997). Sous sa forme GTP, Bud1 interagit préférentiellement avec Cdc24, alors que sous sa forme GDP elle s'associe plutôt à Bem1. Cdc24 est une rhoGDS permettant l'activation de Cdc42 et Bem1 est une petite protéine G apparentée à Ras et participant à la réorganisation du cytosquelette. Le cycle GDP-GTP chez Bud1 permet la croissance par bourgeonnement au cours de la phase végétative chez la levure. Si l'existence de deux formes actives de petites protéines G se vérifiait chez les mammifères, il en découlerait que de nombreux effecteurs liés à la forme GDP des protéines Rho sont encore à découvrir puisque la plupart des techniques d'identification ont jusqu'à présent utilisé la forme GTP comme appât.

1.4 Fonctions cellulaires des protéines Rho

1.4.1 Transmission des signaux

La cellule est constamment sollicitée par différents facteurs tels les hormones, les neurotransmetteurs, les chémoattractants, les facteurs de croissance et les cytokines qui l'informent sur l'état de son environnement. Les signaux ainsi transmis sont décodés par la cellule et acheminés le long des voies de signalisation intracellulaire afin d'assurer une réponse appropriée. Au moins deux de ces voies mobilisent les protéines Rho: celle des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques et celle des récepteurs à activité tyrosine kinase.

1.4.1.1 Signalisation en amont

1.4.1.1.1 Voie des protéines G hétérotrimériques

L'acide lysophosphatidique (LPA), la thrombine, l'endothéline, la bombésine et l'angiotensine sont des stimuli mitogéniques reconnus pour activer des voies de signalisation passant par les protéines Rho, via des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (Narumiya, 1996). Celles-ci sont des protéines membranaires liant le GTP, de poids moléculaire plus élevé que celui des petites protéines G et constituées de trois sous-unités nommées : α , β et γ . Suivant leur activation par un ligand, les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques catalysent l'échange du GDP pour le GTP sur ces dernières. L'activation de la sous-unité α par le GTP provoque la dissociation du complexe $\alpha\beta\gamma$. Les intermédiaires entre protéines G hétérotrimériques et monomériques sont encore mal définis mais on sait cependant, que les dimères $\beta\gamma$ transmettent certains signaux provenant de récepteurs muscariniques vers c-Jun, via Rac et Ras (Coso *et al.*, 1996) (Fig. 5).

Ceci n'est pas sans rappeler ce qui se passe chez la levure, en réponse au facteur d'accouplement α . Dans ce système, un facteur d'échange (GDS) pour Cdc42 est recruté à la membrane par $\beta\gamma$ via son domaine plekstrine (PH), favorisant ainsi l'activation de la petite protéine G (Zhao *et al.*, 1995). Un mécanisme analogue est possible chez les mammifères, puisque toutes les protéines GDS de Rho possèdent un domaine PH. Une interaction a d'ailleurs été rapportée *in vitro* entre les protéines de fusion RhoA/Rac et une préparation purifiée de la sous-unité $\beta\gamma$, suggérant que l'activation de ces petites protéines G puisse se faire par leur recrutement direct à la membrane (Harhammer *et al.*, 1996).

D'autre part, la sous-unité $G\alpha_{13}$ des protéines G hétérotrimériques et Lsc/p115GEF coimmunoprécipitent dans les lysats de fibroblastes, en présence d'ions AlF_4^- activateurs des protéines G hétérotrimériques (Hart *et al.*, 1998). La liaison entre les deux protéines stimule l'activité d'échange de Lsc/p115GEF envers RhoA. De plus, Lsc/p115GEF présente une activité GAP envers $G\alpha_{13}$ (Kozasa *et al.*, 1998). La protéine Lsc/p115GEF est donc

simultanément une GAP et un effecteur de $G\alpha_{13}$, de même qu'une GDS pour Rho. Les interactions entre protéines G hétérotrimériques et Rho se font donc à plus d'un niveau et impliquent certaines sous-unités α en plus des sous-unités $\beta\gamma$.

Une production de phospholipides pourrait également assurer le lien entre les deux types de protéines G. Les données suivantes appuient cette hypothèse: 1- une isoforme de PI3K est directement activé par les sous-unités α ou $\beta\gamma$ (Stephens *et al.*, 1994; Stoyanova *et al.*, 1995); 2- PIP3, le produit de l'activité de cette kinase, lie certains domaines SH2 (Rameh *et al.*, 1995); 3- plusieurs protéines régulatrices de l'activité Rho possèdent un tel domaine SH2. Sur la base de ces faits, il est possible d'élaborer un modèle où une production locale de phospholipides commandée par une protéine G hétérotrimérique permette de recruter Rho au site d'activation, via une de ses protéines régulatrices.

Une partie du signal mitogène relayé par les Rho sur la voie issue des protéines G hétérotrimériques est déviée vers Ras via une voie tyrosine kinase (Fig. 5). Une transactivation du récepteur à l'EGF est observée chez les cellules Rat-1 stimulées par l'endothéline, par l'acide lysophosphatidique ou par la thrombine (Daub *et al.*, 1996). Par ailleurs, des études antérieures font état d'une augmentation substantielle du niveau de phosphorylation de Shc (un adaptateur de la voie tyrosine kinase) suite à une stimulation du récepteur de l'acide lysophosphatidique, du récepteur α_2 -adrénergique ou suivant l'expression de sous-unités $\beta\gamma$ (Van Biesen *et al.*, 1995). Cette augmentation est sensible aux inhibiteurs de protéines G hétérotrimériques et est bloquée de manière compétitive par la coexpression d'un peptide dérivé de $\beta\gamma$. La phosphorylation de Shc s'accompagne de la formation d'un complexe Shc-Grb2-Sos à la membrane. Grb2 est un adaptateur assurant le lien entre Shc et Sos via des domaines SH2 et SH3, tandis que Sos, qui est à la fois une rasGDS et une rhoGDS, permet l'activation de Ras. L'identité de la kinase responsable de la phosphorylation de Shc semble varier selon le type de récepteur initialement activé. Chez les myocytes stimulés par l'angiotensine, Shc est phosphorylée par Fyn (Sadoshima et Izumo, 1996),

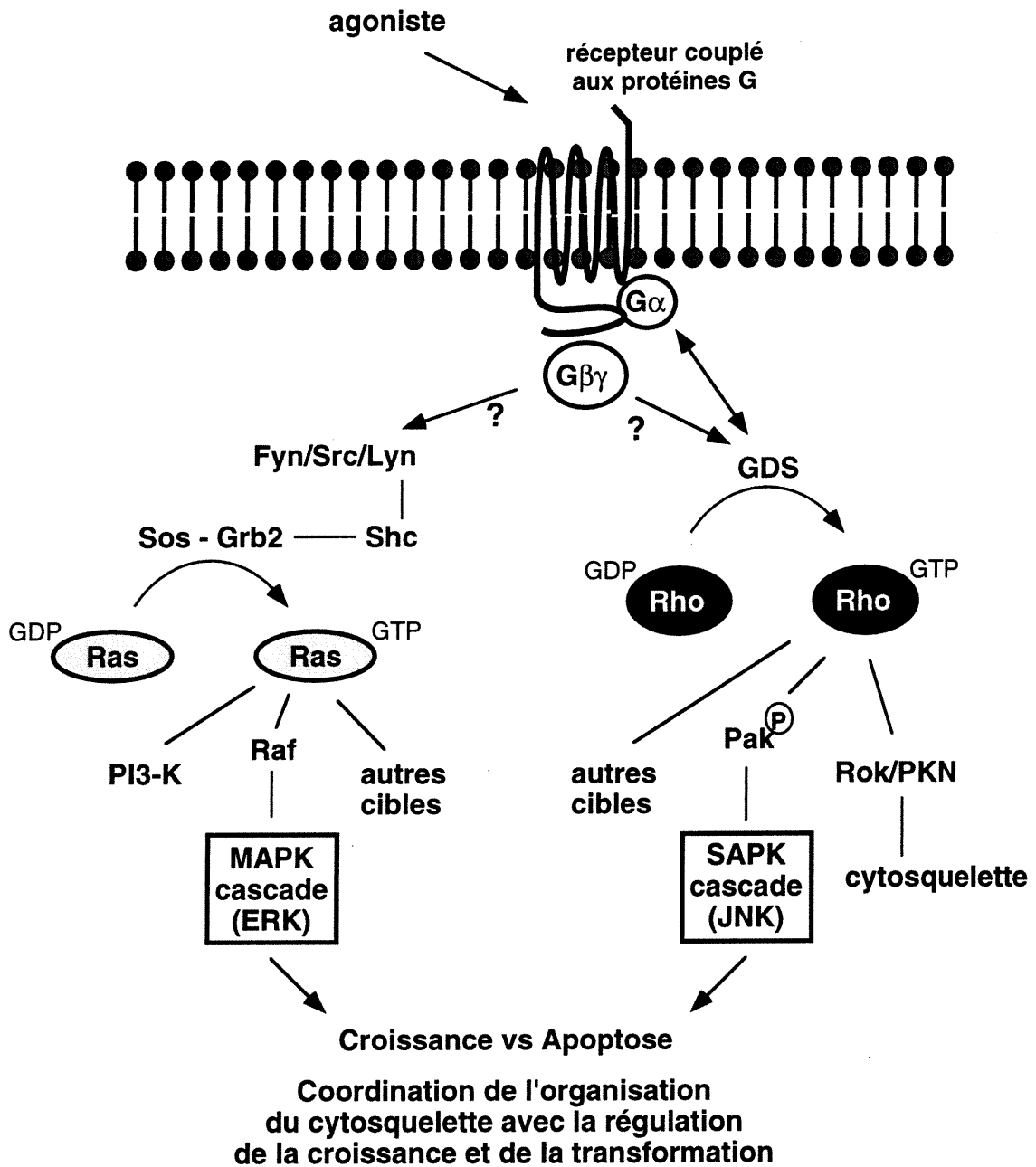


FIGURE 5. Activation des petites protéines G par les protéines G hétérotrimériques.

D'après Bokoch (1996c)

alors que chez les lymphocytes, Shc est phosphorylée par Lyn suivant l'activation des récepteurs muscariniques (Wan *et al.*, 1996). On ne sait cependant pas encore à quel niveau exactement le signal menant à Rho bifurque vers cette activité kinase en amont de ras, toutefois Sos a le potentiel nécessaire pour assurer le lien entre les voies Ras et Rho

1.4.1.1.2 Voie des tyrosines kinases

Les protéines Rho sont également mobilisées en réponse aux facteurs de croissance, qui eux signalisent via les récepteurs à activité tyrosine kinase. La liaison d'un ligand (EGF, PDGF, FGF, insuline...) par un récepteur induit un changement de conformation de son domaine extracellulaire permettant son oligomérisation. L'activité kinase s'en trouve stimulée et le récepteur s'autophosphoryle. Cette phosphorylation du récepteur favorise son interaction avec diverses protéines dont les domaines SH2 viennent lier les résidus tyrosines nouvellement phosphorylés. Le signal est ensuite relayé par une série d'adaptateurs et de molécules signalisatrices, via des interactions protéine-protéine, vers la petite protéine G Ras qui l'achemine vers la voie MAPK menant au noyau. Au niveau de Ras, ou légèrement en amont, une partie du signal bifurque vers Rho de manière à coordonner les changements morphologiques nécessaires à la croissance de la cellule.

On connaît peu de choses encore sur la manière dont les protéines Rho sont mobilisées sur la voie tyrosine kinase. Des études récentes semblent désigner Nck comme médiateur possible. Nck est un adaptateur possédant trois domaines SH3 via lesquels il recrute ses effecteurs, suivis d'un domaine SH2 pouvant lier les tyrosines phosphorylées. Comme on l'a vu plus tôt, cette protéine lie certaines protéines reliées à l'activité Rho, dont les effecteurs WASP et PRK2, de même que PAK. De plus, WASP en association avec Nck et Grb2 coprécipite avec le récepteur à l'EGF suivant sa stimulation par les facteurs de croissance (Rockow *et al.*, 1997). Quant à PAK, elle est recrutée à la membrane par Nck *in vivo* ce qui a pour effet de stimuler son activité sérine/thréonine (Lu *et al.*, 1997). Le recrutement de protéines régulatrices de l'activité Rho au voisinage de récepteurs tyrosine

kinase activés pourrait assurer l'action des facteurs de croissance sur l'organisation du cytosquelette.

1.4.1.2 Signalisation co-latérale

Les voies Ras et Rho sont possiblement coordonnées par l'intermédiaire d'interactions directes entre certaines de leurs protéines régulatrices. Par exemple, p190 rhoGAP est phosphotyrosylée et se complexe à p120 rasGAP suivant la stimulation de la cellule par les facteurs de croissance (Settleman *et al.*, 1992). De plus, l'expression d'un mutant inactif pour p120 rasGAP a pour effet de rendre son association à p190 rhoGAP constitutive, ce qui cause la dissociation de certains éléments du cytosquelette, suggérant que les effets de Ras sur la morphologie cellulaire passent par l'association de ces deux GAP et la mobilisation des Rho (McGlade *et al.*, 1993). Vav, qui possède un domaine rhoGDS coprécipite avec l'adaptateur Grb2 situé en amont de Ras (Machide *et al.*, 1995). Ral, une petite protéine G, est reliée à Ras par son facteur d'échange (ralGDS) (Spaargaren et Bischoff, 1994) et à la famille Rho par un effecteur (RIP1) qui possède une activité GAP dirigée vers Cdc42/Rac (Flores *et al.*, 1995). PI3K lie et active Ras via sa sous-unité catalytique, tandis que sa sous-unité régulatrice possède un domaine rhoGAP (inactif?) qui lie Cdc42 et Rac. PI3K a également le potentiel de recruter certaines protéines rhoGDS à la membrane via la production de phosphoinositides (Rameh *et al.*, 1995). De fait, l'activité rhoGDS de Vav et de Sos est directement contrôlée par les produits de la PI3K (Han *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1998). Dans le cas de Sos, l'activation de la PI3K par Ras permet de lever l'inhibition de l'activité rhoGDS du domaine DH autrement réprimée par le domaine PH (Nimnual *et al.*, 1998). Ces faits suggèrent que les voies Ras et Rho soient étroitement interreliées à de multiples niveaux.

Les protéines Rho ont également le potentiel de s'activer mutuellement en cascade. Le mouvement cellulaire nécessite la formation de diverses structures cytosquelettiques: production de filopodes exploratoires, extension de lamellipodes permettant de prendre appui et formation de fibres de stress

pour assurer la traction vers l'avant. Or, chacune de ces structures est sous la responsabilité d'un membre désigné de la famille Rho. Cdc42 se charge de la formation des filopodes (Nobes et Hall, 1995b), Rac de celle des lamellipodes (Ridley et Hall, 1992a) et RhoA de la formation des fibres de stress et des plaques d'adhérence focales (Ridley et Hall, 1992b). Les trois structures apparaissent en séquence suivant l'activation de Cdc42 chez les fibroblastes (Article 1, fig. 4), tandis que l'activation de Rac induit la formation des deux dernières et que RhoA induit seulement la dernière, suggérant fortement l'existence d'une cascade d'activation Cdc42->Rac->RhoA (Nobes et Hall, 1995b). La cascade est possiblement assurée par des interactions protéine-protéine entre diverses protéines régulatrices de l'activité Rho. Ost est un médiateur potentiel puisqu'il présente la particularité d'être à la fois activateur pour RhoA/Cdc42 et effecteur pour Rac (Horii *et al.*, 1994). Par ailleurs, une étude récente basée sur l'utilisation de mutants actifs et inactifs situe RhoG en amont de cette cascade chez les fibroblastes (Gauthier-Rouvière *et al.*, 1998). RhoG, dont le potentiel activateur sur les autres membres de la famille Rho s'exprime même en absence de facteurs de croissance, requiert cependant l'intégrité des structures microtubulaires suggérant que sa translocation de la périphérie nucléaire vers la membrane plasmique soit prérequis à l'activation de la cascade. Ces résultats suggèrent que chez les fibroblastes, une action concertée de plusieurs protéines Rho soit nécessaire au mouvement cellulaire.

La cascade d'activation n'est pas toujours directe. Chez les cellules Rat-1, RhoA est activée par Rac selon le mode paracrine. L'activation de Rac libère l'acide arachidonique qui est rapidement converti en leukotriènes (Peppelenbosch *et al.*, 1995). Ces leukotriènes sont libérés à l'extérieur de la cellule, où ils stimulent subséquentement certains récepteurs cellulaires couplés à RhoA.

1.4.1.3 Signalisation en aval

Tel que mentionné plus tôt, un nombre impressionnant d'effecteurs ont été identifiés au cours des dernières années. L'existence d'effecteurs

multiples appuie l'idée voulant que les protéines Rho contrôlent plusieurs voies de signalisation. Il devient notamment de plus en plus évident que l'organisation du cytosquelette et la transmission de signaux vers le noyau par les protéines Rho empruntent des chemins différents. Ainsi, chez les fibroblastes, une forme mutante de Cdc42 incapable de lier les effecteurs WASP et PAK bloque le cheminement de signaux vers le noyau sans affecter la formation de filopodes sous son contrôle (Lamarche *et al.*, 1996). Inversement, un autre type de mutation prévient la formation de certaines structures cytosquelettiques tout en autorisant une transmission, cependant réduite, des signaux vers le noyau.

Les voies reliant les Rho au cytosquelette ont déjà livré suffisamment de leurs secrets pour permettre l'élaboration de modèles qui seront discutés plus loin. Les voies menant au noyau sont partiellement élucidées (Fig. 6). Trois études publiées simultanément ont permis d'établir les premiers liens (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1995). On y montre que Cdc42 et Rac activent la cascade de protéines kinases de la famille JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) de même que celle de la famille p38/HOG, sans toucher à la voie ERK (extracellular regulated kinase). Cependant, Rac semble avoir un rôle permissif pour l'activation de ERK par Ras, puisque cette activité est inhibée par l'expression d'un mutant Rac inactivé (Frost *et al.*, 1996). L'inhibition des voies JNK et p38 fut démontrée par l'utilisation de mutants négatifs pour Cdc42 et Rac, alors que l'expression des facteurs d'échange Ost et Dbl, au contraire, stimule ces mêmes voies (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995). Ces voies, stimulées par les facteurs de croissance et les cytokines, convergent vers l'activation du facteur de transcription SRF (serum response element) sur le gène *c-fos* (Fig. 7). Les signaux acheminés par RhoA, en réponse à une stimulation de la cellule par l'acide lysophosphatidique (LPA), sont aussi dirigés vers SRF; cependant, la voie kinase est différente et demeure inconnue. L'activation des voies JNK et p38 est reproduite en présence de l'effecteur PAK intrinsèquement activé (Bagrodia *et al.*, 1995b) ou surexprimé (Frost *et al.*, 1996), suggérant fortement que PAK soit mobilisé en aval de Cdc42 et Rac, sur les voies menant à ces cascades de kinases. PAK n'est cependant pas le seul médiateur, puisqu'une mutation de Cdc42 et Rac

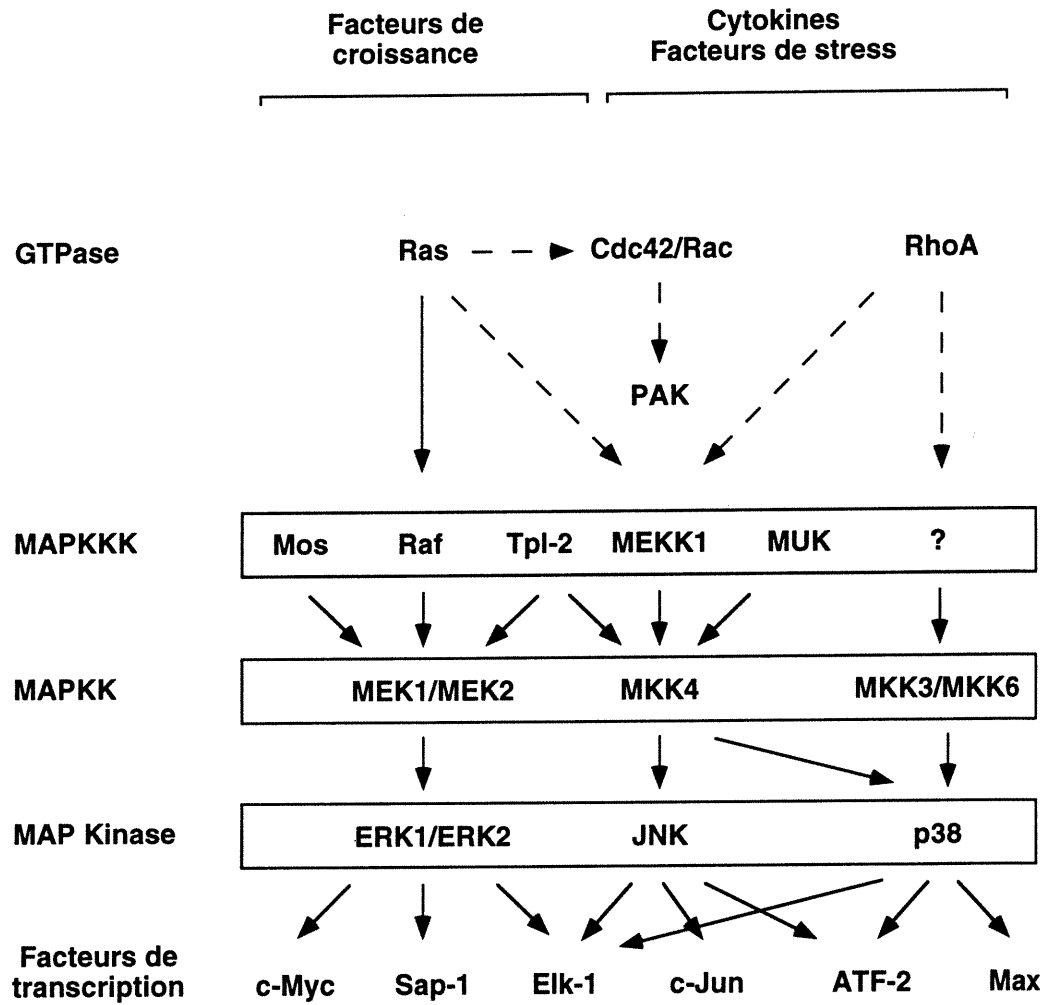


FIGURE 6. Cascade d'activation des MAPkinases.

D'après Whitmarsh et Davis (1996) et Fanger et al. (1997)

rompant les liens avec cet effecteur permet tout de même une stimulation réduite de ces voies (Lamarche *et al.*, 1996).

1.4.2 Transcription et cycle cellulaire

La participation des protéines Rho à la régulation du cycle cellulaire fut d'abord suggérée par l'action de la toxine C3 sur les cellules Swiss 3T3. Le traitement cause l'arrêt des cellules en phase G₁ du cycle, indiquant que Rho est nécessaire à la progression G₁ vers S (Yamamoto, 1993). En contrepartie, l'injection de RhoA, Cdc42 et Rac intrinsèquement activées à des fibroblastes stimule la progression des cellules vers la phase S, supportant l'hypothèse d'un rôle des protéines Rho dans les processus de transformation (Olson *et al.*, 1995). L'activation de Rho permet en fait la suppression de p21Waf1/cip1, un inhibiteur bien connu du cycle cellulaire, dont l'expression est autrement induite par la forme activée de Ras (Olson *et al.*, 1998). De façon générale, les signaux mitogéniques provenant de RhoA, Cdc42 et Rac sont acheminés au noyau par le biais des voies menant à JNK et p38/HOG (Fig. 7) (Whitmarsh *et al.*, 1997). Ces signaux convergent vers SRF qui, complexé au facteur tertiaire (TCF), se lie à l'élément de réponse sérique (SRE), un promoteur de transcription sur *c-fos* (Hill *et al.*, 1995). La voie Ras, pour sa part via ERK, active les facteurs de transcription du TCF sur SRE. La convergence des voies Ras et Rho sur SRE fournit une explication au fait que Rac est nécessaire à la transformation par Ras. SRE est donc de toute évidence un site d'intégration des signaux provenant de stimuli variés.

RhoA, Cdc42 et Rac, mais non Ras, activent également le facteur de transcription NF- κ B lorsque surexprimées dans différentes lignées cellulaires (Perona *et al.*, 1997). Cependant, la stimulation de NF- κ B en réponse au facteur nécrosant des tumeurs α (TNF α) relève de RhoA et Cdc42 mais non de Rac, comme le montre une étude réalisée avec des mutants négatifs. Le mécanisme de stimulation implique la phosphorylation de la sous-unité inhibitrice I κ B α , ce qui libère NF- κ B et permet la translocation de cette dernière du cytosol vers le noyau, où elle active la transcription de gènes

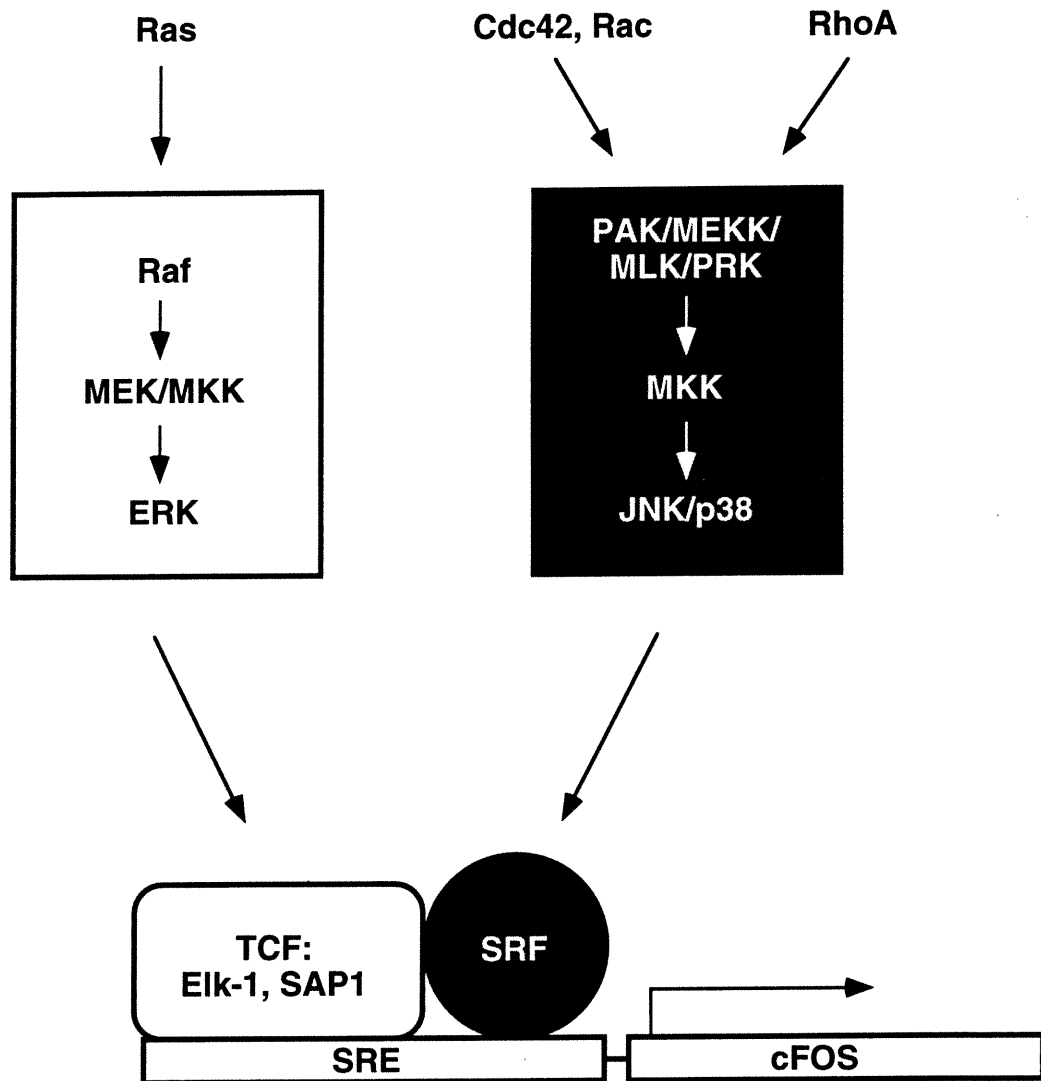


FIGURE 7. Activation de la transcription sur *c-fos*.

D'après Vojtek et Cooper (1995)

portant le site promoteur correspondant. L'activation de NF- κ B par Rac lors d'une stimulation par les cytokines fait plutôt appel à un mécanisme d'oxydoréduction (Sulciner *et al.*, 1996). NF- κ B joue un rôle important dans la régulation des fonctions immunitaires, dans la réponse inflammatoire et dans l'établissement de la balance entre signaux mitogéniques et apoptotiques. Ces résultats suggèrent que la famille Rho occupe un rôle prépondérant dans la commande de ces fonctions.

Un élément de régulation du cycle cellulaire vient de la liaison effectrice de Cdc42 et Rac à la sous-unité de 70 kDa de la S6 kinase (pp70^{S6k}) (Chou et Blenis, 1996). Tel que mentionné précédemment, cette kinase est responsable de la phosphorylation d'une sous-unité ribosomiale. L'inhibition de l'enzyme supprime la biogenèse d'éléments de l'appareil transcriptionnel nécessaires à la progression normale du cycle cellulaire. L'activation de la kinase est facilitée suivant sa liaison aux formes intrinsèquement activées de Cdc42 et Rac chez les cellules NIH 3T3 et cette stimulation est indépendante de la voie JNK. La cotransfection de Dbl, une rhoGDS, produit le même effet alors que des mutants négatifs pour Cdc42 et Rac préviennent la stimulation de pp70^{S6k}. RhoA est sans effet sur la kinase. Ces études soulignent l'existence de multiples voies d'activation de la transcription par les protéines Rho.

1.4.3 Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire civilisée. Au cours de l'apoptose, la cellule se condense et se fragmente pour ensuite être rapidement phagocytée, ce qui permet le recyclage du matériel cellulaire tout en évitant de provoquer une réponse inflammatoire indésirable. La fonction de l'apoptose est d'assurer l'élimination des cellules endommagées ou en surnombre. La participation des protéines Rho au phénomène apoptotique est suggérée par des études de transfection. La surexpression de formes intrinsèquement activées de Rac2 induit une atrophie du thymus par apoptose des thymocytes chez des souris transgéniques (Lores *et al.*, 1997). L'apoptose par stimulation du récepteur Fas est au contraire inhibée en

présence de formes inactives de Rac1 et Rac2 dans les cellules Jurkat (Gulbins *et al.*, 1996). Dans la même foulée, la surexpression de la forme normale de RhoA chez différentes lignées cellulaires augmente leur indice apoptotique (Jiménez *et al.*, 1995).

Les signaux permettant l'amorce du phénomène apoptotique ne sont pas clairement identifiés mais pourraient provenir des facteurs de transcription JNK ou NF κ B, tous deux potentiellement activés par les protéines Rho (Lacal, 1997) notamment par le biais de Rac et de son effecteur POSH (Tapon *et al.*, 1998). On sait cependant, que la fonction pro-apoptotique des protéines Rho nécessite un signal complémentaire qui est la production de céramides (Esteve *et al.*, 1995). Les céramides sont générés par l'action de la sphingomyélinase, une phospholipase C spécifique à la sphingomyéline, qui est un constituant phospholipidique des membranes plasmiques. La sphingomyélinase est stimulée par RhoA sous certaines conditions (Esteve *et al.*, 1995). Les céramides ont la propriété d'inhiber la croissance cellulaire et de favoriser l'apoptose. Ces études indiquent que différents membres de la famille Rho sont en mesure de participer à la fonction apoptotique.

1.4.4 Organisation du cytosquelette

La morphologie cellulaire est en constante réorganisation. L'adhérence de la cellule à une matrice, ou au contraire sa motilité, la contraction et la cytokinèse sont toutes des fonctions nécessitant la mobilisation et l'assemblage d'éléments du cytosquelette pour former les structures appropriées. La formation de ces structures est un processus dynamique régulé par un cycle de polymérisation/dépolymérisation des fibres d'actine.

1.4.4.1 Polymérisation de l'actine

Les fibres d'actine se présentent sous deux formes, l'une monomérique (actine-G) et l'autre polymérique (actine-F). En conditions normales, un certain équilibre est maintenu entre les formes G et F. L'actine-G est conservée sous forme monomérique par liaison à des protéines qui la

séquestrent. Les filaments d'actine-F sont stabilisés par des protéines qui coiffent leur extrémité barbelée. Les protéines Rho contrôlent possiblement la polymérisation de l'actine de deux façons: par la production de PIP2 et par le recrutement de la profiline (Fig. 8). La production de PIP2 est en effet stimulée par la liaison de Rac à PIP5-K (Tolias *et al.*, 1995). Or, ce phosphoinositide a la propriété de découpler l'actine de certaines de ses protéines protectrices, telles la gelsoline et l' α -actinine (Hartwig *et al.*, 1995). Ceci suggère que la liaison de Rac à PIP5-K permet l'élongation de l'actine par production de PIP2. À l'appui de cette hypothèse, Rac-GTP reproduit les effets de la thrombine sur la polymérisation de l'actine et dans les deux cas le phénomène est accompagné d'une hausse du niveau de PIP2 (Hartwig *et al.*, 1995). Une stimulation locale de la production de PIP2 par Rho semble donc être l'élément déclencheur de la polymérisation de l'actine.

Par ailleurs, RhoA activée a la possibilité de recruter la profiline par l'intermédiaire de son effecteur p140mDia (Watanabe *et al.*, 1997). L'accumulation de profiline au site d'activation stimule la polymérisation de deux façons. Premièrement, la profiline favorise l'échange de l'ADP pour l'ATP sur l'actine, ce qui diminue la concentration d'actine nécessaire à l'initiation de la polymérisation (Carlier et Pantaloni, 1997). Deuxièmement, la profiline agit en libérant l'actine de l'emprise de la thymosine β 4, une protéine séquestrante. Pour compliquer un peu les choses, la profiline lie PIP2. De plus, cette liaison et celle de l'actine sont mutuellement exclusives (Gutkind et Vitale-Cross, 1996). Le lien entre PIP2 et la profiline est cependant rompu suivant la phosphorylation de la PLC γ , suggérant que les signaux provenant des récepteurs à activité tyrosine kinase et ceux provenant de récepteurs couplés aux protéines G puissent converger à ce niveau (Gutkind et Vitale-Cross, 1996) (Fig. 8).

Une opportunité similaire est offerte à Cdc42 et Rac par leur effecteur commun WASP. WASP montre une forte homologie de séquence avec VASP, une protéine abondante au niveau de certaines structures du cytosquelette et reconnue pour lier la profiline et réguler la polymérisation de l'actine (Reinhard *et al.*, 1995b). Par analogie, une fonction semblable a été

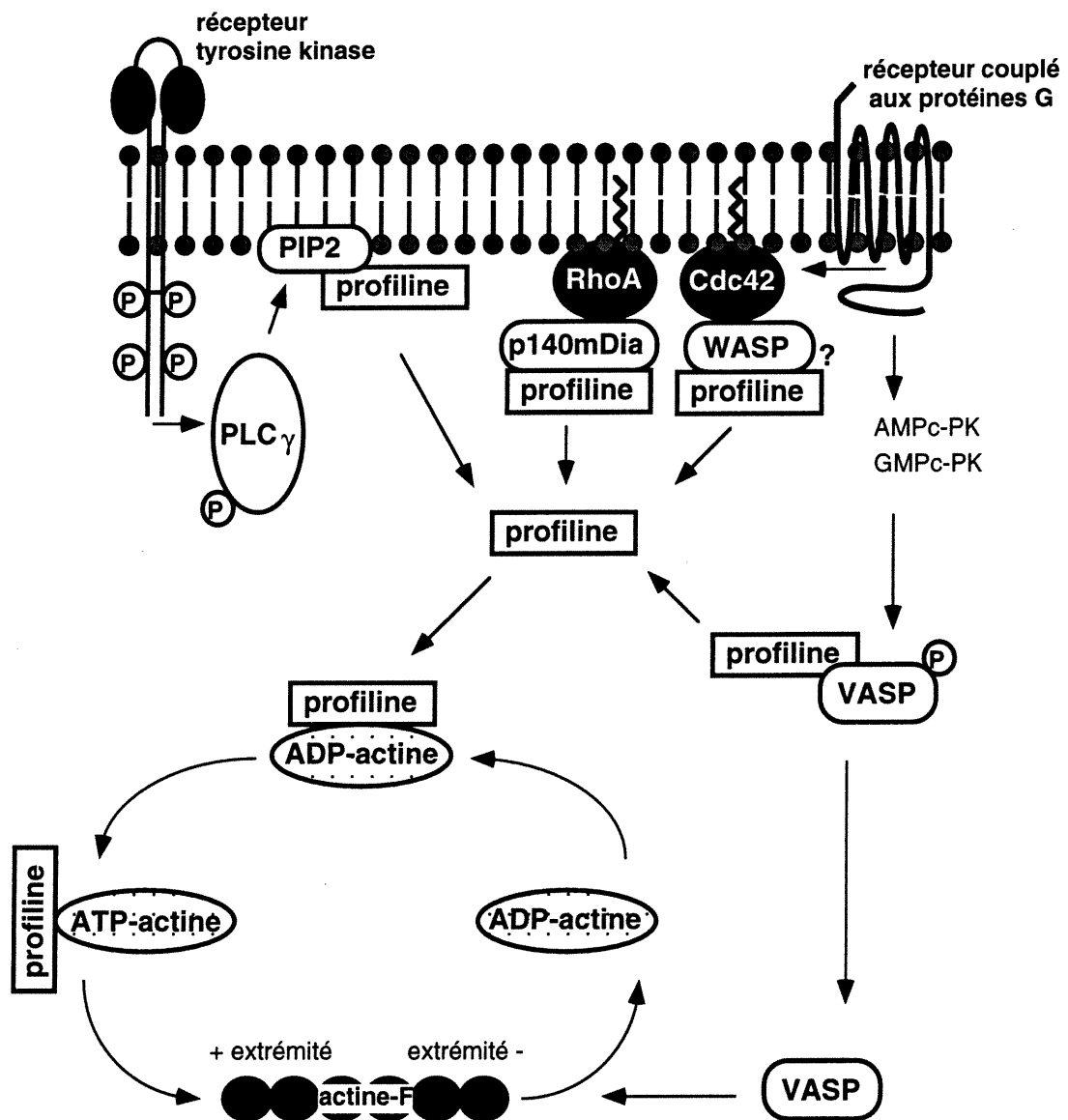


FIGURE 8. Régulation de la polymérisation de l'actine par les protéines Rho.

D'après Gutkind et Vitale-Cross (1996)

proposée pour WASP. Pour confirmer cette hypothèse, une équipe a surexprimé WASP chez différentes lignées cellulaires. La surexpression de WASP entraîne la polymérisation de l'actine aux sites d'expression, en présence de Cdc42, confirmant le rôle de WASP dans l'organisation du cytosquelette (Symons *et al.*, 1996). Le fait que WASP et p140mDia soient deux protéines effectrices des protéines Rho suggère la participation de ces petites protéines G à la régulation de la polymérisation de l'actine. WASP étant reliée à Cdc42 et Rac et p140mDia à RhoA, on peut conclure que chacun des membres de la famille Rho a la capacité d'induire la polymérisation de l'actine au site d'activation qui lui est propre.

1.4.4.2 Contractilité et motilité

La stimulation de la cellule par certains agonistes provoque une mobilisation du calcium, ce qui induit la kinase des chaînes légères de la myosine (MLC-K) à phosphoryler MLC (myosin light chain), stimulant ainsi l'activité d'hydrolyse de l'ATP sur la myosine. Ceci favorise le déplacement des têtes de myosine et leur interaction avec l'actine. La perte du phosphate inorganique ramène la myosine, ce qui provoque le glissement des fibres d'actine et de myosine l'une sur l'autre. Il en résulte soit une force de contraction, soit une force de tension le long des fibres de stress, selon le type de cellule. Les fibres de stress sont des structures essentielles à la motilité cellulaire. Elles sont formées de longs câbles d'actine convergeant aux points d'ancrage de la cellule à la matrice et fournissant une force d'appui lors du déplacement cellulaire.

Un lien entre RhoA et ces structures a récemment été mis en évidence. Une première étude a montré que l'action de la myosine phosphatase est régulée par l'association d'une de ses sous-unités (MBS) à Rho-kinase, un effecteur de RhoA aussi appelé p160Rock, Rock-II ou Rok α (Kimura *et al.*, 1996). L'activité phosphatase de MBS, recrutée à la membrane par RhoA, est en effet inhibée lors de sa phosphorylation par Rho-kinase. Une seconde étude a montré que l'expression de Rho-kinase dans les cellules HeLa provoque la formation de fibres de stress et de plaques d'adhérence suivant

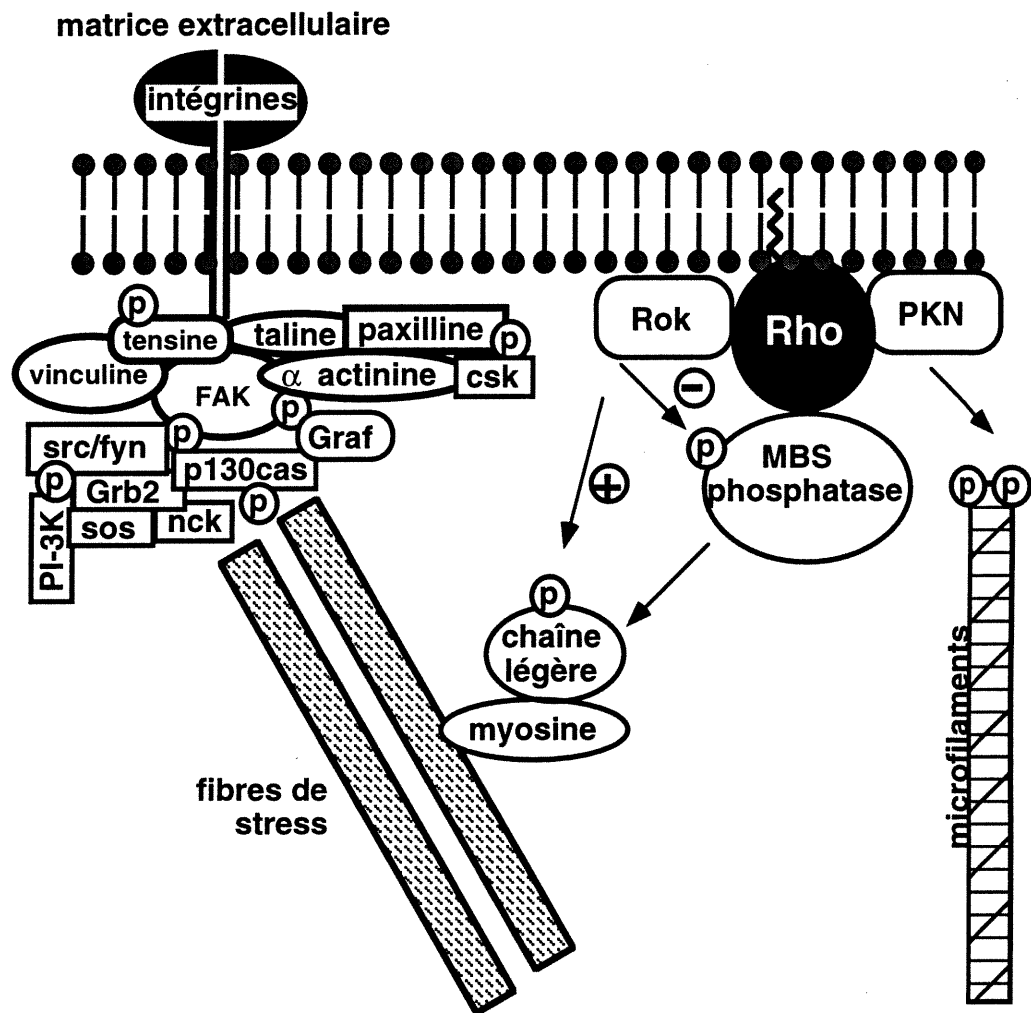


FIGURE 9. Rôle des protéines Rho dans la contraction du muscle lisse.
D'après Gutkind et Vitale-Cross (1996)

l'activation de la kinase, alors qu'un mutant négatif, sans activité kinase et incapable de lier RhoA, ne peut induire la formation de telles structures (Ishizaki *et al.*, 1997). Enfin, une troisième étude a montré que Rho-kinase pouvait également phosphoryler directement MLC indépendamment de MLC-K (Amano *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que RhoA participe à la contraction des fibres d'actine en modifiant l'état de phosphorylation des chaînes légères de la myosine. RhoA agit par l'intermédiaire de l'effecteur Rho-kinase qui phosphoryle directement MLC tout en inhibant sa déphosphorylation par MBS (Fig. 9). Ces actions combinées ont pour effet d'augmenter la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} .

Un accroissement de la motilité cellulaire est également associé à l'activation de l'échangeur Na-H (NHE) par divers stimuli extracellulaires, tel l'acide lysophosphatidique (LPA). Ce transporteur ubiquitaire (NHE) catalyse l'échange électroneutre de protons (H^+) intracellulaires contre des ions sodium (Na^+) extracellulaires régulant par le fait même le pH et le volume de la cellule (Noël et Pouyssegur, 1995). La voie de signalisation mobilisée par LPA vers NHE fait intervenir la sous-unité $G\alpha_{13}$ des protéines G hétérotrimériques et la petite protéine G RhoA (Hooley *et al.*, 1996; Vexler *et al.*, 1996). NHE est requis pour l'assemblage des fibres de stress et des plaques d'adhérence, puisque la formation de ces structures commandée par RhoA est inhibée en présence d'un inhibiteur spécifique au transporteur. NHE est activé par phosphorylation et la kinase responsable de cette modification vient d'être identifiée comme étant p160Rock, un effecteur de RhoA (Tominaga *et al.*, 1998a). Ces résultats suggèrent que NHE soit un élément important de la réorganisation, du cytosquelette nécessaire à la motilité et à la contractilité cellulaire sur la voie de signalisation de RhoA.

1.4.4.3 Adhérence au substrat

L'adhérence de la cellule à la matrice est assurée par les intégrines qui sont des protéines transmembranaires formant des complexes multiprotéiques reliés aux fibres d'actine, à la face interne de la membrane. Ces complexes regroupent des protéines diverses telles la vinculine, la tensine, la

taline, la paxilline, p125FAK et l' α -actinine (Fig. 9). Ces points d'ancrage sont le site d'aboutissement des fibres de stress. L'adhérence cellulaire et la formation de ces structures sont stimulées par l'acide lysophosphatidique (LPA). Chez les cellules Swiss 3T3, un traitement à la toxine C3 inhibe ces réponses, alors qu'une injection de RhoA activée les stimule, suggérant fortement la participation de cette petite protéine G (Ridley et Hall, 1992b). L'utilisation d'inhibiteurs a de plus montré que l'échangeur Na-H, activé et phosphorylé par p160Rock participe à l'adhérence cellulaire en favorisant l'agrégation des intégrines (Tominaga et Barber, 1998b).

Les mécanismes moléculaires régissant l'agrégation sont toutefois imparfaitement compris. Cependant, la microinjection d'anticorps anti-PIP2 empêche l'assemblage des structures associées aux points d'ancrage, soulignant, encore une fois, l'importance de ce phosphoinositide pour l'organisation du cytosquelette (Gilmore et Burridge, 1996). En sa présence, la vinculine change de conformation, ce qui a pour effet d'exposer ses sites de liaison à la taline et à l'actine. PIP2 stimule également la liaison de l' α -actinine à la PKN, un effecteur de RhoA, suggérant que l'effet des protéines Rho sur l'assemblage des complexes d'adhérence soit modulé par ce phosphoinositide (Mukai *et al.*, 1997).

Quoiqu'il en soit, il semble de plus en plus évident que les protéines Rho contrôlent la polymérisation de l'actine et son organisation en structures complexes par des voies différentes. De fait, une inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine n'entrave pas l'induction de l'adhérence des lymphocytes par Rho (Tominaga *et al.*, 1993). À l'inverse, il est possible d'inhiber la formation des plaques d'adhérence et des fibres de stress, par mutation de p160Rock, un effecteur de RhoA, sans empêcher la polymérisation de l'actine par RhoA (Ishizaki *et al.*, 1997). De plus, l'injection de diverses chimères Rac/RhoA à des cellules Swiss 3T3 a révélé que la région C-terminale de RhoA était responsable de la formation des plaques d'adhérence, alors que la région dite effectrice est réputée être plutôt située en N-terminal (Diekmann *et al.*, 1995). Ceci suggère l'existence de domaines multiples pouvant interagir simultanément avec différents effecteurs sur les

protéines Rho. La région N-terminale commanderait la polymérisation de l'actine, tandis que la région C-terminale serait responsable de l'organisation des structures cytosquelettiques spécifiques à chacune des protéines Rho.

1.4.5 Cytokinèse

La cytokinèse est le processus de séparation du cytoplasme survenant lors de la mitose. Le clivage est assuré par la contraction d'un anneau composé de fins filaments d'actine et de myosine. La participation de RhoA à la cytokinèse fut d'abord suggérée par l'apparition de cellules géantes multinucléées au sein de cellules en culture traitées à la toxine C3 (Rubin *et al.*, 1988). Les expériences reprises sur des œufs fertilisés en présence de C3 et de rhoGDI confirmèrent que la cytokinèse était bien inhibée sans toutefois affecter la division nucléaire (Kishi *et al.*, 1993). Le marquage des œufs à la phalloïdine (un ligand spécifique à l'actine) révéla que l'anneau contractile était absent chez les œufs traités. Ces résultats suggèrent que RhoA puisse régir la formation de cet anneau lors de la division cellulaire. Ils indiquent également que RhoA a la possibilité d'aiguiller l'assemblage de fibres d'actine vers différentes structures selon la phase du cycle cellulaire. La présence de fibres de stress maintient la cellule en contact étroit avec son support en phase G1. À l'entrée en phase M, la cellule s'arrondit, révélant la perte de ces structures, alors que les fibres d'actine sont mobilisées pour la formation de l'anneau contractile. La nature du signal moléculaire à l'origine de ce remaniement synchronisé du cytosquelette d'actine par RhoA demeure floue, mais pourrait impliquer l'effecteur PAK.

1.5 Pathologies associées aux protéines Rho

L'importance physiologique des protéines de la famille Rho se reflète dans le nombre croissant et la variété des pathologies leur étant associées.

1.5.1 Pathologies congénitales

La dysplasie faciogénitale ou syndrome d'Aarskog-Scott se traduit par des malformations multiples touchant le développement des structures squelettiques et urogénitales. L'analyse généalogique suggère une transmission récessive liée au chromosome X. Le gène responsable code pour FGD-1, une protéine d'échange nucléotidique pour Cdc42, soulignant la participation de cette petite protéine G au développement embryonnaire (Pasteris *et al.*, 1994).

Le syndrome de Wiskott-Aldrich est associé à une mutation du gène codant pour WASP, un effecteur de Cdc42 et Rac. Cette pathologie, de transmission héréditaire liée au chromosome X, est associée à des désordres immunologiques résultant de l'activité dysfonctionnelle des lymphocytes T, des neutrophiles et des plaquettes. Chez les patients atteints du syndrome, la morphologie des lymphocytes est altérée, suggérant que WASP participe normalement à l'organisation du cytosquelette de ces cellules (Kirchhausen et Rosen, 1996). À l'appui de cette hypothèse, la surexpression de WASP dans les cellules Jurkat induit la formation d'amas d'actine polymérisée qui colocalisent avec cette protéine (Symons *et al.*, 1996). Le phénomène est de surcroît aboli par la coexpression d'un dominant-négatif pour Cdc42, suggérant que WASP soit une composante du cytosquelette dont l'interaction avec l'actine est contrôlée par Cdc42.

Le retard de développement intellectuel lié au chromosome X est une condition hétérogène où le problème cognitif est le seul dénominateur commun chez les individus touchés. Un des gènes impliqués dans ce syndrome code pour l'oligophréine-1, une protéine à activité rhoGap (Billuart *et al.*, 1998). La protéine est fortement exprimée au niveau du cerveau fœtal, suggérant une mobilisation des protéines Rho au cours du développement neuronal.

La surdité progressive congénitale débute par une perte de l'audition des basses fréquences dès l'âge de 10 ans. À 30 ans, les individus atteints

ont développé une surdité totale bilatérale. Homme et femme sont touchés et le gène est dominant. Au niveau physiologique, les structures membranaires de la cochlée sont affectées. Le gène responsable de cette surdité code pour p140mDia, un effecteur de RhoA (Lynch *et al.*, 1997). Une mutation ponctuelle engendrant une forme tronquée de p140mDia est présente chez les individus atteints. Cette protéine est connue pour lier la profiline et favoriser la polymérisation de l'actine (Watanabe *et al.*, 1997). P140mDia est ubiquitaire, cependant le problème d'audition est la seule manifestation pathologique associée à la forme tronquée suggérant que l'oreille interne soit particulièrement sensible à la désorganisation du cytosquelette d'actine.

1.5.2 Pathologies vasculaires

L'hypertrophie cardiaque peut être artificiellement recréée par stimulation des cardiomyocytes à l'aide d'agonistes α_1 -adrénergiques, tel la phényléphrine. La stimulation par les agonistes provoque des changements morphologiques accompagnés de l'activation de gènes codant pour l'ANF et la chaîne légère des myosines. Ces réponses sont abrogées par l'administration de la toxine C3, suggérant la participation de RhoA, RhoB ou RhoC (Sah *et al.*, 1996).

L'hypercontractilité du muscle lisse est cause d'hypertension. Par ailleurs, la contractilité du muscle lisse est régulée au niveau cellulaire par la concentration de Ca^{2+} et la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} . Tel que mentionné plus haut, RhoA peut modifier la sensibilité des myofilaments en augmentant le niveau de phosphorylation des chaînes légères des myosines via l'effecteur p160Rock. Le développement d'un inhibiteur spécifique de l'activité kinase de p160Rock a récemment permis de démontrer l'implication des protéines Rho dans différents modèles d'hypertension chez le rat. L'inhibition de p160Rock chez les rats hypertendus normalise en effet leur tension artérielle (Uehata *et al.*, 1997).

1.5.3 Cancer

RhoA et Rac sont reconnues depuis quelque temps déjà pour présenter par elles-mêmes un potentiel faiblement oncogénique (voir article 1). Récemment, il est devenu évident que Cdc42 possède le même potentiel puisque les cellules surexprimant une forme intrinsèquement activée de Cdc42 croissent indépendamment de leur attachement à la matrice extracellulaire (Qiu *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997). Par ailleurs, les inhibiteurs de la farnésyltransférase bloquent la transformation induite par Ras avec une cinétique correspondant à une inhibition de RhoB plutôt qu'à celle de Ras elle-même, suggérant que RhoB puisse être un joueur important dans ce type de transformation (Lebowitz *et al.*, 1995). D'autre part, certaines protéines régulatrices de l'activité Rho sont directement responsables de transformations malignes. Ainsi Bcr, une GAP pour Cdc42 et Rac, est impliquée dans une translocation chromosomiale à l'origine de leucémies myélogéniques et lymphoblastiques (Lugo *et al.*, 1990). De plus, de nombreuses rhoGDS sont également des oncogènes (Tableau II).

Un des rôles des protéines Rho au cours de la prolifération cellulaire semble être de supprimer l'expression de p21^{waf1/cip1}, un inhibiteur du cycle cellulaire (Olson *et al.*, 1998). Les protéines Rho contribuent également à l'invasion métastatique par l'intermédiaire de Tiam-1, une GDS pour RhoA, Cdc42 et Rac. L'expression rétroviralement assistée d'une forme tronquée de la protéine chez les cellules T lymphomateuses leur confère en effet un caractère invasif (Habets *et al.*, 1994). Enfin, une des voies par lesquelles les Rho influencent le développement des cellules cancéreuses passe sans doute par les intégrines. Les intégrines en tant que médiatrices de l'attachement cellulaire sont des facteurs importants de l'invasion tumorigénique (Varner et Cheresch, 1996). De plus, l'expression de certains types d'intégrines est associée à l'angiogénèse tumorale (Friedlander *et al.*, 1995). Le fait que les protéines Rho affectent directement les fonctions des

intégrines en stimulant la formation des complexes d'adhérence focale (Hotchin et Hall, 1995) et en modifiant l'avidité des intégrines pour la matrice extracellulaire (Laudana *et al.*, 1996) évoque un lien entre intégrines, Rho et cancérisation.

TABLEAU VI. Pathologies associées aux protéines Rho

Pathologies	Rho	Cdc42	Rac
Dysplasie faciogénitale	---	X	---
Syndrome de Wiskott-Aldrich	---	X	---
Retard mental lié au chromosome X	X	---	---
Surdité progressive congénitale	X	---	---
Transformation maligne	X	X	X
Leucémies myélogéniques et lymphoblastiques	---	X	X
Lymphomes diffus des lymphocytes B	X	X	X
Invasion tumorigénique/métastases	X	X	X
Hypertrophie cardiaque	X	---	---
Hypertension	X	---	---

1.6 Le rein

1.6.1 Physiologie rénale

Jusqu'à 1700 litres de sang transitent quotidiennement par le système rénal. De ce total, 180 litres de plasma par jour sont filtrés par les glomérules rénaux. Cependant, l'urine produite dépasse rarement 2 litres par jour en conditions normales. Ceci illustre le travail énorme de réabsorption accompli par le rein. Quelques substances présentes dans le filtrat, comme la créatinine, ne sont pas réabsorbées. Les autres sont réabsorbées soit passivement, comme l'urée, répondant strictement aux gradients de concentration, soit activement, comme le glucose. Dans ce dernier cas, la réabsorption est saturable et lorsque la limite est atteinte, l'élimination urinaire croît avec la concentration plasmatique. Le tubule rénal peut également

excréter passivement ou activement certaines substances. C'est le cas des ions hydrogène et potassium et de certains anions et cations organiques tels la pénicilline et la morphine exogènes.

Le rein est un organe essentiel au maintien de l'homéostasie (Tableau VII). Il régule le volume, l'osmolarité, la composition en minéraux et l'acidité du sang en ajustant l'excrétion d'eau et d'électrolyte de façon à assurer l'équilibre nécessaire au bon fonctionnement des divers organes et cellules de l'organisme. Il contribue à la détoxification de l'organisme, en éliminant les déchets métaboliques tels que l'urée, l'acide urique, la créatinine, les produits de dégradation de l'hémoglobine et divers autres métabolites. Il participe à l'élimination de xénobiotiques tels que drogues, pesticides, additifs alimentaires et leurs métabolites. Le rein a aussi une fonction endocrine et sécrète trois hormones qu'il déverse dans la circulation sanguine. Ce sont la rénine, l'érythropoïétine et la 1,25-dihydroxyvitamine D₃. La rénine est une enzyme protéolytique qui, une fois libérée dans la circulation sanguine, permet la formation d'angiotensine, une hormone régulant la tension artérielle. L'érythropoïétine est une hormone peptidique stimulant la production des globules rouges au niveau de la moelle osseuse. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ est formée à partir de la vitamine D. Cette hormone stimule l'absorption du calcium et du phosphate par l'intestin. Une dernière fonction rénale est la gluconéogenèse. En période de jeûne prolongé, le rein synthétise du glucose à partir d'acides aminés et d'autres précurseurs. Le glucose ainsi produit est libéré dans le sang. Dans ces conditions, la production rénale de glucose peut atteindre jusqu'à 20% de celle du foie, pour une même période de temps.

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron. Chaque rein en compte entre 1,000,000 et 1,500,000 chez l'humain. Le néphron comporte deux parties: le glomérule et le tubule. Le glomérule est l'organe filtrant. Il est composé d'un enchevêtrement de petits vaisseaux sanguins alimentés par une artériole afférente et drainé par une veinule efférente, et de la capsule de Bowman qui enveloppe l'amas vasculaire tout en s'ouvrant sur le tubule. Le tubule est l'organe fonctionnel du rein. Il comporte plusieurs segments. En partant du glomérule, on retrouve d'abord le tubule contourné proximal, situé

dans la partie corticale du rein. C'est la zone préférentielle de réabsorption active du sodium filtré. La réabsorption de ce sel permet le co- et le contre-transport de diverses molécules et a pour effet de créer un gradient osmolaire transépithélial favorisant la réabsorption simultanée de l'eau. Vient ensuite l'anse de Henlé, en forme d'épingle à cheveu, qui plonge vers la région médullaire du rein pour ensuite remonter jusqu'au cortex. La branche descendante est perméable à l'eau, alors que la branche ascendante, imperméable à l'eau, réabsorbe le sodium. L'accumulation de sodium, générée par la branche ascendante dans la médulla, crée un appel d'eau au niveau de la branche descendante, ce qui favorise la réabsorption de ce dernier élément. Au moment où elle quitte l'anse de Henlé, l'urine a déjà restitué près de 95% de l'eau et des sels filtrés par le glomérule. Le tubule contourné distal et le tube collecteur, sous contrôle hormonal, se chargent par la suite de la régulation fine de la réabsorption de ces deux éléments.

TABLEAU VII. Fonctions rénales

Régulation de l'équilibre hydrique, électrolytique et acido-basique:	-sodium/chlorure/eau -calcium/potassium -bicarbonate/CO ₂
Détoxification du sang:	-excrétion de déchets métaboliques -excrétion de toxines et de xénobiotiques
Sécrétion d'hormones:	-rénine -érythropoïétine -1,25-dihydroxyvitamine D ₃
Gluconéogenèse	-en période de jeûne

1.6.2 La cellule épithéliale

Le tubule rénal est tapissé sur toute sa longueur d'une seule couche de cellules épithéliales. Ce type de cellule est hautement polarisé. Les domaines apical et basolatéral se distinguent nettement par leur composition protéique et lipidique. Le domaine apical fait face à la lumière du tubule et présente de nombreuses microvillosités formant une bordure en brosse ayant pour effet d'augmenter la surface de contact avec le milieu extérieur. On y trouve les canaux, les transporteurs et les protéases nécessaires à la réabsorption de l'eau, des ions et des macromolécules. Les niveaux de cholestérol et de sphingomyéline y sont élevés, assurant une forte étanchéité. Le domaine basolatéral voisine le système sanguin. Il contient dans sa structure la plupart des récepteurs nécessaires à l'intégration des signaux véhiculés par les hormones et les facteurs de croissance libérés par le système sanguin. La $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, un transporteur actif localisé à la membrane basolatérale, génère et maintient le gradient électrochimique de sodium utilisé par plusieurs transporteurs apicaux. Cette membrane est enrichie en phosphatidylcholine et en phosphatidylinositol, ce qui lui confère une bonne fluidité, facilitant la diffusion. Les deux domaines sont délimités par des jonctions serrées (zonula occludens) formant une barrière étanche sur la face latérale de la cellule (Fig. 10).

L'établissement et le maintien de la polarité des cellules épithéliales sont assurés par certaines structures du cytosquelette et par un ciblage spécifique des composantes membranaires. La polarisation cellulaire dépend notamment des contacts cellule-cellule et cellule-substrat (Fig. 10). Les cellules adjacentes sont maintenues en contact étroit par liaison de leurs cadhérines respectives. La portion intracellulaire des cadhérines interagit avec le cytosquelette d'actine via les caténines et la plakoglobine. L'ensemble forme la zonula adherens. L'attachement de la cellule à la lame basale est assuré par les intégrines. Ces glycoprotéines transmembranaires se lient aux protéines de la matrice extracellulaire. Le domaine intracellulaire des hétérodimères d'intégrine s'associe au cytosquelette d'actine via une collection de protéines cytosoliques incluant la taline, la tensine, la vinculine,

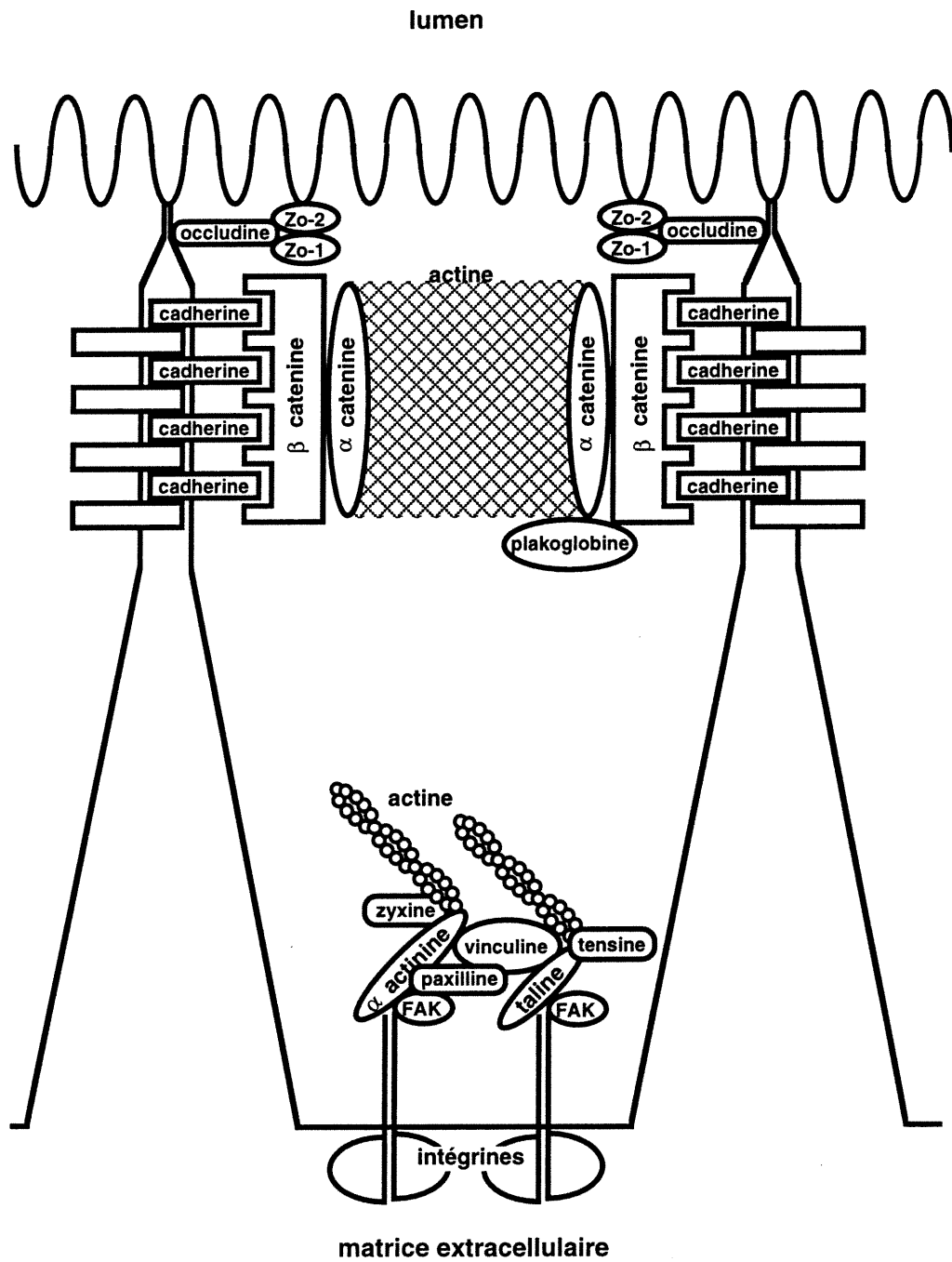


FIGURE 10. La cellule épithéliale rénale.

D'après Cantley (1996)

l' α -actinine, la paxiline, la zixine et la kinase d'adhérence focale (FAK). L'ensemble forme les plaques d'adhérence (focal adhesion) où viennent s'ancrer les fibres de stress d'actine. La formation des complexes d'adhérence et des fibres de stress est régulée par des signaux extracellulaires et intracellulaires auxquels participent les petites protéines G de la famille Rho.

1.6.3 Les petites protéines G dans le rein

Chacune des familles de petites protéines G est représentée dans le tissu épithélial rénal. Cependant, l'importance du cytosquelette pour le maintien de la polarisation cellulaire nécessaire aux fonctions rénales laisse soupçonner que la famille Rho y occupe une place prépondérante. De fait, RhoA, Cdc42 de même que leur protéine régulatrice GDI y sont abondamment exprimées (Boivin et Béliveau, 1995). RhoA et Cdc42 sont immunodétectées au niveau des membranes basolatérales et apicales, de même que dans la fraction cytosolique où une portion des deux protéines est associée au cytosquelette (Boivin et Béliveau, 1995). Toutes deux sont transférées de la fraction soluble vers la fraction membranaire en présence de $GTP\gamma S$, un analogue non-hydrolysable du GTP. En revanche, l'ajout de GDI exogène permet leur extraction de la membrane apicale. Ce cycle de localisation est une caractéristique importante de RhoA et Cdc42 et constitue probablement le pivot de leur activité.

1.6.4 La carboxyméthylation des protéines rénales

Les protéines RhoA et Cdc42 rénales sont méthylées en C-terminal au cours de leur maturation. Cette réaction est stimulée en présence de $GTP\gamma S$ et favorise l'ancrage membranaire des ces petites protéines G. L'enzyme catalysant cette réaction, une prénylcystéine méthyltransférase (PCMT) est cependant strictement membranaire et aucune activité PCMT en présence d'acétylfarnésylcystéine (AFC), un substrat synthétique, n'est observée dans la fraction cytosolique du tissu rénal.

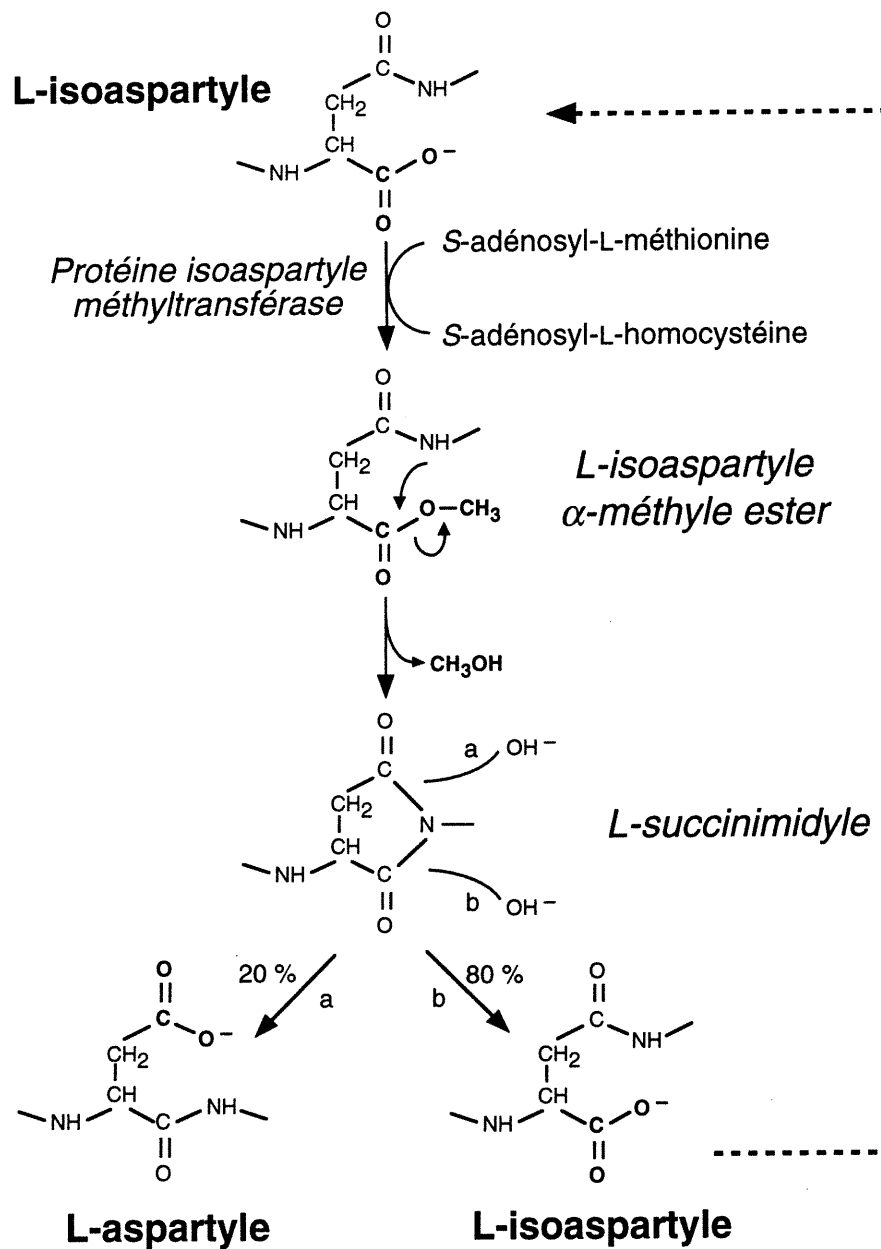


FIGURE 11. Réparation de résidus isoaspartyles par méthylation.
D'après Visick et Clarke (1995)

Une autre activité de méthylation des protéines, identifiée comme étant celle de l'isoaspartyle carboxyle méthyltransférase (PIMT), est cependant observée au niveau de la fraction soluble du cortex rénal. L'enzyme reconnaît spécifiquement les résidus aspartyles inhabituels résultant de l'isomérisation, de la désamidation et de la racémisation de résidus aspartyles et asparagines. Ces altérations affectent les protéines au cours du vieillissement cellulaire.

La PIMT catalyse le transfert de groupements méthyles provenant de la S-adénosyl-L-méthionine, vers la fonction carboxylique portée par la chaîne latérale des résidus ainsi altérés. Cette méthylation constitue la première étape de leur reconversion vers une forme normale (Fig. 11). Le large éventail des protéines ainsi méthylées et la nature des résidus impliqués suggèrent que cette méthyltransférase participe au recyclage de protéines endommagées.

L'enzyme est ubiquitaire. Néanmoins, et contrairement à ce qui est observé pour d'autres tissus, son activité est stimulée au niveau de la fraction soluble du cortex rénal en présence de GTP γ S (Gingras et Béliveau, 1992; Pelletier *et al.*, 1996). Cette modulation par le nucléotide guanylé suggère fortement la participation d'une petite protéine G. En plus de son rôle lié au vieillissement et à la réparation des protéines endommagées, la méthylation des résidus isoaspartyles présente donc un potentiel régulateur des fonctions cellulaires du tissu rénal. La signification physiologique du phénomène demeure cependant à établir.

1.7 Hypothèses de travail et objectifs expérimentaux

1.7.1 Hypothèses de travail

De manière générale, l'activité des petites protéines G est gouvernée par leur état nucléotidique. Elles sont inactives lorsque liées au GDP et actives lorsque liées au GTP. Le passage de l'un à l'autre état induit un changement de conformation favorisant leur interaction avec des partenaires

spécifiques. Les complexes ainsi formés favorisent ou inhibent la transmission de signaux à l'intérieur de la cellule. Ces protéines signalisatrices sont donc essentielles au maintien des fonctions cellulaires.

L'activation des petites protéines G se fait au niveau des membranes cellulaires. Dans le cas des membres de la famille Ras, l'isoprénylation suffit à assurer leur acheminement à la membrane à laquelle elles demeurent associées. La situation est différente pour les protéines de la famille Rho, RhoA et Cdc42. Même lorsque post-traductionnellement matures, on les retrouve de manière importante dans la fraction cytosolique, maintenues sous forme inactives par leur association avec la protéine GDI. Puisque les enzymes nécessaires aux modifications post-traductionnelles des protéines Rho sont membranaires, sauf les isoprényltransférases qui sont solubles, la présence de formes matures de ces protéines au niveau de la fraction soluble témoigne du fait qu'elles peuvent être extraites des membranes cellulaires par un mécanisme encore mal défini auquel participe la protéine GDI.

Tel que souligné en introduction, les protéines de la famille Rho assurent des fonctions variées répondant à divers stimuli nécessitant leur mobilisation en des points cellulaires précis. Selon toute vraisemblance, les complexes Rho/GDI présents dans la fraction soluble constituent une réserve pouvant être mobilisée dans le temps et l'espace. Afin d'être activées les protéines Rho doivent être réacheminées à la membrane et leur association à GDI rompue. La protéine GDI est donc un élément clé du contrôle des fonctions des protéines Rho.

1.7.2 Objectifs expérimentaux

L'objectif principal ayant guidé la réalisation de nos travaux a été la caractérisation des mécanismes moléculaires régissant l'activité des petites protéines G de la famille Rho. Ces protéines gouvernent l'organisation du cytosquelette d'actine, qu'elles restructurent en fonction des besoins de la cellule. Le rein est un excellent modèle pour réaliser cet objectif. Le tissu épithélial rénal est en effet composé de cellules hautement polarisées,

présentant l'avantage de pouvoir être fractionnées en compartiments subcellulaires distincts. Le maintien de la polarité cellulaire est essentiel au bon fonctionnement de l'organe et repose sur une organisation bien structurée du cytosquelette. Les petites protéines G de la famille Rho sont donc susceptibles d'y jouer un rôle important. De fait, on les retrouve en abondance dans le tissu rénal. RhoA et Cdc42 s'y déplacent entre compartiments membranaires et fraction soluble avec l'aide de leur protéine régulatrice GDI. Nous nous sommes penchés sur l'étude des mécanismes gouvernant le cycle de localisation de ces deux petites protéines G, partant de l'hypothèse qu'il est vraisemblablement une des clés du contrôle de leur activité. Nous avons complété cette étude par une analyse des voies de signalisation impliquées dans la stimulation par les petites protéines G d'une activité de méthylation des protéines sur résidus isoaspartyles.

CHAPITRE II : ARTICLES

- 2.1 Regulation of cytoskeletal functions by Rho small GTP-binding proteins in normal and cancer cells. (Publié dans The Canadian Journal of Physiology and Pharmacology)
- 2.2 Regulation of Rho proteins binding to membranes by Rho-GDI: inhibition of releasing activity under physiological ionic conditions. (publié chez Biochemistry and Cell Biology)
- 2.3 Regulation of Rho-GDI activity by proteolysis in kidney membranes. (Soumis à Biochemistry and Cell Biology)
- 2.4 Inhibition of GTP γ S-dependent L-isoaspartyl protein methylation by tyrosine kinase inhibitors in kidney. (Publié chez Cellular Signalling)

Regulation of cytoskeletal functions by Rho small GTP-binding proteins in normal and cancer cells¹

Dominique Boivin, Diane Bilodeau, and Richard Béliveau

Abstract: The actin cytoskeleton is involved in numerous cellular functions such as cell motility, mitogenesis, morphology, muscle contraction, cytokinesis, and establishment of cell polarity. The members of the Rho subfamily of small GTP-binding proteins emerge as key regulators of cytoskeleton organization. Rho, Rac, and CDC42 are implicated in the regulation of actin microfilament organization of different cell structures, such as stress fibers linked to focal adhesions and membrane ruffles induced by extracellular stimuli. Rho proteins also regulate the activity of several enzymes involved in the formation of phospholipid derivatives, which could mediate their effect on the cytoskeleton. The activity of Rho proteins is regulated by many nucleotide exchange factors and GTPase-activating proteins, some of which are oncogene products, and other disease-associated proteins. The potential role of these small GTP-binding proteins in carcinogenesis is suggested by the actin reorganization seen in transforming cells and by the need for functional Rho proteins in Ras mitogenic activation.

Key words: GTP-binding proteins, actin cytoskeleton, cell motility, polarity, morphology.

Résumé : L'actine participe à de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la motilité, la mitogénèse, la morphologie, la contraction musculaire, la cytokinèse et l'établissement de la polarité des cellules. Les petites protéines G de la sous-famille Rho sont considérées comme des régulateurs clés de l'organisation du cytosquelette. Rho, Rac et CDC42 participent à la régulation de l'organisation des microfilaments d'actine de différentes structures cellulaires, telles que les fibres contractiles liées aux plaques d'adhérence et les plis membranaires induits par des stimuli extracellulaires. Les protéines Rho régulent aussi l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans la formation de dérivés phospholipidiques susceptibles de véhiculer leur effet sur le cytosquelette. L'activité des protéines Rho est régulée par de nombreux facteurs d'échange nucléotidique et par de nombreuses protéines stimulatrices de l'activité GTPase, dont certains sont des produits d'oncogènes et d'autres des protéines associées à diverses maladies. Le rôle possible, dans la carcinogénèse, de ces petites protéines se liant au GTP est suggéré par la réorganisation de l'actine, observée dans les cellules transformantes, ainsi que par le besoin de protéines Rho fonctionnelles pour l'activation mitogène de Ras.

Mots clés : protéines se liant au GTP, actine, motilité cellulaire, polarité, morphologie.
[Traduit par la Rédaction]

The cytoskeleton

The organization of the eucaryotic cell structure and functions relies on the assembly and maintenance of a filamentous protein network called the cytoskeleton. This network extends throughout the cytosol and is connected to the cell plasma membrane. The cytoskeleton is composed of three different types of fibers: microtubules, intermediate filaments, and microfilaments (Carraway and Carraway 1989). These fibers

form a complex dynamic structure, which responds to intracellular and extracellular stimuli. Microtubules are formed by the GTP-dependent linear polymerization of α - and β -tubulin. They provide a track for motor protein driven vesicle cargo and also play a role in the establishment of cell polarity (Lafont et al. 1994). Intermediate filaments are particularly stable fibrillar structures, which provide mechanical strength. Different types of intermediate filaments have been described, including nuclear lamins, vimentin-like proteins, keratins, and neuronal intermediate filaments. Microfilaments, which are important for cell movement, are composed of actin subunits, whose polymerization requires ATP.

Actin polymerization occurs beneath the cell surface and creates various tridimensional structures, depending on the nature of the associated actin-binding proteins (Bretscher 1991). Contractile bundles are generated when actin filaments are loosely linked by α -actinin allowing insertion of myosin II. Tight parallel bundles are formed when fimbrin, a much smaller globular protein, is associated with microfilaments. Finally, cross-linking of actin filaments by filamin dimers gives a loose gel-like organization. The different filament arrays are linked to specific cell surface structures that participate in different functions. Contractile bundles form stress

Received October 12, 1995.

D. Boivin,^{2,3} D. Bilodeau, and R. Béliveau.⁴ Laboratoire d'oncologie moléculaire, Département de chimie, Université du Québec à Montréal, QC H3C 3P8, Canada.

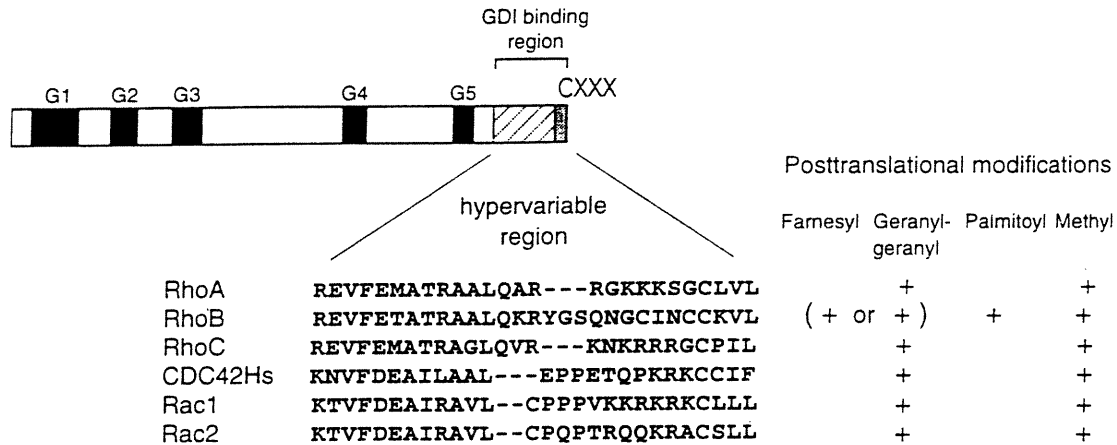
¹ This paper has undergone the Journal's usual peer review.

² Present address: Department of Biochemistry, McGill University, 3655 Drummond Street, Montréal, QC H3G 1Y6, Canada.

³ Equal first authors.

⁴ Author for correspondence at Laboratoire d'oncologie moléculaire, Département de chimie, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Station A, Montréal, QC H3C 3P8, Canada.

Fig. 1. Features of Rho GTP-binding proteins. Regions G1 to G5 are highly conserved and essential for nucleotide binding and hydrolysis. Most divergence occurs at the C-terminus in the hypervariable region. All Rho proteins are geranylgeranylated and methylated except RhoB, which is modified by either a farnesyl or a geranylgeranyl group, methylated, and further modified by a palmitoyl group.



fibers at the focal contact between the cell surface and the extracellular matrix or between adjacent cells. Focal adhesion of the cell to the supporting matrix is mediated by transmembrane integrins and an intracellular attachment complex formed by talin, paxillin, and vinculin (Burrige et al. 1988). Similarly, adjacent cell-cell anchoring junctions are assured by transmembrane cadherins and a complex formed of catenin, plakoglobin, and vinculin (Geiger and Ginsberg 1991). Bundles of actin filaments are linked to these complexes of attachment proteins through α -actinin. In addition to their anchoring role, focal adhesions can serve, at the matrix level, as a traction base for cell movement and, at the cell-cell connection, as a cement during morphogenesis. Because some of their protein components are kinases, focal contacts also participate in cell signaling (Ridley and Hall 1994). Tight bundles underlie surface protrusions forming lamellipodia, filopodia, and microvilli. Lamellipodia and filopodia are polarized in the direction of the cell movement in which they participate. Microvilli are abundant in epithelial cells, where they increase the apical absorption surface. The gel-like actin network sustains the cell cortex and seems to be involved in the cytoplasmic streaming delivery of metabolites. Small GTP-binding proteins of the Rho subfamily have recently been shown to control the complex organization of polymerized actin (Hall 1994).

Small GTP-binding proteins

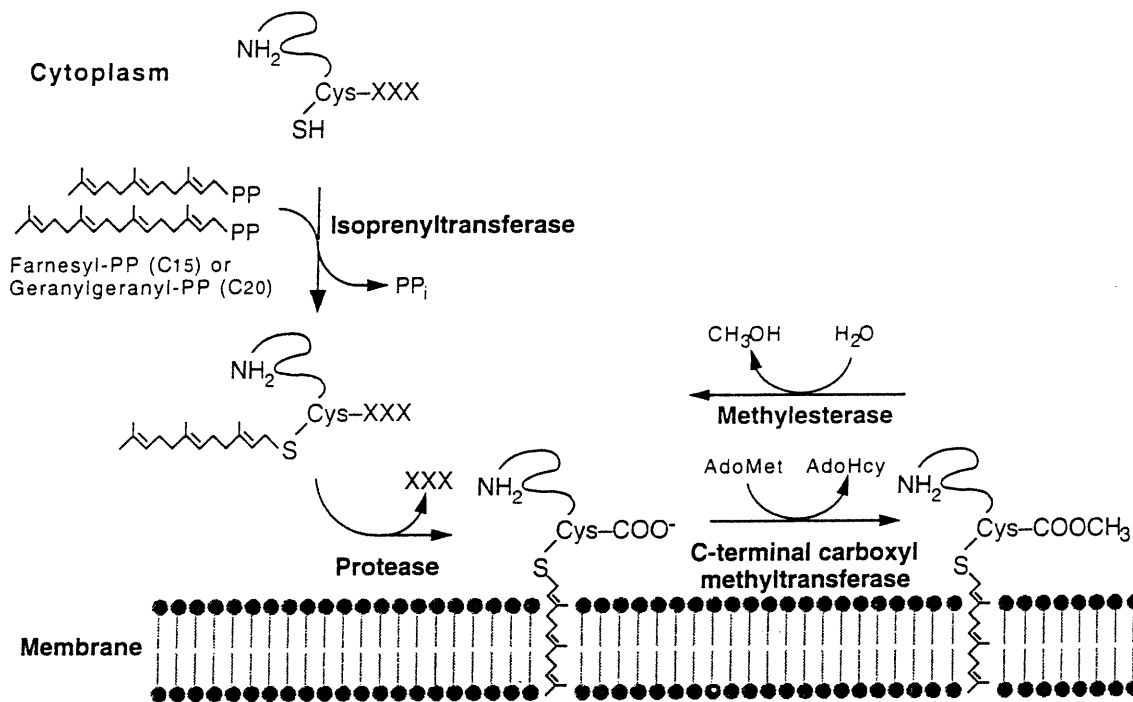
Small GTP-binding proteins form a large family of more than 50 members classified into five subfamilies: Ras, Rho, Rab, Arf, and Ran (Hall 1990; Bourne et al. 1991; Wagner and Williams 1994). Members of the Ras superfamily share many characteristics, including sequence homology and similar molecular weights (20–25 kDa) and the ability to bind guanine nucleotides and hydrolyze GTP (GTPase activity). Their C-terminus is post-translationally modified by prenylation, removal of three amino acid residues, and carboxyl methylation of the cysteine residue. In addition to their common set of structural features, small GTP-binding proteins have distinct cellular functions: Ras-related proteins are involved in cell growth and

proliferation (Lowy and Willumsen 1993), Rho in cell morphology (Hall 1990), Rab and Arf in vesicle transport (Balch 1990), and Ran in protein import into the nucleus (Moore and Blobel 1993).

Rho small GTP-binding proteins

The Rho small GTP-binding protein subfamily is composed of RhoA, RhoB, RhoC, and the related Rac1, Rac2, CDC42 (also named G25K), RhoG, and TC10 (Nobes and Hall 1994). These proteins are structurally similar (40–95% of identity at the amino acid level) and very similar in size (190–195 amino acid residues). RhoA, RhoB, and RhoC are 80% identical with each other, but they differ at the C-terminus (Fig. 1): RhoA and RhoC possess a polybasic domain analogous to K-RasB, whereas RhoB, like N-Ras/Ha-Ras, displays two potential palmitoylation sites. RhoA and CDC42 are widely distributed in mammalian tissues (Olofsson et al. 1988; Polakis et al. 1989), but RhoB is more abundant in the brain (Boivin and Béliveau 1995; Zalzman et al. 1995) and Rac2 is predominantly found in hematopoietic cells (Didsbury et al. 1989). The intracellular localization of RhoA, RhoB, and RhoC has been studied by immunofluorescence in Rat-2 fibroblast cells (Adamson et al. 1992b). A small fraction of RhoA and RhoC is localized in the plasma membrane, but these proteins are found primarily in the cytosol, while RhoB is associated with endosomes and a pre-lysosomal compartment. CDC42 is found in abundance in the cytosol and membranes of many cell types (Evans et al. 1986; Waldo et al. 1987; Polakis et al. 1989; Maltese and Sheridan 1990; Backlund 1992; Gingras and Béliveau 1994; Boivin and Béliveau 1995). Subcellular distribution of Rho proteins has also been studied in rat kidney cortex cells (Boivin and Béliveau 1995). In these polarized cells, RhoA and CDC42 are found in higher amounts in the cytosol than in the total membrane fraction, but these proteins are highly enriched in purified preparations of brush-border (luminal) and basolateral (antiluminal) plasma membranes. Rho proteins are virtually absent from mitochondria and nuclei, with the exception of Rac1, which is detected predominantly in the mitochondria.

Fig. 2. Processing of small GTP-binding proteins containing a CXXX C-terminal motif. PP, pyrophosphate; X, any amino acid; Cys, cysteine; AdoMet, S-adenosylmethionine; AdoHcy, S-adenosylhomocysteine.



Rho and Rac regulate distinct cellular events involving reorganization of the cytoskeleton induced by growth factors: the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in fibroblasts by Rho (Ridley and Hall 1992) and membrane ruffling by Rac (Ridley et al. 1992). In addition to its role in the regulation of actin polymerization, Rac is an essential component of the NADPH oxidase catalyzed superoxide anion production by neutrophils and macrophages (Abo et al. 1991; Knaus et al. 1991). CDC42 is essential for the generation of cell polarity and bud site assembly in yeast cells (Drubin 1991).

Post-translational modifications of Rho-related proteins

Like many other members of the Ras superfamily, Rho proteins possess the C-terminal sequence motif CXXX (where C is a cysteine and X is any amino acid) that acts as a signal for three sequential post-translational modifications (Fig. 2) (Clarke 1992). The nature of the C-terminal residue appears to determine the specificity of the prenylation modification: proteins that end with a leucine residue are geranylgeranylated, while others ending with a serine, alanine, glutamine, or methionine residue are farnesylated. Newly synthesized small GTP-binding proteins, found in the cytosol, are first modified by the addition of a farnesyl (C15) or geranylgeranyl (C20) isoprenyl group to the sulfhydryl group of the cysteine residue. The prenylated protein is then modified by the cleavage of the last three C-terminal amino acid residues, and finally, the α -carboxyl group of the cysteine is methylated. RhoA and RhoC are modified by a geranylgeranyl group and carboxyl methylation, whereas RhoB is modified by either farnesyl or geranylgeranyl groups, and is carboxyl methylated (Adamson et al.

1992a). CDC42 is geranylgeranylated and carboxyl methylated (Yamane et al. 1991). RhoB is the only member of the subfamily that was found to be further modified by palmitoylation. These post-translational modifications are essential for binding to membranes, cellular localization, and for the interaction of Rho, Rac1, and CDC42 with Rho GDP-dissociation inhibitor (RhoGDI) and Rho GDP-dissociation stimulator (RhoGDS) (Takai et al. 1992). They are not required for GTPase activity, but are essential for biological function. *Clostridium botulinum* C3 exotoxin ADP-ribosylates asparagine in position 41 of Rho (A, B, and C), resulting in the inhibition of biological activity. This toxin has provided a powerful tool to study specific cellular functions of Rho proteins since ADP-ribosylation does not occur on CDC42 and only very little on Rac at asparagine 41 (Aktories and Hall 1989; Sekine et al. 1989).

Regulation of Rho protein activity

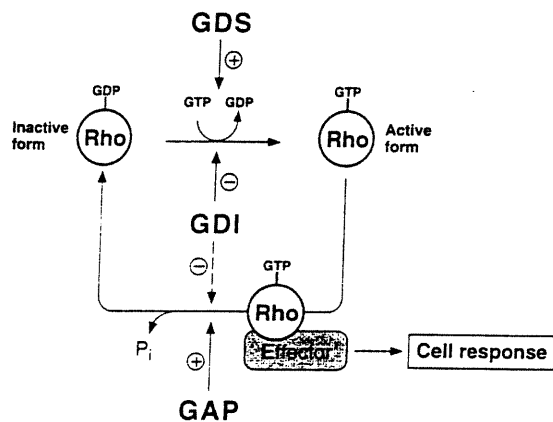
Rho proteins are found in an active form (bound to GTP) and in an inactive form (bound to GDP) (Fig. 3). The interconversion between these two forms is regulated by three kinds of regulatory proteins: GDP-dissociation stimulators (GDSs), GDP-dissociation inhibitors (GDIs), and GTPase-activating proteins (GAPs). Several actual or potential GDSs, GDIs, and GAPs specific for Rho proteins have been identified (Table 1). RhoGDI is found in the cytosol of most cell types, where it forms heterodimers with RhoA, CDC42, or Rac. This regulatory protein inhibits the exchange of GDP for GTP and maintains many Rho proteins in the cytoplasmic compartment as soluble complexes. Two homologues of RhoGDI specifically

Table 1. Regulators of Rho-related small GTP-binding proteins.

Regulatory protein	In vitro specificity	Tissue distribution
GTPase-activating proteins (GAPs)		
p190	Rho > CDC42, Rac	Ubiquitous
RhoGAP	CDC42 > Rho, Rac	Ubiquitous
Bcr	CDC42, Rac	Ubiquitous
Abr	CDC42, Rac	Brain
p122-RhoGAP	Rho (others ?)	Brain, other tissues ?
<i>n</i> - and β -chimaerin	Rac	Brain, testes, respectively
Myr5	Rho, CDC42 > Rac1	Ubiquitous
p85 (subunit of PI 3-kinase)	No RhoGAP activity	Ubiquitous
3BP-1	Rac	Unknown
GDP-dissociation stimulators (GDSs)		
Ost (oncogene)	RhoA, CDC42	Brain, heart
Dbl (oncogene)	RhoA, CDC42, Rac1	Brain, adrenal glands, gonads
Bcr	nd	Ubiquitous
Vav (oncogene)	nd	Hematopoietic cells
RasGRF	nd	Brain
Ect2 (oncogene)	nd	Testes, kidney, spleen, liver
SmgGDS	Rho, Rac, Ki-Ras, Rap	Ubiquitous
FGD1	nd	Ubiquitous
Tiam-1	Rac1, CDC42>RhoA	Brain, testes
Lbc	RhoA	Hematopoietic cells, muscle, heart and lung
GDP-dissociation inhibitors (GDIs)		
RhoGDI	Rho(A, B, C), CDC42, Rac(1, 2)	Ubiquitous
Ly-GDI, D4	RhoA (others ?)	Hematopoietic cells

Note: nd, activity not determined.

Fig. 3. Regulation of Rho small GTP-binding proteins by GDS, GDI, and GAP. GDI, GDP-dissociation inhibitor; GDS, GDP-dissociation stimulator; GAP, GTPase-activating protein.



expressed in hematopoietic cells, Ly-GDI and D4, were simultaneously cloned by two independent groups (Lelias et al. 1993; Scherle et al. 1993). Dbl and Ost, two oncogene products, stimulate nucleotide exchange on various members of the Rho family, whereas SmgGDS is not only an effective stimulator for Rho proteins but also for Rap and Ras (Hiraoka et al. 1992). Other putative GDS proteins have been identified on the basis of a sequence of about 250 amino acids, known as the Dbl homology sequence (DH domain for Dbl homology).

Cellular functions regulated by Rho proteins

Regulation of stress fibers and filopodia and lamellipodia formation

Rho, Rac, and CDC42 regulate distinct cellular events involving the reorganization of the actin cytoskeleton in fibroblasts (Table 2): the assembly of focal adhesions and stress fibers by Rho (Ridley and Hall 1992) and formation of lamellipodia and membrane ruffles by Rac (Ridley et al. 1992) and filopodia by CDC42 (Kozma et al. 1995; Nobes and Hall 1995). Importantly, it was found that these three small GTP-binding proteins are activated in a cascade (Fig. 4): activation of CDC42 leads to the activation of Rac and subsequently to that of Rho (Nobes and Hall 1995). Rac activation leading to lamellipodia formation is stimulated by platelet-derived growth factor (PDGF) and insulin, Rho-mediated formation of stress fibers and focal adhesions is stimulated by lysophosphatidic acid, and CDC42-mediated formation of filopodia is promoted by bradykinin.

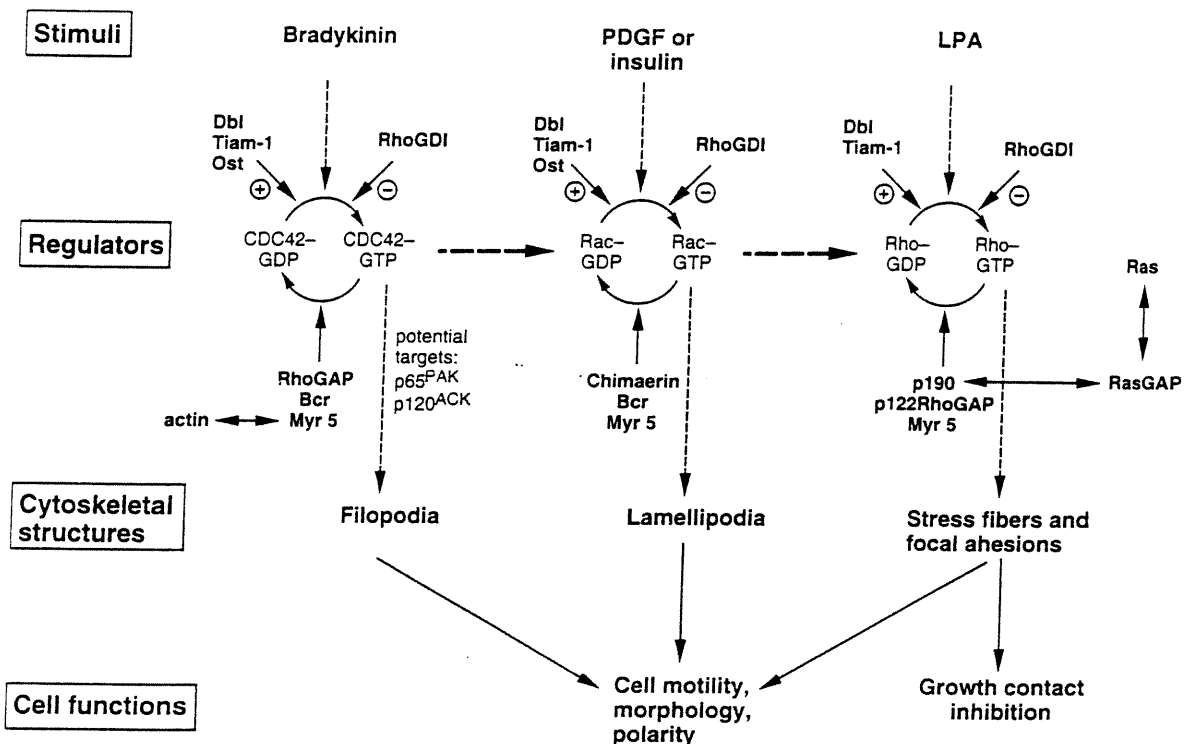
Regulation of enzymes involved in phospholipid metabolism

Rho proteins have been recently shown to regulate the activity of enzymes implicated in the formation of phospholipid signaling molecules. RhoA activates phospholipase D in rat liver plasma membranes (Malcolm et al. 1994). Membrane-associated phospholipase D activity is stimulated by GTP γ S, a non-hydrolyzable analog of GTP. This stimulation is inhibited by coinubation of plasma membranes with RhoGDI, which binds to and extracts the small GTP-binding proteins RhoA

Table 2. Cellular functions of Rho-related proteins.

	Specificity	Stimuli
Stress fiber formation	Rho	Lysophosphatidic acid
Lamellipodia formation	Rac	PDGF, insulin
Filopodia formation	CDC42	Bradykinin
Regulation of phospholipase D	Rho	Unknown
Regulation of PIP 5-kinase	Rho	Unknown
Regulation of myosin-related proteins	Rho, CDC42, Rac	Unknown

Fig. 4. Biochemical pathways involving Rho-related GTP-binding proteins.



and CDC42, but not Rac1, from the membranes. Addition of RhoA to RhoGDI-treated membranes reestablishes the GTP γ S-stimulated activity, whereas CDC42 and Arf have no effect and Rac1 is only partially effective. No precise function has been attributed to phospholipase D, but the product, phosphatidic acid, may serve as a second messenger in a transduction pathway, as is the case for other phospholipase products.

Rho also regulates phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP 5-kinase), an enzyme implicated in the synthesis of the major phospholipase C substrate, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) (Chong et al. 1994). PIP 5-kinase activity is stimulated by GTP γ S, and this effect is abolished by Rho-specific ADP-ribosylation with *C. botulinum* C3 exotoxin. RhoA with GTP γ S stimulates PIP 5-kinase activity, whereas GDP is less effective. Microinjection of C3 exotoxin in C3H 10T^{1/2} cells inhibits the calcium mobilization induced by PDGF or thrombin. Microinjection of a constitutively active

form of RhoA (RhoA^{V14}) increases PDGF-induced calcium mobilization in nonadherent Swiss 3T3 cells. These results clearly show that Rho is involved in the regulation of the synthesis of phosphatidylinositides and strongly suggest that these messenger molecules may mediate the action of Rho proteins on the cytoskeleton.

Cancer and Rho proteins

Involvement of Rho in the cell cycle

The involvement of the Rho proteins in cytoskeletal reorganization induced by growth factors makes them strong candidates to be a link between cell division regulation and cell shape reorganization pathways. Involvement in cell growth control is supported by the identification of RhoB and RhoG as early and late genes induced after the addition of growth factors in fibroblasts (Jahner and Hunter 1991; Vincent et al.

1992). Transient accumulation of RhoB in the S phase of the cell cycle and a vesicular localization in stimulated HeLa and PC12 cell lines suggest a role in the recycling of cytoskeletal components occurring during this phase (Zalcman et al. 1995). Increased transcription of RhoB in NIH3T3 cells is also observed following exposure to ultraviolet light. However, the induction pathway differs from that of growth factors. PKA and PKC mediate the ultraviolet-induced transcription of RhoB, while tyrosine kinase activity is implicated in the other case (Fritz et al. 1995). Cell arrest in the G1 → S transition phase, following injection of *C. botulinum* C3 exotoxin into fibroblasts, also supports the involvement of Rho in cell cycling but does not allow for discrimination between RhoA, RhoB, and RhoC (Yamamoto et al. 1993). Rac2, whose expression is restricted to hematopoietic cells, responds to mitogenic signals by a late and relatively stable increase in its mRNA levels, probably consecutive to interleukin production (Reibel et al. 1991).

Transforming activity of Rho

The oncogenic potential of Rho is still controversial. A constitutively activated mutant of RhoA failed to induce any transformed phenotype in NIH3T3 fibroblasts (Avraham and Weinberg 1989). However, amplification of the Rho gene via cotransfection allowed growth to a higher saturation density, with reduced dependence on serum. Moreover, injection of fibroblasts overexpressing RhoA was tumorigenic in nude mice (Avraham 1990; Perona et al. 1993). Finally, when deprived of serum, these cells underwent apoptosis in a manner similar to that of cells expressing c-myc or p53 (Jiménez et al. 1995).

An activated Rac1^{V12} mutant displayed all the hallmarks of a transformed phenotype, including growth to a higher saturation density, reduced dependence on serum, and ability to grow on soft agar. These Rac1^{V12}-expressing lines were tumorigenic when injected into nude mice. Rac1 appears to act downstream of Ras, since cotransfection with H-Ras^{V12} and the dominant negative Rac1^{N17} resulted in a dose-dependent inhibition of the Ras-induced focus formation. The Rac pathway diverges from the Map kinase pathway at the Ras level, since Rac1^{N17} could not inhibit RafCAAX-induced transformation, while Rac1^{V12} acted synergistically with RafCAAX in focus formation (Qui et al. 1995). The fact that RhoB is required for Ras- but not Raf-induced oncogenic transformation was demonstrated in a similar way (Prendergast et al. 1995).

Rho and Ras pathways are interconnected

A link between Ras and Rho signalling pathways was suspected long ago, from the observation that ras-transformed cells show increased membrane ruffling and motility (Bar-Sagi and Feramisco 1986). One possible connection was suggested by the finding that p190, which has GAP activity toward Rho proteins, can associate with p120 RasGAP, as demonstrated by co-immunoprecipitation (Settleman et al. 1992). Ras and Rac pathways may also be linked to tyrosine kinase receptors via the Grb2 adaptor protein, since growth factor induced membrane ruffling, but not stress fiber formation, was inhibited in the presence of anti-Grb2 antibodies (Matuoka et al. 1993). Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase is another potential mediator of Ras-Rac interactions. Ras was reported to bind and activate PI 3-kinase (Rodriguez-Viciana et al. 1994) and, on the

other hand, the p85 subunit of PI 3-kinase has a RhoGAP homology sequence, even though no RhoGAP activity could be demonstrated. PI 3-kinase may also regulate actin polymerization since a number of actin-binding proteins bind to phosphoinositides in vitro (Stoszel 1993). In addition, Ral may bridge Ras and Rho pathways. Ral is a ubiquitous small GTPase of unknown function, which shares 50% sequence homology with Ras. Its specific guanine nucleotide exchange factor RalGDS associates with activated Ras (Hofer et al. 1994; Spaargaren and Bischoff 1994). Interestingly, a Ral effector named RLIP76 (also called RIP1), with a RhoGAP sequence similarity, showed in vitro GAP activity toward CDC42 and Rac1 (Park and Weinberg 1995; Flores et al. 1995). Nevertheless, the association between RLIP76 and GTP-Ral had no effect on the GTPase activity of Ral and the RhoGAP activity of RLIP76. By analogy with Ras-Raf, it was proposed that Ral may serve to recruit or sequester RLIP76 away from the Rho proteins.

Rho and oncogenes

The finding that several Rho regulatory proteins, mostly guanine nucleotide exchange factors (GEFs), are encoded by potential oncogenes reinforces the hypothesis of Rho involvement in carcinogenesis. The *dbl* oncogene is the prototype. Its oncogenic potential was recognized by transfection of NIH3T3 cells with DNA isolated from a human diffuse B-cell lymphoma (Eva and Aaronson 1985). The link with small GTP-binding proteins came with the demonstration that the *dbl* product catalyzes nucleotide exchange (GDP to GTP) on CDC42, therefore activating it (Hart et al. 1991). A domain of 238 amino acids is essential both for the transforming and GEF activities of Dbl (Hart et al. 1994). This domain, named the Dbl homology domain (DH), is shared by other oncogene products, including Ost (Horie et al. 1994), Lbc (Zheng et al. 1995), Ect2 (Miki et al. 1993), Vav (Katzav et al. 1994), Tiam-1 (Habets et al. 1994), and Bcr (Diekmann et al. 1991). GEF activity toward Rho was demonstrated for Ost, Lbc, and Tiam-1, while Bcr showed a GAP activity. Despite their close association with Rho, Ect2 and Vav failed to stimulate Rho nucleotide exchange. In these later cases, the Rho pathway might still be activated by recruitment of a third component. Those oncogenes may also possess GEF activity toward a still unidentified member of the Rho family. They may also serve to titrate the Rho proteins, allowing switching to other pathways.

Rho and cell adhesion

An important characteristic of transformed cells is their decreased adhesion to the extracellular matrix. This results from a disorganization of focal adhesion complexes whose assembly is under the control of Rho-related proteins (Burrige et al. 1988; Nobes and Hall 1995). Protein tyrosine kinases pp125^{FAK} and pp60^{src} and the tyrosine kinase substrate paxillin are associated with these structures. Extracellular matrix adhesion results in their increased tyrosine phosphorylation provided that the actin cytoskeleton is intact (Burrige et al. 1992; Seckl et al. 1995). A change in their phosphorylation status could therefore account for decreased adhesive properties of cancer cells. In support of this assumption, blockade of focal adhesion was achieved by tyrosine kinase inhibitors (Ridley and Hall 1994; Burrige et al. 1992). Moreover, GTPγS could stimulate tyrosine phosphorylation of both pp125^{FAK} and paxillin, and

Table 3. Physiological roles and pathologies associated with Rho-regulated cytoskeletal organization.

Diffuse B-cell lymphoma	The <i>dbl</i> oncogene product is a GDS for CDC42, Rho and Rac.
Leukemia (Philadelphia translocation)	The <i>Bcr</i> product is a GAP for CDC42 and Rac.
Faciogenital dysplasia	The defective gene, <i>FGD1</i> , encodes a protein with homology to GDS proteins.
T lymphoma invasion and metastasis	The <i>Tiam-1</i> invasion-inducing gene encodes a protein with homology to GDS proteins.
Egg activation	Anti-Rho antibodies block the sperm-induced activation of ascidian eggs.
Bone resorption	Rho-specific C3 exotoxin inhibits cytoskeletal organization in osteoclasts.
T-cell polarization	CDC42 regulates the polarization of T cells toward antigen-presenting cells.

this via a Rho protein, since it was prevented by a pretreatment of the cells with *C. botulinum* C3 exotoxin (Seckl et al. 1995). Thus, Rho appears to be crucial for cell adhesion properties.

Physiological roles and pathologies involving the regulation of cytoskeletal functions by Rho proteins

Blood platelets undergo changes in morphology upon stimulation by agents generated by tissue injury. These morphological changes, involving filopodia and lamellipodia, are physiological events but are also responsible for thromboses associated with pathological states. Rac has recently been shown to be an essential regulator of actin reorganization through the thrombin receptor (Hartwig et al. 1995). Uncapping of F-actin is stimulated by a constitutively active form of Rac (Rac1^{V12}) and by the thrombin receptor activating peptide (TRAP). Rac and TRAP also induce PI(4,5)P₂ synthesis in platelets. These results suggest that production of phosphoinositides is involved in Rac-regulated actin reorganization in platelets.

The involvement of Rho in bone resorption in osteoclasts was demonstrated using the C3 ADP-ribosyltransferase from *C. botulinum* (Zhang et al. 1995). Treatment of osteoclasts with the C3 toxin disrupts the ringed structure of podosomes, composed of F-actin and other cytoskeletal proteins, and inhibits pit formation.

A protein (FGD1) with strong homology with the exchange factors of the Dbl family has been reported as the defective protein in the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome), a rare X-linked developmental disorder that leads to facial, skeletal, and urogenital anomalies (Pasteris et al. 1994). The deduced amino acid sequence reveals additional features such as two potential SH3-binding sites and a cysteine-rich zinc finger-like region. The exact role of the FGD1 protein in this disease remains to be established, but the study of FGD1 may provide important information concerning the roles that Rho proteins and their regulatory proteins play in signal transduction in general and, more specifically, in mammalian development.

Regulation of cell polarization by the small GTP-binding CDC42 was first demonstrated in the budding yeast (Johnson and Pringle 1990). A similar role for CDC42 in mammalian cells was recently demonstrated in T cells (Stowers et al. 1995). By using mutants of CDC42 stably transfected in T cells it was shown that this small GTP-binding protein regulates the polarization of both actin and microtubules toward antigen-presenting cells. This is the first report of a role for a Rho-related protein in the regulation of microtubule reorganization. Other functions regulated by Rho-related proteins in-

clude secretion in mast cells (Price et al. 1995), smooth muscle contraction (Hirata et al. 1992), and cytoplasmic division (Kishi et al. 1993).

Conclusions

Rho proteins are involved in a variety of physiological roles (Table 3). Rho regulates numerous cellular events involved in the maintenance of cell morphology and motility through reorganization of actin filaments. Except for Myr5, a myosin-related protein recently identified as a RhoGAP (Reinhard et al. 1995), direct links between Rho and the cytoskeleton are still missing. However, there is growing evidence that production of phosphoinositides under Rho control may contribute to actin cytoskeleton rearrangements either by direct interaction with actin-binding proteins or by recruitment of protein kinases.

Involvement of Rho in oncogenesis is evidenced by its own transforming potential and by its close connection to Ras. In fact, Rho is essential for Ras-induced transformation. The recent identification of a pathway linking Rho to gene transcription through the c-Jun N-terminal kinase cascade, in synergism with the MAPK cascade activated by Ras, may explain the morphological changes affecting transformed cells (Hill et al. 1995; Coso et al. 1995; Minden et al. 1995). In addition, Rho activity itself is regulated by potential oncogenes. One of them, *Tiam-1*, is an invasion-inducing gene (Habets et al. 1994). Rho may also be implicated in the increased mobility seen in metastasis through its control of the assembly of focal adhesions. Studies on the Rho proteins should lead to a better understanding of the phenomena involved in metastasis. One interesting avenue would be a search for a possible implication of Rho in angiogenesis. Some growth factors are known to be strong inducers of blood vessel proliferation. Since Rho proteins can be activated by growth factors (Ridley 1994) and since some receptors are physically associated with the actin cytoskeleton (van Bergen en Henegouwen et al. 1992), Rho proteins could be a potential target for the design of drugs to reduce tumor-associated angiogenesis.

References

- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C.G., and Segal, A.W. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature (London)*, **353**: 668-670.
- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A., and Tilbrook, P.A. 1992a. Post-translational modification of p21rho proteins. *J. Biol. Chem.* **267**: 20 033 - 20 038.
- Adamson, P., Paterson, H.F., and Hall, A. 1992b. Intracellular localization of the p21rho proteins. *J. Cell Biol.* **119**: 617-627.
- Aktories, K., and Hall, A. 1989. Botulinum ADP-ribosyltransferase

- C3: a new tool to study low molecular weight GTP-binding proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**: 415–418.
- Avraham, H. 1990. Rho gene amplification and malignant transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 114–124.
- Avraham, H., and Weinberg, R.A. 1989. Characterization and expression of the human rhoH12 gene product. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2058–2066.
- Backlund, P.S., Jr. 1992. GTP-stimulated carboxyl methylation of a soluble form of the GTP-binding protein G25K in brain. *J. Biol. Chem.* **267**: 18 432 – 18 439.
- Balch, W.E. 1990. Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 473–477.
- Bar-Sagi, D., and Feramisco, J.R. 1986. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science (Washington, D.C.)*, **233**: 1061–1068.
- Boivin, D., and Béliveau, R. 1995. Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *Am. J. Physiol.* **269**: F180–F189.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature (London)*, **349**: 117–127.
- Bretscher, A. 1991. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**: 337–374.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 487–525.
- Burridge, K., Turner, C.E., and Romer, L.H. 1992. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* **119**: 893–903.
- Carraway, K.L., and Carraway, C.A.C. 1989. Membrane-cytoskeleton interactions in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **988**: 147–171.
- Chong, L.D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G.M., and Schwartz, M.A. 1994. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell*, **79**: 507–513.
- Clarke, S. 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 355–386.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.-C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J.S. 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, **81**: 1137–1146.
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., and Snyderman, R. 1989. *rac*, a novel *ras*-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* **264**: 16 378 – 16 382.
- Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L., and Hall, A. 1991. *Bcr* encodes a GTPase-activating protein for p21^{rac}. *Nature (London)*, **351**: 400–402.
- Drubin, D.G. 1991. Development of cell polarity in budding yeast. *Cell*, **65**: 1093–1096.
- Eva, A., and Aaronson, S.A. 1985. Isolation of a new oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature (London)*, **316**: 273–275.
- Evans, T., Brown, M.L., Fraser, E.D., and Northup, J.K. 1986. Purification of the major GTP-binding proteins from human placental membranes. *J. Biol. Chem.* **261**: 7052–7059.
- Flores, V.J., Dorseuil, O., Romero, F., Letourneur, F., Saragosti, S., Berger, R., Tavitian, A., Gacon, G., and Camonis, J.H. 1995. Bridging Ral GTPase to Rho pathways. *J. Biol. Chem.* **270**: 22 473 – 22 477.
- Fritz, G., Kaina, B., and Aktories, K. 1995. The Ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J. Biol. Chem.* **270**: 25 172 – 25 177.
- Geiger, B., and Ginsberg, D. 1991. The cytoplasmic domain of adherens-type junctions. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **20**: 1–6.
- Gingras, D., and Béliveau, R. 1994. Cytosolic proteins of 21–23 kDa are methylated by kidney cortex membrane-associated C-terminal carboxyl methyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1204**: 149–156.
- Habets, G.G.M., Scholtes, E.H.M., Zuydgeest, D., van der Kammen, R.A., Stam, J.C., Berns, A., and Collard, J.G. 1994. Identification of an invasion-inducing gene, *Tiam-1*, that encodes a protein with homology to GDP–GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*, **77**: 537–549.
- Hall, A. 1990. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science (Washington, D.C.)*, **249**: 635–640.
- Hall, A. 1994. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**: 31–54.
- Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A., and Cerione, R.A. 1991. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the *dbl* oncogene product. *Nature (London)*, **354**: 311–314.
- Hart, M.J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S.A., Evans, T., Cerione, R.A., and Zheng, Y. 1994. Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the *dbl* oncogene product. *J. Biol. Chem.* **269**: 62–65.
- Hartwig, J.H., Bokoch, G.M., Carpenter, C.L., Janmey, P.A., Taylor, L.A., Toker, A., and Stossel, T.P. 1995. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncouple actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*, **82**: 643–653.
- Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, **81**: 1159–1170.
- Hiraoka, K., Kaiduchi, K., Ando, S., Musha, T., Takaishi, K., Mizuno, T., Asada, M., Ménard, L., Tomhave, E., Didsbury, J., Snyderman, R., and Takai, Y. 1992. Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, smg GDS and rho GDI, are active on multiple GTP-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 921–930.
- Hirata, K., Kikuchi, A., Sasaki, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Matsuura, Y., Seki, H., Saida, K., and Takai, Y. 1992. Involvement of rho p21 in the GTP enhancement of calcium sensitivity in smooth muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **267**: 8719–8722.
- Hofer, F., Fields, S., Schneider, C., and Martin, G.S. 1994. Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 11 089 – 11 093.
- Horii, Y., Beeler, J.F., Sakaguchi, K., Tachibana, M., and Miki, T. 1994. A novel oncogene, *ost*, encodes a guanine nucleotide exchange factor that potentially links Rho and Rac signaling pathways. *EMBO J.* **13**: 4776–4786.
- Jahner, D., and Hunter, T. 1991. The *ras*-related gene *rhoB* is an immediate-early gene inducible by v-fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3682–3690.
- Jiménez, B., Arends, M., Esteve, P., Perona, R., Sanchez, R., Ramon y Cajal, S., Wyllie, A., and Lacal, J.C. 1995. Induction of apoptosis in NIH 3T3 cells after serum deprivation by overexpression of *rho-p21*, a GTPase protein of the *ras* superfamily. *Oncogene*, **10**: 811–816.
- Johnson, D.I., and Pringle, J.R. 1990. Molecular characterization of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J. Cell Biol.* **111**: 143–152.
- Katzav, S., Sutherland, M., Packham, G., Yi, T., and Weiss, A. 1994. The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J. Biol. Chem.* **269**: 32 579 – 32 585.
- Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh, T., and Takai, Y. 1993. Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI). *J. Cell Biol.* **120**: 1187–1195.
- Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, T., Curnutte, J.T., and Bokoch, G.M. 1991. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac2. *Science (Washington, D.C.)*, **254**: 1512–1515.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. 1995. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral

- actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1942–1952.
- Lafont, F., Burkhardt, J.K., and Simons, K. 1994. Involvement of microtubule motors in basolateral and apical transport in kidney cells. *Nature (London)*, **372**: 801–803.
- Lelias, J.-M., Adra, C.N., Wulf, G.M., Guillemot, J.-C., Khagad, M., Caput, D., and Lim, B. 1993. cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 1479–1483.
- Lowy, D.R., and Willumsen, B.M. 1993. Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 851–891.
- Malcolm, K.C., Ross, A.H., Qiu, R.-G., Symons, M., and Exton, J.H. 1994. Activation of rat liver phospholipase D by the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **269**: 25 951 – 25 954.
- Maltese, W.A., and Sheridan, K.M. 1990. Isoprenoid modification of G25K (Gp), a low molecular mass GTP-binding protein distinct from p21^{ras}. *J. Biol. Chem.* **265**: 17 883 – 17 890.
- Matuoka, K., Shibasaki, F., Shibata, M., and Takenawa, T. 1993. Ash/Grb-2, a SH2/SH3-containing protein, couples to signalling for mitogenesis and cytoskeletal reorganization by EGF and PDGF. *EMBO J.* **12**: 3467–3473.
- Miki, T., Smith, C.L., Long, J.E., Eva, A., and Fleming, T.P. 1993. Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature (London)*, **362**: 462–465.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A., and Karin, M. 1995. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, **81**: 1147–1157.
- Moore, M.S., and Blobel, G. 1993. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature (London)*, **365**: 661–663.
- Nobes, C., and Hall, A. 1994. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 77–81.
- Nobes, C.D., and Hall, A. 1995. Rho, Rac, and CDC42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**: 53–62.
- Olofsson, B., Chardin, P., Touchot, N., Zahraoui, A., and Tavitan, A. 1988. Expression of the ras-related ral1A, rho12 and rab genes in adult mouse tissues. *Oncogene*, **3**: 231–234.
- Park, S.H., and Weinberg, R.A. 1995. A putative effector of Ral has homology to Rho/Rac GTPase activating proteins. *Oncogene*, **11**: 2349–2355.
- Pasteris, N.G., Cadle, A., Logie, L.J., Porteous, M.E.M., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Glover, T.W., Wilroy, R.S., and Gorski, J.L. 1994. Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell*, **79**: 669–678.
- Perona, R., Esteve, P., Jimenez, B., Ballester, R.P., Ramon y Cajal, S., and Lacal, J.C. 1993. Tumorigenic activity of *rho* genes from *Aplysia californica*. *Oncogene*, **8**: 1285–1292.
- Polakis, P.G., Snyderman, R., and Evans, T. 1989. Characterization of G25K, a GTP-binding protein containing a novel putative nucleotide binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**: 25–32.
- Prendergast, G.C., Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Kurzawa, H., Lebowitz, P.F., and Der, C.J. 1995. Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*, **10**: 2289–2296.
- Price, L.S., Norman, J.C., Ridley, A.J., and Koffer, A. 1995. The small GTPases Rac and Rho as regulators of secretion in mast cells. *Curr. Biol.* **5**: 68–73.
- Qui, R.G., Chen, J., Kim, D., McCormick, F., and Symons, M. 1995. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature (London)*, **374**: 457–459.
- Reibel, L., Dorseuil, O., Stancou, R., Bertoglio, J., and Gacon, G. 1991. A hemopoietic specific gene encoding a small GTP binding protein is overexpressed during T-cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**: 451–458.
- Reinhard, J., Scheel, A.A., Diekmann, D., Hall, A., Ruppert, C., Bahler, M. 1995. A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *EMBO J.* **14**: 697s–704s.
- Ridley, A.J. 1994. Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho. *J. Cell Sci. Suppl.* **18**: 127–131.
- Ridley, A.J., and Hall, A. 1992. The small GTP-binding rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors. *Cell*, **70**: 389–399.
- Ridley, A.J., and Hall, A. 1994. Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO J.* **13**: 2600–2610.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. 1992. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**: 401–410.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., and Downward, J. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature (London)*, **370**: 527–532.
- Scherle, P., Behrens, T., and Staudt, L.M. 1993. Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 7568–7572.
- Seckl, M.J., Morii, N., Narumiya, S., and Rozengurt, E. 1995. Guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate stimulates tyrosine phosphorylation of p125^{FAK} and paxillin in permeabilized Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 6985–6990.
- Sekine, A., Fujiwara, M., and Narumiya, S. 1989. Asparagine residue in the *rho* gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**: 8602–8605.
- Settleman, J., Albright, C.F., Foster, L.C., and Weinberg, R.A. 1992. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature (London)*, **359**: 153–154.
- Spaargaren, M., and Bischoff, J.R. 1994. Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras and Rap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 12 609 – 12 613.
- Stossel, T.P. 1993. On the crawling of animal cells. *Science (Washington, D.C.)*, **260**: 1086–1094.
- Stowers, L., Yelon, D., Berg, L.J., and Chant, J. 1995. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 5027–5031.
- Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., and Kawata, M. 1992. Small GTP-binding proteins. *Int. Rev. Cytol.* **133**: 187–230.
- van Bergen en Henegouwen, P.M.P., den Hartigh, J.C., Romeyn, P., Verkleij, A.J., and Boonstra, J. 1992. The epidermal growth factor receptor is associated with actin filaments. *Exp. Cell Res.* **199**: 90–97.
- Vincent, S., Jeanteur, P., and Fort, P. 1992. Growth-regulated expression of *rhoG*, a new member of the *ras* homolog gene family. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3138–3148.
- Wagner, A.C.C., and Williams, J.A. 1994. Low molecular weight GTP-binding proteins. Molecular switches regulating diverse cellular functions. *Am. J. Physiol.* **266**: G1–G14.
- Waldo, G.L., Evans, T., Fraser, E.D., Northup, J.K., Martin, M.W., and Harden, T.K. 1987. Identification and purification from bovine brain of a guanine-nucleotide-binding protein distinct from G_s, G_i and G_o. *Biochem. J.* **246**: 431–439.
- Yamamoto, M., Marui, N., Sakai, T., Morii, N., Kozaki, S., Ikai, K., Imamura, S., and Narumiya, S. 1993. ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene*, **8**: 1449–1455.
- Yamane, H.K., Farnsworth, C.C., Xie, H., Evans, T., Howald, W.N., Gelb, M.H., Glomset, J.A., Clarke, S., and Fung, B.K.-K. 1991. Membrane-binding domain of the small G protein G25K contains

- an *S*-(all-*trans*-geranylgeranyl)cysteine methyl ester at its carboxyl terminus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**: 286-290.
- Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honoré, N., Tavitian, A., and Olofsson, B. 1995. Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene*, **10**: 1935-1945.
- Zhang, D., Udagawa, N., Nakamura, I., Murakami, H., Saito, S., Yamasaki, K., Shibasaki, Y., Morii, N., Narumiya, S., Takabashi, N., and Suda, T. 1995. The small GTP-binding protein, *rho* p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J. Cell Sci.* **108**: 2285-2292.
- Zheng, Y., Olson, M.F., Hall, A., Cerione, R.A., and Toksoz, D. 1995. Direct involvement of the small GTP-binding protein Rho in *lbc* oncogene function. *J. Biol. Chem.* **270**: 9031-9034.

2.2 Regulation of Rho protein binding to membranes by rhoGDI: inhibition of releasing activity under physiological ionic conditions

Diane Bilodeau, Sylvie Lamy, Richard R. Desrosiers, Denis
Gingras and Richard Béliveau*

Laboratoire d'oncologie moléculaire, Département de chimie-biochimie,
Université du Québec à Montréal et Centre d'oncologie Charles Bruneau,
Hôpital Sainte-Justine, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Canada,
H3C 3P8

*To whom correspondence should be addressed

Tel: (514) 987-3000 ext. 8551

Fax: (514) 987-0246

E-mail: oncomol@er.uqam.ca

OBJECTIFS

La mobilité des protéines RhoA et Cdc42 entre fractions soluble et membranaire est un facteur important pour le contrôle de leur activité. Des travaux antérieurs réalisés par divers laboratoires ont montré que la protéine rhoGDI a la capacité d'extraire RhoA et Cdc42 des membranes cellulaires *in vitro*. Cependant, on connaît peu les mécanismes moléculaires régissant le cycle de localisation des protéines Rho. Nous avons donc mis au point un essai de solubilisation des protéines RhoA et Cdc42 de la membrane à bordure en brosse rénale par la protéine de fusion GST-GDI dans le but de caractériser de manière systématique les facteurs influençant leur extraction. Nos résultats ont mis en évidence une inhibition de l'activité de solubilisation de rhoGDI envers RhoA et Cdc42 en présence de concentrations physiologiques de sel, suggérant que l'activité de rhoGDI est étroitement régulée.

SUMMARY

The Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) is an ubiquitously expressed regulatory protein involved in the cycling of Rho proteins between membrane-bound and soluble forms. Here, we characterized the Rho solubilization activity of a GST-GDI fusion protein in a cell-free system derived from rat kidney. Addition of GST-GDI to kidney brush border membranes resulted in the specific release of Cdc42 and RhoA from the membranes, while RhoB and Ras were not extracted. The extraction of Cdc42 and RhoA by GST-GDI was dose-dependent and saturable; about 50% of both RhoA and Cdc42 were extracted from brush border membranes whereas the remaining proteins were tightly bound and could not be solubilized by repeated GST-GDI treatment. This result demonstrated that kidney brush border membranes contained two populations of RhoA and Cdc42. Furthermore, the GST-GDI solubilizing activity on membrane-bound Cdc42 and RhoA was found to be extremely sensitive to KCl concentrations and was completely abolished at physiological conditions of salt and temperature. This inhibitory effect of ionic strength on GST-GDI releasing activity was observed with all tissues examined, suggesting that the shuttling activity of GDI upon Rho proteins is normally downregulated under physiological conditions. When using bead-immobilized GST-GDI, KCl did not reduced the binding of Rho proteins. However, washing brush border membranes with KCl prior treatment by GST-GDI inhibited the extraction of Rho proteins. Taken together, these results suggest that the binding of GDI to membrane-bound Cdc42 and RhoA occurs easily under physiological ionic strength conditions but that a complementary factor is required in order to extract these proteins from membranes.

Key words: rhoGDI, rho proteins, ionic strength, kidney

INTRODUCTION

The mammalian Rho family of small GTP binding proteins is composed of RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoH/TTF, Rac1, Rac2, RhoG, TC10 and Cdc42 (Foster et al. 1996; Murphy et al. 1996; Hall 1998). Rho proteins are ubiquitously expressed. First recognized as key regulators of the cytoskeletal organization (Boivin et al 1996; Gutkind and Vitale-Cross 1996), Rho proteins were then implicated in tumor formation and metastasis (Yoshioka et al. 1998) and are now known to participate in the control of cell cycle progression (Olson et al 1995; Molnar et al. 1997) and gene activation (Vojtek and Cooper 1995; Denhardt 1996; Kyriakis and Avruch 1996; Perona et al. 1997)

Aside from RhoE, which is permanently activated (Foster et al. 1996), the Rho proteins cycle between a GDP-bound inactive and a GTP-bound active form. Interconversion between the GDP and GTP-bound forms is controlled by three classes of regulatory proteins. The GDP-dissociation stimulators (GDS) catalyze the exchange of GDP for GTP. The GTPase-activating proteins (GAPs) activate the rate of GTP hydrolysis on Rho proteins while the GDP dissociation inhibitors (GDI) inhibit nucleotide exchange.

A plethora of GAPs and GDSs have been identified, some of which are specific for one member of the Rho family while others exhibit multiple specificities (Boivin et al 1996; Cerione and Zheng 1996). Similarly, more than 15 effectors of Rho proteins were identified over the past two years (Narumiya 1996). But surprisingly, only three RhoGDIs have been identified

so far. GDI (GDI-1) was first isolated as a ubiquitous cytosolic protein with an apparent molecular mass of 27-28 kDa (Fukumoto et al 1990; Leonard et al. 1992) although the gene encodes for a protein of 23 kDa. GDI-1 is capable of acting upon RhoA, Cdc42, Rac1 and Rac2. Then a homologous cDNA was cloned by subtractive hybridization and the corresponding protein was named GDI/D4 (Lelias et al. 1993). The cytosolic GDI/D4 (Ly-GDI, GDI-2) acts upon the same Rho substrates as GDI, but its expression is restricted to hematopoietic cells (Lelias et al. 1993; Scherle et al. 1993). A third membrane-bound GDI named GDI_γ (GDI-3) was recently identified and is prominently expressed in human brain and pancreas where it binds to RhoA and Cdc42 (Adra et al. 1997). A murine equivalent was also described which binds RhoB and RhoG (Zalcman et al. 1996). The wide distribution of GDI-1, compared to GDI-2 and GDI-3, points to this protein as a major regulator of the multiple functions of Rho proteins.

Rho proteins are assumed to cycle between particulate and cytosolic compartments, the movement largely relying on the presence of GDI (Narumiya 1996). According to the current model, the GDP-bound form of Rho proteins is maintained as an inactive cytosolic 1:1 complex with GDI. Upon activation, GDS stimulates the dissociation of GDP from Rho proteins, allowing loading of GTP and translocation to the membrane where Rho interacts with specific effectors. GAPs catalyze GTP hydrolysis, which is followed by uncoupling from the effector. The inactivated Rho is finally extracted from the membrane by GDI and again retained in a GDI-complex until further recruitment through another cycle of membrane attachment. This model makes GDI a key component of Rho protein regulation by controlling

their cellular localization, but little is known about the molecular mechanisms responsible for the delivery and the extraction of Rho proteins at specific activated sites in cell membranes.

Because of the marked polarization of its epithelium, the kidney represents an excellent model for studying the cycling regulation of Rho proteins. Previous reports from our laboratory have shown that RhoA and Cdc42 are distributed in both the particulate and soluble fractions, in association with GDI in the latter case (Gingras et al. 1993; Gingras and Béliveau 1994; Boivin and Béliveau 1995). When co-incubated with rat kidney brush border membranes (BBM) both cytosolic Cdc42 and RhoA translocate to membranes (Gingras and Béliveau 1994; Boivin and Béliveau 1995). In the present paper, we used this cell free system derived from kidney as a model to characterize different biochemical and physical factors regulating the ability of GDI to dissociate membrane-bound Rho proteins.

Materials and Methods

Materials

Male Sprague-Dawley rats (150-300 g) were obtained from Charles River (St-Constant, Quebec.). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, Ontario). Polyclonal antibodies were raised against amino acid residues 166-182 of Cdc42 and against residues 119-132 of RhoB, while monoclonal antibodies were raised against residues 119-132 of RhoA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The monoclonal pan-Ras antibody was from Oncogene Science (Uniondale, NY). Donkey anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibodies and enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit were from Amersham (Oakville, Ontario).

Methods

Isolation of crude membranes from tissues

Rats were anaesthetized with CO₂ then killed by decapitation and the tissues were washed with an ice-cold 0.15 M NaCl solution. Tissues were minced in 250 mM sucrose/ 5mM Hepes/ Tris, pH 7.5, and homogenized with a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments). The crude homogenates were centrifuged at 3 000 g for 10 min at 4°C to remove unbroken cells and nuclei. The resulting supernatants were centrifuged at 100 000 g for 1 h to obtain soluble and crude membrane fractions. Protein concentrations were determined (Bradford 1976) with bovine serum albumin as the standard.

Isolation of brush border membranes from rat kidney cortex

Brush-border membranes were purified from rat kidney cortex by a Mg^{2+} -precipitation method (Booth and Kenny 1974) with minor modifications (Gingras et al. 1993). The purity of the membrane preparations was determined by measuring alkaline phosphatase specific activity which showed a 10-12-fold enrichment over that of cortex homogenate.

Expression of recombinant GDI in Escherichia coli

Expression of GST-GDI, GST-GDI-C Δ 8, GST-Cdc42 and GST-RhoA fusion proteins using a recombinant pGEX-2T vector in transformed *Escherichia coli* (*E. coli*) was carried out as described elsewhere (Self and Hall 1995). Fusion proteins were isolated by affinity purification on glutathione-Sepharose beads (Pharmacia, Montreal, Quebec). The purity and identity of the fusion proteins were assessed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting. Protein concentration was measured as described above.

Assay for membrane release of Rho small G proteins

Brush border or crude membranes (20 μ g of protein) containing endogenous Rho proteins were incubated with 500 ng GST-GDI (0.36 μ M) for 1 h at 37°C in 20 mM Hepes/Tris buffer pH 7.2 in a final volume of 30 μ L. The reaction was stopped on ice and the mixture immediately centrifuged at 40 000 X *g* for 30 min at 4°C in an Avanti centrifuge (Beckman). Both supernatants and pellets were solubilized in Laemmli sample buffer.

Gel electrophoresis and Western blotting

SDS-PAGE was performed according to Laemmli [28] with a Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad). Proteins in Laemmli's sample buffer were heated at

85°C for 2 min before loading onto 1.5 mm-thick, 12.5 % polyacrylamide gels. Proteins were electroblotted onto 0.45 µm pore diameter polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P; Millipore) in transfer buffer (96 mM glycine, 10 mM Tris and 10% methanol) at 80 mA per gel for 1.7 h. The blots were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.5) containing 0.1 % (v/v) Tween 20 and 5 % non-fat dry milk (Carnation). Blots were incubated with a 1:1 000 dilution of anti-Cdc42 or anti-RhoA antibodies in TBS containing 0.1 % Tween 20, 3 % BSA and 0.01 % NaN₃ for 1 h at room temperature, followed by intensive washes in TBS-Tween and a 1 h incubation in blocking buffer with a 1:2000 dilution of donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase. Immunoreactive bands were revealed by exposing blots treated with ECL reagents to Fuji films.

RESULTS

Quantification of endogenous Rho and GDI proteins in rat kidney brush border membranes and cytosol.

Using purified recombinant proteins from *E. coli* as standards, we used immunoblotting to quantify the amounts of Cdc42, RhoA and GDI present in the luminal membranes and cytosolic fraction of rat kidney cortex. As shown in Table I, Cdc42 and RhoA were similarly distributed between the particulate and soluble fractions. In both membranes and cytosol, the amount of RhoA was slightly higher than that of Cdc42 (Table I). As expected, GDI expression was restricted to the soluble fraction. Since Rho proteins (21 kDa) and GDI (23 kDa) have similar molecular weights, comparison of their relative amounts reflects their molecular ratio. Thus, the amount of GDI was found to be about half that of the combined cytosolic Cdc42 and RhoA (Table I). This suggests that not all cytosolic Rho proteins are complexed with GDI in rat kidney.

Biochemical characterization of the solubilization activity of GDI on Rho proteins bound to brush border membranes

A recombinant GST-GDI protein purified from transformed *E. coli* was tested for its ability to release endogenous small G proteins from kidney brush border membranes. Significant quantities of Cdc42 and RhoA were readily extracted while GST-GDI showed no release activity for RhoB or Ras (Fig. 1). These results show that the membrane dissociation activity of GDI in kidney is restricted to specific members of the Rho family. This solubilization activity was dependent on the GDI portion of the fusion GST-GDI protein, since GST alone was unable to release Cdc42 or RhoA from BBM (Fig. 1). Furthermore,

a truncated version of GST-GDI, lacking the 8 C-terminal amino acids (GST-GDI-C Δ 8), was also ineffective (Fig. 1). The C-terminal truncation of GST-GDI-C Δ 8 was previously described as inhibitory to GDI functions (Plakto et al. 1995). Given its selectivity and efficacy with Cdc42 and RhoA, the recombinant GST-GDI was subsequently used to characterize the release activity of GDI on membrane-bound Rho proteins.

We next determined the amount of GST-GDI required for maximal release of endogenous Rho proteins from BBM. Based on the results shown in Table I, we assumed that 238 ng of Cdc42 and RhoA proteins were present in our assay (20 μ g of BBM). We calculated that, on a molar basis, a stoichiometric extraction of these proteins would require about 500 ng of GST-GDI. Experimentally, however, only 50 % of the total RhoA and Cdc42 could be extracted by this amount of GST-GDI (Fig. 2). The presence of an unextractable pool of Rho proteins in BBM was confirmed by the failure to release additional Rho proteins following multiple extractions with GST-GDI (Fig. 3). These results suggest the coexistence of two different populations of Rho proteins in BBM, only one of which is sensitive to the action of GST-GDI. Based on these results, a saturating amount of 500 ng (0.36 μ M) of GST-GDI was employed in subsequent assays in the presence of 20 μ g of BBM. Conversely, when varying the amount of BBM added to a constant amount of GST-GDI (500 ng), the extraction of Rho proteins was saturated at 20 μ g of BBM (unpublished data).

Effect of ionic strength on the ability of GDI to dissociate membrane-bound Rho proteins

To analyze the effect of ionic strength on the release of BBM-bound Rho proteins by GST-GDI, membranes were incubated with various concentrations of KCl. Interestingly, the solubilization activity of GST-GDI upon RhoA and Cdc42 was inhibited by increasing concentrations of KCl (Fig. 4). This inhibition was completed at 30-50 mM KCl when using a 60 min incubation at 37°C. A similar inhibition of the dissociation activity of GST-GDI was observed when BBM were incubated with NaCl or KNO₃ (unpublished data). These results indicate that the inhibition of GST-GDI activity is not due to a particular type of anion or cation, but arises from increasing ionic strength. These results further suggest that electrostatic bonds are involved in the interaction of GDI with Rho proteins.

We subsequently investigated the tissue distribution of this inhibitory effect of ionic strength on the release activity of membrane-bound Rho proteins by GDI. Aside from intestine, in which no Rho proteins could be detected likely due to their proteolysis by intestinal proteases, incubation of GST-GDI with crude membrane preparations from various tissues resulted in the release of Cdc42 and RhoA in the absence of KCl (Fig. 5). However, the extent of Rho protein solubilization by GST-GDI varied among the tissues tested. Interestingly, addition of KCl to the incubation medium strongly reduced the release of Rho proteins from all tissues (Fig. 5). The fact that KCl inhibits the membrane dissociation of Rho proteins in all tissues examined suggests that this GDI function is generally downregulated under physiological conditions.

We also determined the effect of temperature on GST-GDI mediated Rho protein release from BBM in the absence and presence of KCl. In the absence of salt, GST-GDI released BBM-bound Cdc42 with a similar yield for temperatures ranging from 20°C to 40°C, but the effect was abolished at 45°C (Fig. 6). The ability of GST-GDI to efficiently dissociate RhoA from BBM occurred over a narrower temperature interval than that seen with Cdc42, i.e. between 30°C and 40°C (Fig. 6). In the presence of KCl, at temperatures higher than 20°C, the proportion of Cdc42 and RhoA released by GST-GDI gradually decreased until complete inhibition occurred at 37°C. Thus, the inhibitory effect of ionic strength on membrane dissociation of Rho proteins by GST-GDI is clearly temperature-dependent and is fully active at 37°C.

We next compared the time-course of Rho protein release from BBM by GST-GDI in the absence and presence of KCl. The release of both Cdc42 and RhoA reached a plateau (over 50 %) after a 10 min incubation at 37°C in the absence of salt (Fig. 7A and B). In the presence of KCl, a major dissociation of Cdc42 and RhoA was also observed after 10 min incubation with GST-GDI, but the proportion of released Cdc42 and RhoA proteins was significantly lower than that observed without KCl (Fig. 7A and B). The amount of Cdc42 and RhoA released from BBM then decreased gradually with time, being undetectable beyond 30 min of incubation. In fact, the presence of salt appears to promote the degradation of Cdc42 and RhoA in both particulate and supernatants fractions. Therefore, the apparent ability of KCl to totally inhibit the dissociation of Rho proteins by GST-GDI from BBM represents the combined effects of the intrinsic inhibition of GST-GDI activity at an elevated ionic strength as seen for a 10 min incubation and in addition

for a longer period of time of a gradual proteolysis of released Rho proteins by BBM proteases.

In an effort to discern what is due to an inhibition by the ionic strength of GDI-mediated membrane extraction versus what is dependent on degradation of Rho proteins upon KCl treatments, inhibitors of the four classes of proteases were tested for their ability to preserve Cdc42 and RhoA integrity during releasing assays. Protection of Cdc42 and RhoA, as reflected by increased immunodetection of both small G proteins in the supernatants, was observed in the presence of YVAD-CHO, captopril and to a lesser extent E-64 and aprotinin while pepstatin had none protective effect (Fig. 8A and B). This suggests that released Cdc42 and RhoA are sensitive to some cysteine, serine and metalloprotease activities in kidney BBM. The cysteine modifier NEM inhibited the release of Cdc42 and RhoA in the absence of KCl (Fig. 8A and B), suggesting that modification of some cysteine residues on Rho proteins might interfere with their extraction by GST-GDI. Inhibition of Cdc42 and RhoA release by GST-GDI in the presence of EDTA is most likely due to chelation of Mg^{2+} ions which are known to facilitate interactions of small G proteins with GDI (41).

The ability of the most potent inhibitor, YVAD-CHO which is known to inhibit certain caspases, to protect Cdc42 and RhoA from proteolysis was further assessed by incubating BBM in the presence of GST-GDI and KCl under the conditions settled for the releasing assay except that kidney membranes were probed without prior separation into particulate and supernatant fractions allowing for a more accurate estimation of the proteolytic

event. The peptide YVAD-CHO fully preserved Cdc42 and RhoA integrity (Fig. 8C and D) at physiological ionic strength which condition totally blocked their release by GST-GDI even in the presence of this protease inhibitor (Fig. 8A and B). Thus, these results obtained with YVAD-CHO clearly establish that inhibition of the GDI extraction activity upon Cdc42 and RhoA occurs under physiological ionic strength conditions.

Effect of KCl pre-treatment of membranes on the subsequent release of Rho proteins by GST-GDI

In order to obtain some insights on the mechanism involved in ionic strength inhibition of Rho protein release by GST-GDI, we first verified whether the inhibitory effect of ionic strength on GDI activity was primarily due to a perturbation of the binding of GDI to Rho. In affinity precipitation experiments using bead-immobilized GST-GDI, KCl did not affect the binding of Cdc42 or RhoA solubilized from BBM with 1% (w/v) Chaps (unpublished data) in agreement with a previous report (Adra et al. 1997). Next, we tested whether physiological ionic strength was promoting the loss of some factor or interaction essential to GDI activity. Kidney BBM were pre-washed with 150 mM KCl, centrifuged and the pelleted membranes were washed once with buffer to remove salts prior to incubation with GST-GDI. In contrast to both untreated BBM and to BBM pre-washed with buffer alone (Fig. 9A and B, lanes 1 and 2), kidney BBM pre-washed with 150 mM KCl showed no Cdc42 release by GST-GDI (Fig. 9A, lane 3) and the release of RhoA was also significantly reduced (Fig. 9B, lane 3). Together, these results suggest that GST-GDI interacts in a first step with BBM-bound Rho proteins even in the

presence of KCl but that, in a second step, a complementary factor is required in order to extract these proteins from membranes.

DISCUSSION

Current models hold that GDI serves as a reservoir and a shuttle to target a resting pool of soluble Rho proteins to activated sites in membranes and subsequently to release them from membranes (Narumiya 1996). In this study, we have investigated the factors which control the Rho releasing activity of GDI.

The quantification of Cdc42, RhoA and GDI proteins in kidney cytosol and brush border membranes was achieved with immunoblotting technique using corresponding recombinant bacterially expressed proteins as standards. The fact that the amount of GDI was lower than that of cytosolic Cdc42 and RhoA suggests that not all cytosolic Rho proteins are complexed with GDI in rat kidney. This is in agreement with earlier observations made while purifying enriched pools of Cdc42 and RhoA from kidney cytosol (Boivin and Béliveau 1996). In that study, a significant proportion of the cytosolic RhoA eluted from a gel filtration column as a 20 kDa globular protein in fractions devoid of GDI. Another group also reported the presence of an uncomplexed form of RhoA in cytosolic extracts from RINm5F cells (Regazzi et al. 1992). These free RhoA could represent a nonprocessed subpopulation, since prenylation and subsequent proteolysis of the last three amino acids are known to be essential for GDI binding (Regazzi et al. 1992). Accumulation of a nonprocessed pool of RhoA could therefore reflect a slower turnover rate compared to Cdc42.

Addition of GST-GDI to kidney BBM results in a rapid and specific release of Cdc42 and RhoA from the membranes. RhoB, although present in

the BBM preparation, is not extracted by GST-GDI. This is in disagreement with an earlier study which reported GDI solubilizing activity upon RhoB using synaptic plasma membranes and erythrocyte ghosts (Isomura et al. 1991). This discrepancy might be due to the fact that exogenously bound RhoB was used in their study, while in our study the release of endogenous RhoB was examined. This insensitivity of endogenous RhoB proteins to GST-GDI action in kidney BBM could reflect their tight association with particulate structures or, as recently suggested, their preferential interaction with a different GDI (Zalcman et al. 1996).

In kidney BBM, we also found subpopulations of Cdc42 and RhoA that were resistant to GDI extraction, suggesting that different pools of Rho proteins might fulfill different functions. A resident population of Rho proteins may serve basic functions related to cytoskeleton cohesion while a more mobile population can cycle between membrane and cytosolic compartments with the help of GDI in response to transient and specific activation. For example, in Swiss 3T3 cells phorbol ester stimulation results in the translocation of a cytosolic pool of RhoA to cleavage furrows (Takaishi et al. 1995). Insulin treatment provokes a rapid relocation of RhoA to the plasma membrane in adipocytes (Karmam et al. 1997) while RhoA translocates to the nucleus in response to α -thrombin in quiescent IIC9 cells (Baldassare et al. 1997). Thus appropriate and transient targetting is crucial for at least some Rho functions.

Different hypotheses could explain how GDI discriminates between the various Rho populations in BBM in order to extract them. One possibility is

that GDI preferentially reacts with a specific nucleotide state of Rho proteins as proposed by Takai's group (Isomura et al. 1991), but other groups have reported that this is not the case (Leonard et al. 1992). In addition to the nucleotide status of the Rho proteins, recognition might also involve differential post-translational modifications such as methylation and phosphorylation. For example, it has been reported that cytosolic Cdc42 complexed with GDI is generally unmethylated (Backlund 1992). Another recent report has shown that *in vitro* phosphorylation of RhoA by protein kinase A strongly increased the GDI-mediated membrane extraction of this protein independent of its nucleotide state (Lang et al. 1996).

Following GST-GDI addition, we noted that Cdc42 and RhoA were released from membranes very quickly; it occurred within minutes even at 4°C. Such a strong affinity between proteins is also observed in antigen-antibody interactions. Clearly, GDI is a powerful regulator of Rho functions which needs to be tightly regulated. Our finding that the releasing activity of GDI on BBM-bound Rho proteins is inhibited at physiological ionic strength in BBM is particularly interesting. Furthermore, the widespread tissue distribution of this phenomenon suggests that the Rho shuttle activity of GDI is generally downregulated under physiological conditions.

Interestingly, weakening of the binding between GST-GDI and Rho proteins is not responsible for this effect since complexes of these proteins could still be recovered with the same yields from glutathione-Sepharose beads in the presence of low and physiological ionic strength solutions, as was also reported by others (Adra et al. 1997). However, the presence of KCl

might interfere with the Rho protein release activity of GDI without affecting its binding capacity. In fact, the inability of GST-GDI to extract Rho proteins from salt-pretreated BBM suggests that its Rho-solubilizing activity requires an additional factor. However, attempts to reconstitute the GST-GDI releasing activity by addition of dialyzed soluble fractions from KCl-pretreated BBM to washed membranes were unsuccessful.

Recently, the Rho-binding and membrane extraction functions of GDI were attributed to two structurally distinct regions of this protein (Gosser et al. 1997; Keep et al. 1997). While the folded C-terminal domain of GDI binds to the isoprenylated C-terminal ends of Rho proteins, the flexible N-terminal domain of GDI is essential for membrane extraction of these small GTPases (Gosser et al. 1997). Under physiological ionic strength conditions, salt inhibition of electrostatic bonding between the N-terminal regions of GDI and Rho proteins, by keeping this GDI domain unstructured, might inhibit its membrane extraction activity.

In summary, we report that kidney BBM possess two populations of Rho proteins based on the ability of GDI to achieve their incomplete extraction from these membranes. Furthermore, we show that the Rho protein extraction activity of a GST-GDI fusion protein on membranes from various origins is inhibited under physiological ionic conditions *in vitro*, suggesting the need for a complementary signal to activate the GDI shuttle role *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. A. Hall for providing the GST-GDI plasmid and Dr. R. Cerione for the C-terminal truncated version. D.B. is a recipient of a fellowship from the Medical Research Council of Canada. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to R.R.D and from the Kidney Foundation of Canada to R.B.

ABBREVIATIONS

Ac-YVAD-CHO, acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyde; BBM, brush border membrane; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; E-64, L-*trans*-epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane; GAP, GTPase activating protein; GDI, GDP dissociation inhibitor; GDP, guanosine 5'-diphosphate; GDS, GDP dissociation stimulator; GTP, guanosine 5'-triphosphate; GTP γ S, guanosine 5'-O-(thiotriphosphate); GST, glutathione S-transferase; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; NEM, N-ethyl maleimide; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PVDF, polyvinylidene difluoride membranes; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris-buffered saline; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

REFERENCES

- Adra, C. N., Manor, D., Ko, J. L., Zhu, S., Horiuchi, T., Van Aelst, L., Cerione, R. A., and Lim, B. 1997. RhoGDI γ : A GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 4279-4284.
- Backlund, P.S.Jr. 1992. GTP-stimulated carboxyl methylation of a soluble form of the GTP-binding protein G25K in brain. *J. Biol. Chem.* **267**: 18432-18439.
- Backlund, P.S.Jr. 1993. Carboxyl methylation of the low molecular weight GTP-binding protein G25K: Regulation of carboxyl methylation by rhoGDI. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**: 534-542.
- Baldassare, J.J., Jarpes, M. B., Alferes, L. and Raben, D. M. 1997. Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction. *J. Biol. Chem.* **272**: 4911-4914.
- Boivin D. and Béliveau R. 1995. Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *Am. J. Physiol.* **269**: F180-F189.

- Boivin, D., Bilodeau, D. and Béliveau, R. 1996. Regulation of cytoskeletal functions by Rho small GTP-binding proteins in normal and cancer cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**: 801-810.
- Booth, A. G. and Kenny, A. J. 1974. A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. *Biochem J.* **142**: 575-581.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Cerione, R. A. and Zheng, Y. 1996. The Dbl family of oncogenes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 216-222.
- Denhardt, D. T. 1996. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: The potential for multiplex signaling. *Biochem J.* **318**: 729-747.
- Foster, R., Hu, K.-Q., Lu, Y., Nolan, K. M, Thissen, J. and Settleman J. 1996. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2689-2699.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujiko, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. and Takai, Y. 1990. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* **5**: 1321-1328.

- Gingras, D., and Béliveau, R. 1994. Cytosolic proteins of 21-23 kda are methylated by kidney cortex membrane-associated C-terminal carboxyl methyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* **1204**: 149-156.
- Gingras, D., Boivin, D. and Béliveau, R. 1993. Subcellular distribution and guanine nucleotide dependency of COOH-terminal methylation in kidney cortex. *Am. J. Physiol.* **265**, F316-F322.
- Gosser, Y.Q., Nomanbhoy, T.K., Aghazadeh, B., Manor, D., Combs, C., Cerione R.A., and Rosen, M.K. 1997. C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* **387**: 814-819.
- Gutkind, J. S. and Vitale-Cross, L. 1996. The pathway linking small GTP-binding proteins of the Rho family to cytoskeletal components and novel signaling kinase cascades. *Cell Develop. Biol.* **7**: 683-690.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514.
- Isomura, M., Kikuchi, A. K., Ohga, N. and Takai, Y. 1991. Regulation of binding of RhoB p20 to membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *Oncogene* **6**: 119-124.

Karnam, P., Standaert, M. L., Galloway, L. and Farese, R. V. 1997. Activation and translocation of Rho (and ADPribosylation factor) by insulin in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 6136-6140.

Keep, N.H., Barnes, M., Barsukov, I., Badii, R., Lian, L.Y., Segal, A.W., Moody, P.C.E. and Roberts, G.C.K. 1997. A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. *Structure* **5**: 623-633.

Kyriakis, J. M. and Avruch, J. 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* **18**: 567-577.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.

Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. and Bertoglio, J. 1996. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* **15**: 510-519.

Lelias, J.-M., Adra, C. N., Wulf, G. M., Guillemot, J.-C., Khagad, M., Caput, D. and Lim, B. 1993. cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 1479-1483.

- Leonard, D., Hart, M. J., Platko, J. V., Eva, A., Henzel, W., Evans, T. and Cerione, R. A. 1992. The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the Cdc42Hs protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 22860-22868.
- Molnar, A., Theodoras, A.M., Li, Z. and Kyriakis, J.M. 1997. Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J. Biol. Chem.* **272**: 13229-13235.
- Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lütcke, A., Parton, R. G. and Zerial, M. 1996. Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* **384**: 427-431.
- Narumiya, S. 1996. The small GTPase Rho: Cellular functions and signal transduction. *J. Biochem.* **120**: 215-228.
- Olson, M.F., Ashworth, A. and Hall, A. 1995. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**: 1270-1272.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Pérez, I., Bravo, R. and Lacal, J.C. 1997. Activation of the nuclear factor- κ B by Rho, Cdc42, and Rac1 proteins. *Genes Dev.* **11**: 463-475.
- Plakto J. V., Leonard, D. A., Adra, C. N., Shaw R. J., Cerione, R. A. and Lim B. 1995. A single residue can modify target-binding affinity and activity of the

- functional domain of the Rho-subfamily GDP dissociation inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 2974-2978.
- Regazzi R, Kikuchi, A., Takai, Y. and Wolheim, C. B. 1992. The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins. J. Biol. Chem. **267**: 17512-17519.
- Scherle, P., Behrens, T. and Staudt L. M. 1993. Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**: 7568-7572.
- Self, A.J. and Hall, A. 1995. Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*. Methods Enzymol. **256**: 3-10.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kameyama, T., Tsukita, S., Tsukita, S and Takai, Y. 1995. Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. Oncogene **11**: 39-48.
- Vojtek, A. B. and Cooper, J. A. 1995. Rho family members: Activators of MAP kinase cascades. Cell **82**: 527-529.
- Yoshioka, K., Matsumura, F., Akedo, H., and Itoh, K. 1998. Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. J. Biol. Chem. **273**: 5146-5154.

Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honore, N., Rousseau-Merck, M.-F., Tavitian, A. and Olofsson, B. 1996. RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). *J. Biol. Chem.* **271**: 30366-30374.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. GST-GDI-stimulated release of Cdc42 and RhoA from BBM. BBM (20 μ g of protein) were incubated for 60 min at 37°C in 20 mM HEPES/Tris pH 7.2 in the absence or presence of GST, GST-GDI or GST-GDI-C Δ 8 proteins (0.36 μ M) in a final volume of 30 μ L. Following incubation, membranes were rapidly chilled on ice and centrifuged at 40 000 X g for 30 min at 4°C. Laemmli sample buffer was added to both the membrane (P) and soluble (S) fractions. Proteins were separated by SDS-PAGE and Cdc42 (A), RhoA (B), RhoB (C) and Ras (D) were detected by Western blotting as described under Materials and Methods. These results are representative of two experiments done in duplicate.

Figure 2. Concentration dependence of Cdc42 and RhoA extraction from BBM by GST-GDI. Membranes (20 μ g of protein) were incubated in 20 mM HEPES/Tris pH 7.2 for 60 min at 37°C in the presence of varying concentrations of GST-GDI in a final volume of 30 μ L. Following the incubation, soluble proteins were separated from membranes by centrifugation at 40 000 X g for 30 min at 4°C. The proportion of released Cdc42 (A) and RhoA (B) was monitored by Western blot analysis and quantified by laser densitometry as described under Materials and Methods. Values are means + SD of four distinct experiments.

Figure 3. Sequential extraction of Cdc42 and RhoA from BBM by GST-GDI. Membranes (20 μ g of protein) were incubated in 20 mM HEPES/Tris pH 7.2, in the presence of GST-GDI (0.36 μ M) for 15 min at 37°C.

Then soluble proteins (S) were separated from membranes (P) by centrifugation at 40 000 X g for 30 min at 4°C. Soluble proteins released by GST-GDI treatment were kept. Pellets were resuspended in 30 µL of 20 mM HEPES/Tris pH 7.2 and the BBM were treated with GST-GDI for another cycle. The number of cycles used to treat the BBM with GST-GDI is indicated under each sample. Aliquots from each supernatant and pellet were solubilized in Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting for their content of Cdc42 (A) and RhoA (B) as described under Materials and Methods. Control (Ctl) corresponds to total amount of Rho proteins in BBM prior to the extraction procedure. These results are representative of two experiments done in duplicate.

Figure 4. Ionic strength inhibits the release of Cdc42 and RhoA from BBM induced by GST-GDI. Membranes (20 µg of protein) and GST-GDI (0.36 µM) were incubated in 20 mM HEPES/Tris pH 7.2 for 60 min at 37°C in the presence of increasing concentrations of KCl in a final volume of 30 µL. Separation of soluble proteins (S) from particulate (P) fractions and analysis by SDS-PAGE and Western blotting to assess their content of Cdc42 (A) and RhoA (B) were performed as described under Materials and Methods. Control (Ctl) corresponds to the total amount of Cdc42 and RhoA in BBM. These results are representative of two experiments done in duplicate.

Figure 5. Tissue distribution of the KCl inhibition of Rho protein extraction activity of GST-GDI. Total membranes from different tissues as well as kidney BBM (20 µg of protein) were incubated with GST-GDI (0.36 µM) in 20 mM HEPES/Tris pH 7.2 for 60 min at 37°C in the absence (-) or

presence (+) of KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ L. Separation of soluble (S) from particulate (P) fractions and analysis by SDS-PAGE and Western blotting for Cdc42 (A) and RhoA (B) were performed as described under Materials and Methods. These results are representative of two experiments done in duplicate.

Figure 6. Effect of temperature on the release of Cdc42 and RhoA from BBM by GST-GDI. Membranes (20 μ g of protein) and GST-GDI (0.36 μ M) were incubated in 20 mM Hepes/Tris pH 7.2 for 60 min at different temperatures in the absence or presence of KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ L. Separation of soluble (S) from particulate (P) fractions and analysis by SDS-PAGE and Western blotting of Cdc42 (A) and RhoA (B) were performed as described under Materials and Methods. These results are representative of two experiments done in duplicate.

Figure 7. Kinetics of Cdc42 and RhoA release from kidney BBM by GST-GDI. Membranes (20 μ g of protein) from kidney BBM were incubated with GST-GDI (0.36 μ M) in 20 mM Hepes/Tris pH 7.2 for different lengths of times at 37°C in the absence or presence of KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ L. Separation of soluble (S) from particulate (P) fractions and analysis by SDS-PAGE and Western blotting of Cdc42 (A) and RhoA (B) were performed as described under Materials and Methods. Control (Ctl) corresponds to the total amount of Cdc42 or RhoA in BBM or stomach membranes. These results are representative of two experiments done in duplicate.

Figure 8. Effects of protease inhibitors on Cdc42 and RhoA release from kidney BBM by GST-GDI. Membranes (20 μ g of protein) from kidney BBM were incubated with GST-GDI (0.36 μ M) in the presence of 10 μ M E-64, 1 μ M Ac-YVAD-CHO, 10 mM NEM, 3 mM EDTA, 300 μ M captopril, 0.03 μ g/ μ l aprotinin or 30 μ M pepstatin in 20 mM Hepes/Tris pH 7.2 for 60 min at 37°C in the absence or presence of KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ L. Membranes were then centrifuged to achieve separation of soluble (S) from particulate (P) fractions before adding Laemmli sample buffer (A and B). Alternatively, BBM were directly solubilized in Laemmli sample buffer (C and D). Proteins were analyzed by SDS-PAGE and contents of Cdc42 (A and C) and RhoA (B and D) were assessed by Western blotting as described under Materials and Methods. Control (Ctl) corresponds to the amount of Rho proteins in BBM prior to KCl treatments (C and D). These results are representative of two experiments done in duplicate.

Figure 9. Inhibition of GST-GDI release activity on Cdc42 and RhoA following KCl pre-treatment of kidney BBM. Membranes (20 μ g of protein) were incubated for 30 min at 4°C in the absence (lanes 2) or presence (lanes 3) of 150 mM KCl. Following the incubation, BBM were centrifuged at 40 000 X *g* for 30 min at 4°C and the supernatants were removed. To eliminate residual KCl, the membrane pellets were resuspended in 20 mM Hepes/Tris pH 7.2, centrifuged and resuspended in the same buffer. The membranes were then incubated in the presence of GST-GDI for 30 min at 37°C, to assay the release of Rho proteins. Separation of soluble (S) proteins from particulate (P) fractions and analysis by SDS-PAGE and Western blotting of Cdc42 (A) and RhoA (B) were performed as described under Materials and

Methods. Lanes 1 show the normal extraction of Cdc42 and RhoA by GST-GDI from untreated BBM. These results are representative of two experiments done in duplicate.

TABLE I Quantification of Cdc42, RhoA and GDI in kidney BBM and soluble fractions

Proteins (20 μ g) from soluble and BBM fractions of kidney cortex were separated by SDS-PAGE and the amounts of Cdc42, RhoA and GDI were quantified by immunoblotting and laser densitometric analysis as described under Materials and Methods using recombinant proteins expressed in *E. coli* as standards. N.d. means not detectable (n=4).

Fractions	Cdc42 (ng/ μ g)	RhoA (ng/ μ g)	GDI (ng/ μ g)
BBM	4.7 \pm 0.3	7.2 \pm 0.2	n.d.
Soluble	5.1 \pm 0.2	6.5 \pm 0.9	6.3 \pm 0.8

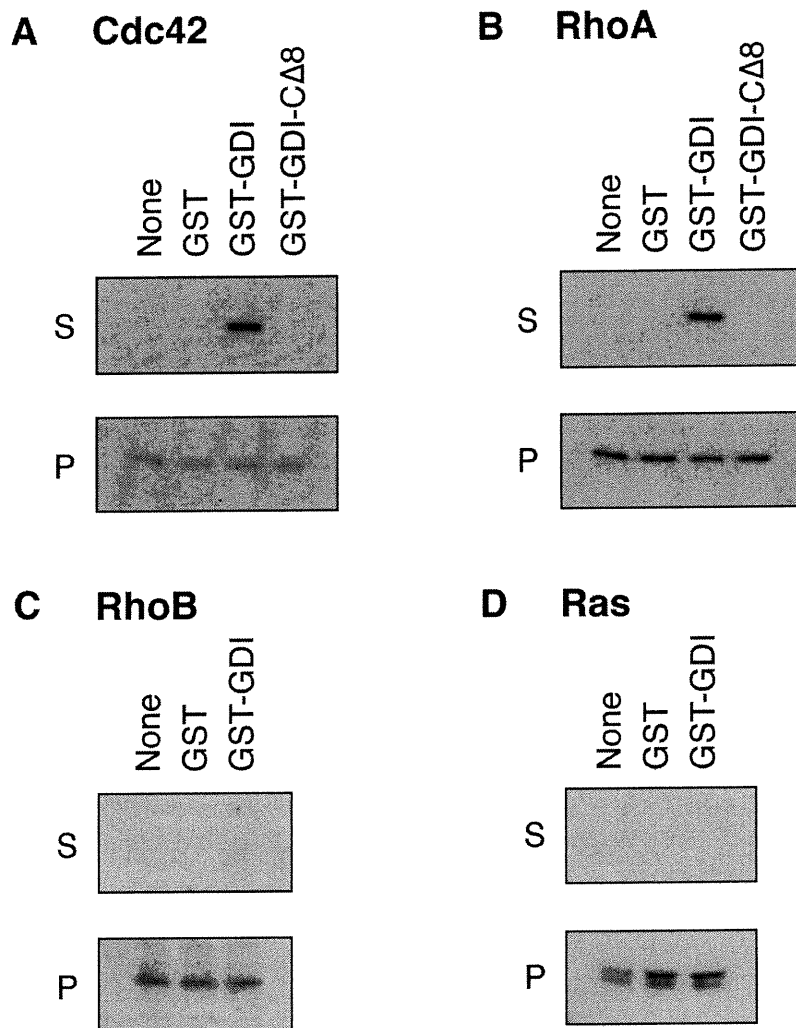


FIGURE 1. GST-GDI-stimulated release of Cdc42 and RhoA from BBM

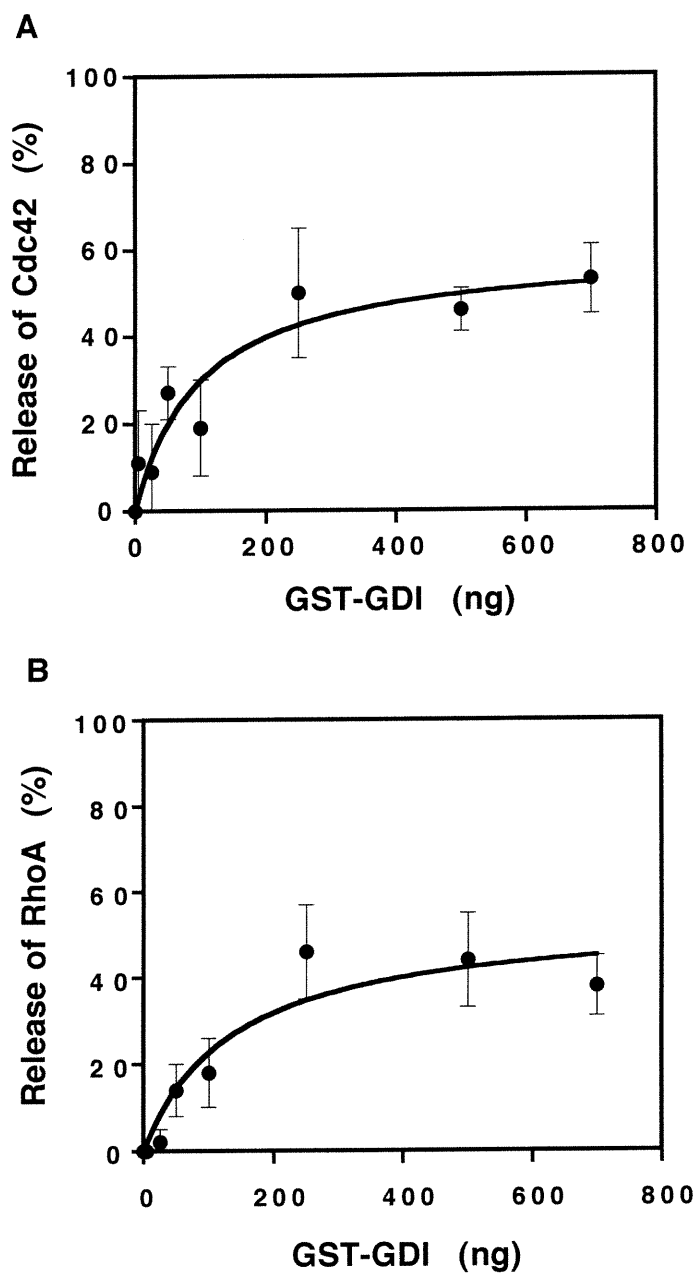


FIGURE 2. Concentration dependence of Cdc42 and RhoA extraction from BBM by GST-GDI

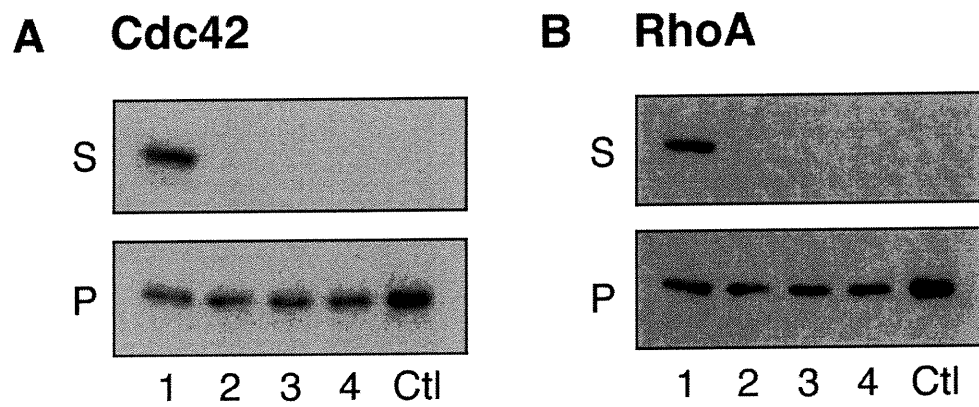


FIGURE 3. Sequential extraction of Cdc42 and RhoA from BBM by GST-GDI

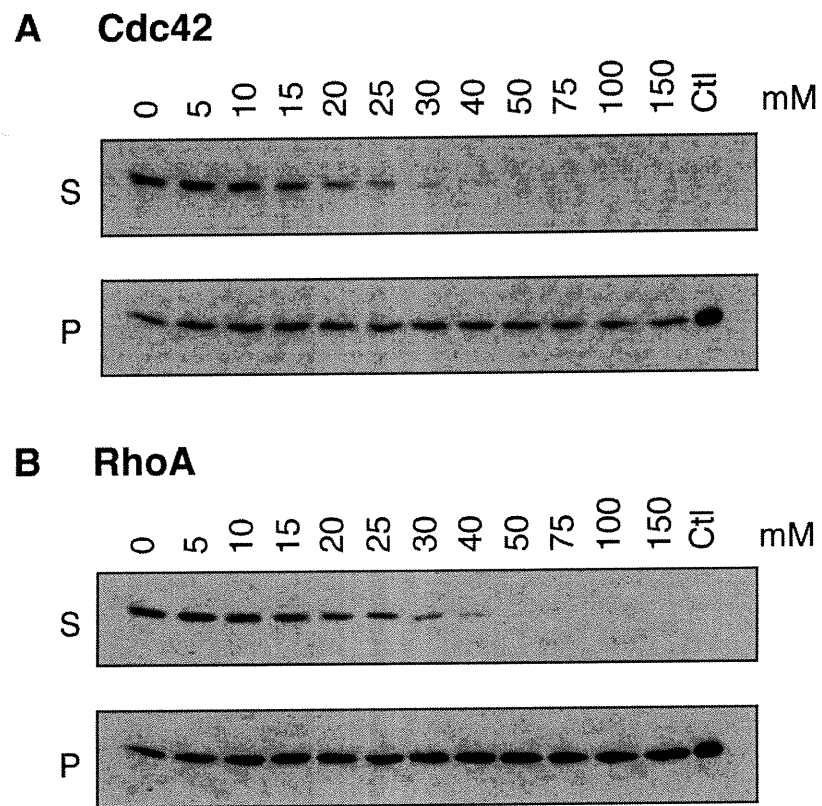


FIGURE 4. Ionic strength inhibits the release of Cdc42 and RhoA from BBM induced by GST-GDI

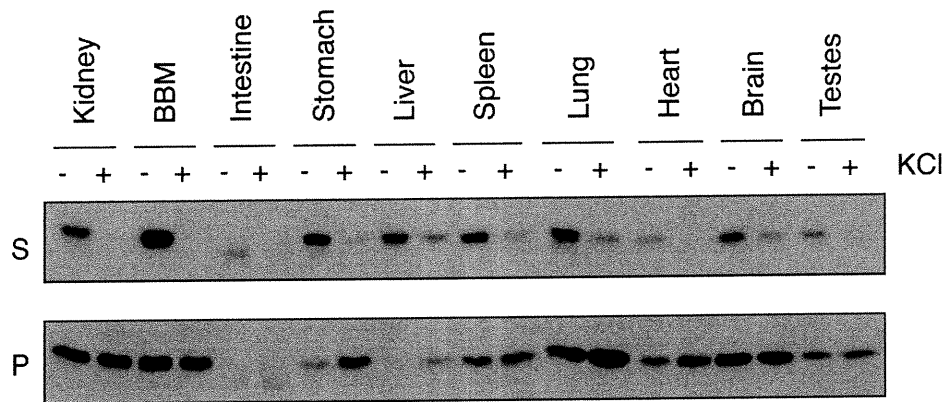
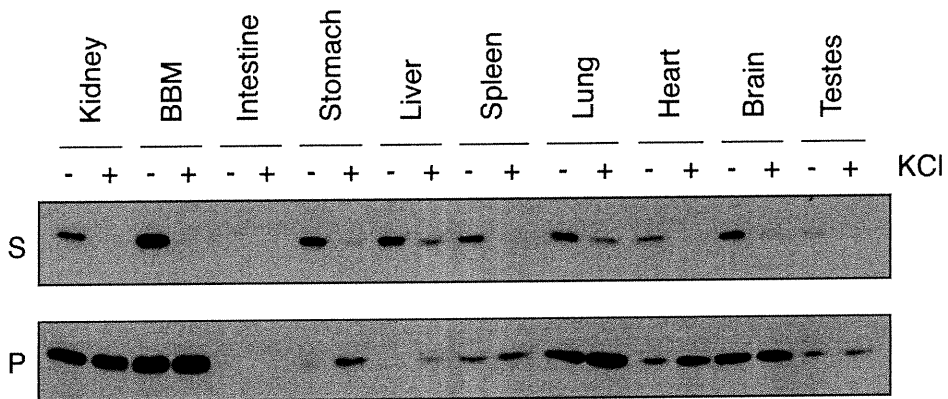
A Cdc42**B RhoA**

FIGURE 5. Tissue distribution of the KCl inhibition of Rho protein extraction activity of GST-GDI

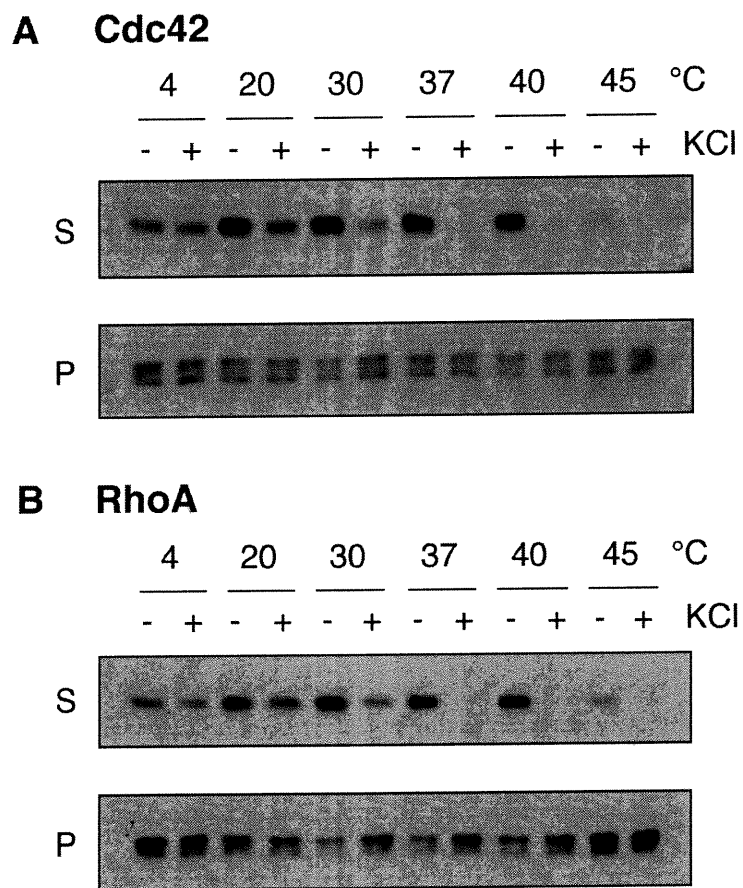


FIGURE 6. Effect of temperature on the release of Cdc42 and RhoA from BBM by GST-GDI

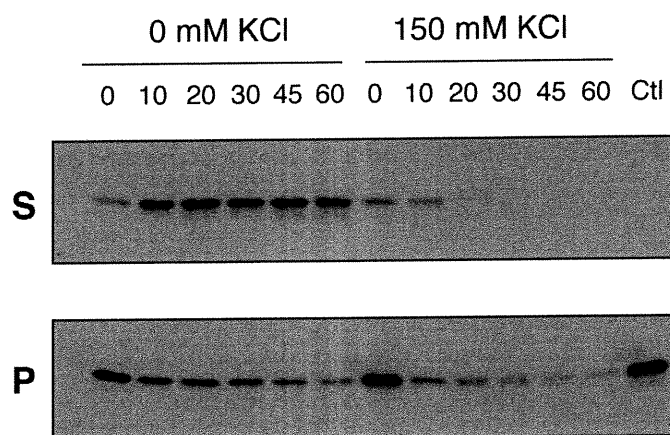
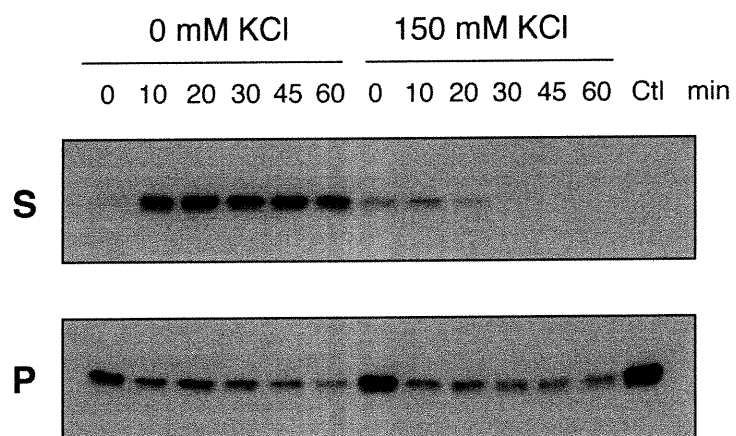
A Cdc42**B RhoA**

FIGURE 7. Kinetics of Cdc42 and RhoA release from kidney BBM by GST-GDI

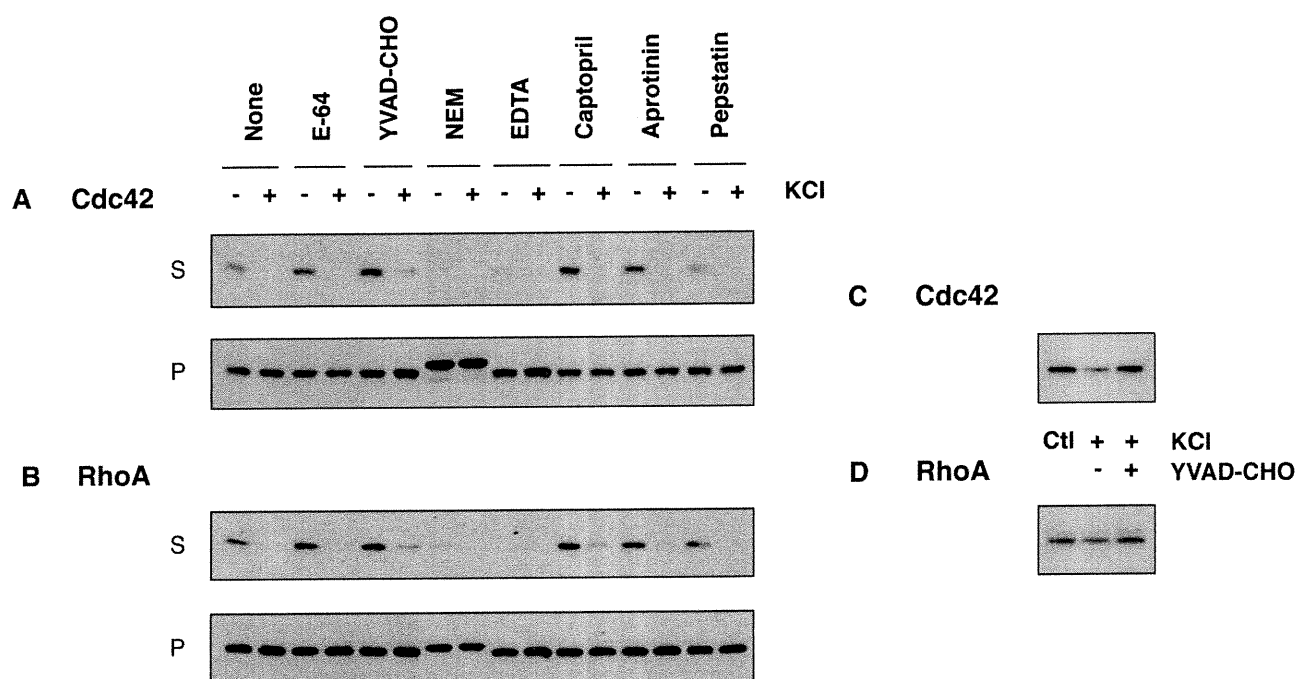


FIGURE 8. Effects of protease inhibitors on Cdc42 and RhoA release from kidney BBM by GST-GDI

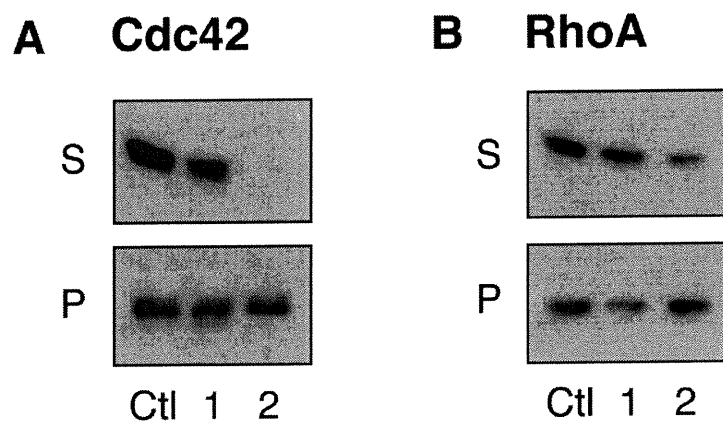


FIGURE 9. Inhibition of GST-GDI release activity on Cdc42 and RhoA following KCl pre-treatment of kidney BBM

2.3 Regulation of rhoGDI activity by proteolysis in kidney membranes

Diane Bilodeau, Sylvie Lamy, Richard R. Desrosiers and Richard Béliveau*

Laboratoire d'oncologie moléculaire, Département de chimie-biochimie,
Université du Québec à Montréal et Centre d'oncologie Charles Bruneau,
Hôpital Sainte-Justine, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Canada,
H3C 3P8

*To whom correspondence should be addressed

Tel: (514) 987-3000 ext. 8551

Fax: (514) 987-0246

E-mail: oncomol@er.uqam.ca

OBJECTIFS

Le cycle d'activation des petites protéines G de la famille Rho s'appuie sur un cycle de localisation de ces même protéines entre fraction soluble et fraction membranaire. Le pivot de cette relocalisation est la protéine rhoGDI qui leur sert de navette et les maintient dans un état inactif lors de leur transit dans la fraction soluble. La réactivation des protéines Rho à la membrane suppose la dissociation des complexes Rho/rhoGDI. Des données sur la structure de rhoGDI obtenues récemment en cristallographie ont mis en évidence une dichotomie structurale susceptible de provoquer une certaine fragilité à l'action de protéases. Nous avons examiné la possibilité d'une régulation de l'activité rhoGDI par les protéases, au niveau de la membrane à bordure en brosse et montrons que c'est en effet le cas. Nous avons caractérisé biochimiquement cette activité protéolytique et nos résultats suggèrent l'implication indirecte d'une caspase endogène à la bordure en brosse rénale.

ABSTRACT

The Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) actively takes part in the regulation of Rho small GTP binding proteins by extracting them from membranes and forming inactive cytosolic complexes which can be further mobilized upon cell activation. Here we report that recombinant GDI and GST-GDI proteins are cleaved *in vitro* into a 17 kDa fragment upon incubation with rat kidney brush border membranes. Tissue distribution of GST-GDI proteolysis showed that this protein was also strongly cleaved by membranes from spleen and intestine, giving rise to the same major 17 kDa fragment. The rate of proteolysis was very sensitive to KCl concentration and GST-GDI proteolysis was achieved within 1 h at physiological conditions of salt and temperature in the presence of kidney brush border membranes. This suggests that modulation of GDI tridimensional structure or the interactions between GDI and Rho proteins might contribute to GDI proteolytic vulnerability in intact cells. Truncation of GST-GDI to a 17 kDa fragment impaired its Rho releasing activity from membranes. GST-GDI proteolysis in the presence of kidney brush border membranes was strongly inhibited by EDTA and micromolar concentrations of the synthetic peptide acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyde, a known inhibitor of caspases. However, N-terminal sequencing of the 17 kDa fragment demonstrated that cleavage of GDI occurred between Ala⁶³ and Asp⁶⁴, a site devoided of a known consensus motif for cleavage by caspases. Together, these results strongly suggest that a metalloprotease and a caspase-like activity could regulate GDI processing in kidney, possibly through a protease cascade. In addition, these findings

suggest that proteolysis of GDI may potentially disrupt its functions, leading to defective Rho activity and disorganization of actin cytoskeleton in kidney cells.

INTRODUCTION

Rho proteins are signaling molecules involved in the control of cell morphology [1-3], cell growth [4-5], cell cycle progression [6-7], and gene activation [8-11]. They comprise RhoA, RhoB, RhoC, RhoD [12], RhoE [13], RhoL [14], Rac1, Rac2, RhoG, Cdc42 and TC10 [15]. These proteins are small GTP-binding proteins which oscillate between a GDP-inactive and a GTP-active bound state. Their regulation requires the participation of at least three kinds of regulatory proteins: GDP-dissociation inhibitors (GDIs), GDP-dissociation stimulators (GDSs) and GTPase-activating proteins (GAPs) [1].

GDI is ubiquitously expressed [16-17]. In addition to inhibiting nucleotide release, GDI can counteract GAP activity [18-19] and may control the intracellular localization of Rho proteins by releasing them from membranes and forming a stable inactive complex with them [20-22]. Available data support a model in which GDI serves as a reservoir and a shuttle to target a resting pool of Rho proteins to activated sites in membranes [5].

Many GDSs and GAPs were recognized to act upon Rho proteins [1]. But, surprisingly, only three RhoGDIs have been identified so far. GDI (GDI-1) was first isolated as an ubiquitous cytosolic protein with an apparent molecular mass of 27-28 kDa [17, 21], although the gene encodes for a protein of 23 kDa, capable of functioning on RhoA, Cdc42, Rac1 and Rac2. Then, by subtractive hybridization, an homologous gene was cloned and the corresponding protein was named D4GDI [23]. This cytosolic protein also

known as Ly-GDI and GDI-2 is effective on the same Rho substrates as GDI, but its expression is restricted to hematopoietic cells [23-24]. A third member, named GDI γ or GDI-3, was recently identified in membranes, with preferential expression in human brain and pancreas where it binds to RhoA and Cdc42 [25]. A murine equivalent that binds RhoB and RhoG was also described [26].

D4GDI recently gained attention as a potential substrate for caspases [27-28]. This family of cysteine proteases, of which interleukin-1 β converting enzyme (ICE) is the archetype, is composed of ten members that can be divided into three subfamilies, based on sequence similarities [29-30]. They share the same catalytic selectivity for peptidyl substrates with Asp residues at the P1 position, although the recognized amino acid sequence at the P2, P3, and P4 positions may vary among the proteins [31-32]. Besides D4GDI and pro-IL-1 β [33], their substrates include enzymes involved in genomic function, regulators of the cell-cycle function, structural proteins [30] and caspase members themselves via auto- and trans-activation [34]. Similar to the proteolysis of lamin A [35], Gas2 [36], keratin [37], fodrin [38] actin [39], focal adhesion kinase [40], and gelsolin [41], the proteolysis of D4GDI is expected to contribute to cytoskeleton disassembly and detachment of the cell from the extracellular matrix by deregulation of Rho functions.

Growing evidence is pointing to a role for ICE-like proteases in apoptosis. ICE inhibition by viral proteins or by specific peptide inhibitors could prevent cell death induced by tumor necrosis factor or by Fas [42-43]. Moreover, knock-out experiments with mice showed that ICE gene deletion confers resistance to Fas-induced apoptosis [44]. In contrast, overexpression

of ICE in fibroblasts resulted in apoptosis [45]. Furthermore, proteolytic processing of many substrates for ICE and ICE-like proteases correlates with the onset of apoptosis [46-49].

In Jurkat T cells treated with anti-Fas, D4GDI cleavage kinetics paralleled those of apoptosis [27]. Proteolysis led to the appearance of a 23 kDa fragment whose formation could be attributed to CPP32 (caspase-3) activity [27]. D4GDI possesses an additional cleavage site for caspase activity at Asp⁵⁵ [28]. *In vitro* cleavage at this site by recombinant ICE (caspase-1) produced a 17 kDa fragment which was also observed in inflammatory cells following treatments known to stimulate interleukin-1 β release [28]. Cleavage of D4GDI at this site severely impaired its activity to regulate Rho activity [28].

Although GDI lacks the consensus caspase recognition sequences found in D4GDI, we report here that recombinant GDI and GST-GDI are proteolytically processed upon incubation with kidney brush border membranes (BBM), which abolishes its ability to extract Rho proteins from membranes. Formation of the major immunoreactive 17 kDa fragment was prevented by preincubating the membranes with acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyde (Ac-YVAD-CHO), a specific ICE inhibitor, and the chelating reagent EDTA suggesting that caspases and metalloproteases may participate in the regulation of GDI activity in kidney.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Male Sprague-Dawley rats (150-300 g body weight) were obtained from Charles River (St-Constant, Québec). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, Ontario). Polyclonal antibodies raised against the C-terminal amino acid residues 178-198 of GDI, against amino acid residues 166-182 of Cdc42, and monoclonal anti-RhoA (residues 119-132) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Donkey anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibodies and an enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit were from Amersham (Oakville, Ontario). The interleukin-1 β converting enzyme inhibitor (Ac-YVAD-CHO) was obtained from Bachem (Philadelphia, PA). Other reagents were from Sigma Chemical (St-Louis, MO).

Methods

Isolation of crude membranes from tissues

Sprague-Dawley male rats were anaesthetized with CO₂ and killed by decapitation, and the tissues were washed with an ice-cold 0.15 M NaCl solution. Tissues were minced in 250 mM sucrose, 5mM Hepes/Tris, pH 7.5, and homogenized with a Polytron homogenizer (Brinkman Instruments). The crude homogenates were centrifuged at 3000 X g for 10 min at 4°C to remove unbroken cells and nuclei. The supernatants were centrifuged at 100 000 X g for 1 h to separate soluble and crude membrane fractions. Protein concentrations were determined [50] with BSA as the standard.

Isolation of brush border membranes from rat kidney cortex

Brush border membranes were purified from rat kidney cortex by a Mg^{2+} precipitation method [51] with minor modifications [52]. The purity of the membrane preparations were determined by measuring alkaline phosphatase activity which showed a 10-12-fold enrichment over the renal cortex homogenate.

Expression of recombinant proteins in Escherichia coli

Expression of GST-GDI fusion protein was carried out by transforming *Escherichia coli* (*E. coli*) using the recombinant vector pGEX-2T, as described elsewhere [53]. The fusion protein was isolated by affinity purification on glutathione-Sepharose beads obtained from Pharmacia (Montreal, Quebec). An aliquot was cleaved by thrombin to remove glutathione S-transferase (GST) and generate GDI. The purity and identity of GST-GDI and GDI were assessed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting. Protein concentrations were measured as described above using BSA as the standard.

In vitro cleavage of GST-GDI

Unless otherwise indicated, 500 ng GST-GDI (0.36 μ M) was incubated with BBM or crude membranes (20 μ g) for 1 h at 37°C in 20 mM Hepes/Tris buffer pH 7.2 in a final volume of 30 μ l. The reaction was stopped on ice and the mixture rapidly centrifuged at 40 000 X *g* for 30 minutes at 4°C. The supernatant and the pellet were removed, solubilized in sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

Effect of GST-GDI cleavage on membrane extraction of Rho proteins.

In order to investigate the effect of proteolytic cleavage of GDI on its extraction activity, BBM (20 µg of protein) were incubated for 1 h at 37°C in 20 mM Hepes/Tris pH 7.2 in the presence or absence of 150 mM KCl with 0.36 µM GST-GDI to obtain the truncated form or with 0.36 µM GST-GDI in the presence of 10 µM Ac-YVAD-CHO for the intact form. BBM were pelleted by centrifugation as described above and supernatants containing the truncated or the Ac-YVAD-CHO-protected forms of GST-GDI were dialysed to remove salt. Then the truncated and intact forms of GST-GDI were reincubated with fresh kidney BBM in order to analyze their ability to extract Rho proteins from membranes. Following the extraction of Rho proteins, samples were centrifuged and the amounts of GST-GDI, Cdc42 and RhoA in supernatants and pellets were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Sequencing of the 17 kDa fragment generated by cleavage of GST-GDI.

Following incubation of GST-GDI with kidney BBM, soluble proteins were separated from membranes by centrifugation as described above and pooled. Proteins were precipitated overnight by addition of 6 volumes of ice-cold acetone. Following centrifugation for 5 min at 5 000 x g, the precipitated proteins were dried and then resuspended in sample buffer (50 µl). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Trans-Blot, Bio-Rad, Mississauga, Ontario) in 10 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid (CAPS) pH 11 and 20% methanol. In parallel experiments, Western blot analysis was carried out to locate the immunoreactive GST-GDI fragments. The major immunoreactive 17 kDa

proteolytic fragment was excised from the PVDF membrane and automated sequencing was performed on an Applied Biosystems, Inc. apparatus, Model 473A.

Gel electrophoresis and Western blotting

SDS-PAGE was performed according to Laemmli [54] with a Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad). Proteins were heated at 85°C in Laemmli's sample buffer for 2 min before loading onto 1.5 mm thick and 12.5% polyacrylamide gels. Proteins were electroblotted onto 0.45 µm pore diameter PVDF membranes (Immobilion-P; Millipore) in transfer buffer (96 mM glycine, 10 mM Tris and 10% methanol) at 80 mA per gel for 1.7 h. The blots were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl) containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% non-fat dry milk (Carnation). Blots were incubated with a 1:1000 dilution of commercial anti-GDI, anti-Cdc42 or anti-RhoA antibodies in TBS containing 0.1% Tween 20, 3% BSA and 0.01% NaN₃, for 1 h at room temperature, washed for 1 h in TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 followed by a 1 h incubation in the blocking buffer with a 1:2000 dilution of donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase. Immunoreactive bands were revealed using an enhanced chemiluminescence Western-blotting kit. Blots were exposed to Fuji films.

RESULTS

GDI and GST-GDI cleavage by kidney BBM

The fusion protein GST-GDI migrated at 51 kDa, while recombinant GDI obtained by thrombin cleavage was detected at 28 kDa following SDS gel electrophoresis (Fig. 1). Incubation of either of these two proteins with kidney BBM resulted in cleavage of the recombinant protein as monitored by immunoblotting (Fig. 1). In both cases, a major immunoreactive fragment was found at approximately 17 kDa. In order to determine whether ionic strength affected GDI cleavage, recombinant GDI and GST-GDI were also incubated with BBM in the presence of KCl. Interestingly, the addition of salt promoted the proteolysis of recombinant GDI. Furthermore, the formation of the major fragment at 17 kDa was accompanied by the appearance of another fragment migrating at 20 kDa (Fig. 1). Thus, in the presence or absence of KCl, similar patterns of proteolytic fragments were generated from GDI and GST-GDI. However, the onset of proteolysis was much more rapid for GDI than for GST-GDI, suggesting that the GST portion of the fusion protein was impeding with the proteolysis. Consequently, for reason of convenience, the GST-GDI protein was retained for the subsequent characterization of the proteolytic event.

Formation of the 17 kDa fragment was followed over time and more than 50% of the GST-GDI protein was cleaved following a 60 min incubation in the presence of BBM and in the absence of KCl (Fig. 2). The addition of KCl accelerated the degradation of GST-GDI, and two additional fragments of 20 and 22 kDa became immunodetectable under these conditions. The 22

kDa fragment appeared first, reaching a maximum at 10 min, then diminished until complete disappearance at 60 min. Concomitantly, the amount of the 20 kDa fragment increased, suggesting that the latter arose from the former.

The KCl stimulation of GST-GDI proteolysis was concentration-dependent and the fusion protein was almost completely processed in the presence of physiological concentrations of salt (Fig. 3). Again we detected the presence of the intermediate fragments at 20 and 22 kDa between GST-GDI and the major fragment at 17 kDa when KCl concentrations were increasing (Fig. 3).

Tissue distribution of GST-GDI cleavage

To see whether GDI proteolysis was a general mechanism, we investigated the tissue distribution of this phenomenon. Following incubation of GST-GDI with crude membrane preparations from different tissues, proteolysis of GST-GDI occurred to varying extents with kidney, intestine and spleen membranes, and it generated a similar fragment of about 17 kDa (Fig. 4). GST-GDI was totally cleaved to this 17 kDa fragment in intestine. Cleavage was only partial in the presence of kidney BBM, or with crude membranes from kidney or spleen, in the absence of salt. However, addition of KCl accelerated the degradation of GST-GDI to near completion with these membranes. Similarly, a faint band migrating at 17 kDa was recognized by the antibody with preparations from most other tissues upon addition of KCl, suggesting that a target region of the GDI sequence was more accessible to proteases in the presence of salt. The fact that GST-GDI proteolysis was observed with membranes from some but not all tissues suggests that

proteolytic regulation of GDI functions may present some degree of tissue specificity.

Effect of protease inhibitors on GST-GDI cleavage

To determine the class of protease involved in GST-GDI proteolysis, kidney BBM were preincubated with protease inhibitors of different specificities. Interestingly, the proteolytic cleavage of GST-GDI in the presence of BBM was abolished by Ac-YVAD-CHO (Fig. 5), a highly specific inhibitor of ICE, which is a cysteine protease of the caspase family responsible for the activation of prointerleukin-1 β . The cysteine protease inhibitor E-64, the serine protease inhibitors captopril and aprotinin, as well as the acidic protease inhibitor pepstatin had no effect on GST-GDI proteolysis. Neither had the cysteine alkylating agent iodoacetamide. Nevertheless, a more hydrophobic cysteine modifying agent, phenylmaleimide, prevented formation of the 17 kDa fragment although GST-GDI proteolysis was still observed in the presence of physiological concentrations of KCl but without production of immunodetectable fragments. In the presence of EDTA, a chelating reagent and inhibitor of metalloproteases, a slightly higher fragment was generated (17.5 kDa) and the stimulatory effect of KCl on GST-GDI cleavage was reduced. Together, these inhibitor profiles are consistent with the involvement of caspases in GDI proteolysis, and also suggests the participation of a metalloprotease or some other requirement for divalent cations.

In the absence of KCl, Ac-YVAD-CHO inhibited GST-GDI cleavage in the presence of kidney BBM in a dose-dependent way and full protection was

reached at 10 μM (Fig. 6). Furthermore, this experiment indicated that the major proteolytic fragment detected by the antibody was actually a doublet consisting of peptides with close molecular weights of 17 and 17.5 kDa, respectively. Interestingly, the fragments showed different sensitivities to the inhibitory action of Ac-YVAD-CHO, since appearance of the 17 kDa fragment was prevented by 1 μM Ac-YVAD-CHO while that of the 17.5 kDa fragment required 10 μM (Fig. 6). The presence of KCl increased the inhibitory effect of Ac-YVAD-CHO on formation of the 17 kDa fragment by an order of magnitude since it required only 0.1 μM instead of 1 μM of the inhibitor (Fig. 6). Similarly, the concentration of Ac-YVAD-CHO needed to inhibit formation of the 17.5 kDa product was also strongly reduced in the presence of KCl. In addition, increasing concentrations of Ac-YVAD-CHO also inhibited the formation of fragments migrating at 20 and 22 kDa, which were easily detectable in BBM incubated with KCl in the absence of the caspase inhibitor (Fig. 6).

Determination of the 17 kDa cleavage site on GST-GDI

The N-terminal sequence obtained, DPNVXNVVVT where X was an unidentified amino acid residue, from purified 17 kDa fragment corresponds to residues 64-73 of human and bovine GDI (AVSA/ ⁶⁴DPNVPNVVVT⁷³) except for P⁶⁸. This site is different from the previously reported trypsin site at Arg⁵⁹ on GDI [55] although it lies in the same region of the protein (Fig. 7). However, cleavage at Ala⁶³ does not correspond with caspase activity since this family of proteases always cleaves after an aspartate residue. This result suggests that caspase activity is not directly involved in GST-GDI proteolysis in the presence of kidney BBM.

Effect of GST-GDI cleavage on its Rho extraction capacity

To assess the effect of proteolytic cleavage on GDI function, we compared the ability of truncated and intact proteins to extract RhoA and Cdc42 proteins from kidney BBM. Truncated GST-GDI was generated by preincubation with kidney BBM in the presence or absence of KCl; GST-GDI preincubated with kidney BBM in the presence of 10 μ M Ac-YVAD-CHO, with or without KCl, was used as a positive control for GST-GDI integrity and activity. Preincubation of GST-GDI with kidney BBM in the absence of KCl resulted in partial proteolysis of the protein, generating the major 17 kDa fragment (Fig. 8A, lane 1). Nearly 50% of Cdc42 and RhoA were released from kidney BBM by the partly truncated GST-GDI (Fig. 8 B and C, lanes 1), suggesting that either the 17 kDa fragment was still able to perform this GDI function or that the observed Rho protein extraction was due to the remaining intact GST-GDI. The latter explanation was supported by the finding that when proteolysis of GST-GDI into the 17 kDa fragment was brought to completion by addition of KCl to the preincubation medium (Fig. 8 A, lane 2), subsequent release of both Cdc42 and RhoA from fresh kidney BBM was abolished (Fig. 8 B and C, lanes 2). Furthermore, the Cdc42 and RhoA releasing activity of GST-GDI was maintained by inclusion of Ac-YVAD-CHO in the preincubation medium in both the presence and absence of KCl (Fig. 8 B and C, lanes 3 and 4), preserving GST-GDI integrity (Fig. 8 A, lanes 3 and 4). This confirms that the inhibition of Cdc42 and RhoA releasing activity of GST-GDI observed following preincubation with kidney BBM in the presence of KCl was due to the proteolysis of GST-GDI. Taken together, these results suggest that proteolysis potentially regulates GDI functions in the kidney.

DISCUSSION

In this study, we report that recombinant GDI, which is a regulator of Rho small GTP-binding protein localization and activation, is proteolytically processed in the presence of kidney BBM as well as in the presence of crude membranes from intestine and spleen. Interestingly, cleavage of GST-GDI occurs much faster under physiological ionic strength conditions. However, the extent of GST-GDI proteolysis varied among membranes from the tissues tested. Nevertheless, in all cases GST-GDI cleavage gave rise primarily to a 17 kDa immunoreactive peptide.

Since selective proteolysis of GDI with trypsin also gives rise to a 17 kDa fragment [55], this suggests the presence of a proteolytically sensitive zone in GDI structure (Fig. 7). This hypothesis is in agreement with the conclusions drawn from recent NMR spectroscopy and crystal structure determinations of GDI [55-56]. According to these studies, GDI is composed of two distinct regions. The N-terminal portion of the protein, comprising residues 1-60, is rather disorganized and flexible while the remaining C-terminal portion is highly structured in an immunoglobulin-like fold. This structural disparity might create a region of proteolytic sensitivity at the point of transition between the two domains of GDI. The size of the major fragment (17 kDa) resulting from recombinant GDI proteolysis in the presence of various membranes is compatible with cleavage occurring at the hinge zone of the protein.

Different reagents and classes of protease inhibitors were tested for ability to block the proteolysis of GST-GDI in the presence of kidney BBM. While the cysteine alkylating agent iodoacetamide is unable to protect GST-GDI from proteolysis, the more hydrophobic agent phenylmaleimide partly inhibits GST-GDI cleavage. This suggests that a cysteine protease bound to kidney membranes could be responsible for the cleavage of GST-GDI. Furthermore, the observation that Ac-YVAD-CHO, a tetrapeptide inhibitor of some members of the caspase family, strongly inhibits GDI proteolysis suggests that the cysteine protease involved in this process could be a caspase. In addition, the proteolysis of recombinant GDI is not inhibited by E-64. This agrees with the fact that ICE-like proteases, in contrast to other cysteine proteases, are insensitive to the effects of E-64 [57].

Interestingly, the chelating reagent EDTA also partly blocks the proteolysis of recombinant GDI suggesting that a metalloprotease is participating in this cleavage. Together, the results obtained with Ac-YVAD-CHO and EDTA clearly indicate that several proteases, including a caspase-like protease and a metalloprotease, could modulate the regulatory activity of GDI on Rho proteins of kidney BBM via proteolysis.

Although caspase-mediated proteolysis was previously reported for the closely related D4GDI protein [27-28] (Fig. 7), the same proteolytic event is not expected for GDI since it lacks a similar caspase recognition sequence motif. In agreement with this, recombinant GDI was shown to not be cleaved to a 17 kDa fragment by recombinant ICE [28]. Amino acid sequencing of the major 17 kDa fragment resulting from GST-GDI proteolysis in the presence of

kidney BBM revealed that cleavage takes place after Ala⁶³ within the GDI sequence ⁶⁰AVSADP⁶⁵ (Fig. 7). This cleavage site of GST-GDI is not compatible with caspase activity. However, proteolytic cleavage of GST-GDI at Ala⁶³ is sensitive to the ICE inhibitor Ac-YVAD-CHO when incubated with BBM *in vitro*. Although this does not demonstrate direct catalytic activity in GDI proteolysis for caspase in kidney, it supports indirect participation through a proteolytic cascade in this tissue. In agreement with this possibility, different members of the caspase family are known to be present in kidney [43, 58].

We have shown that cleavage of GDI at Ala⁶³ leads to the loss of its ability to extract Rho proteins from membranes. Similar *in vitro* cleavage of D4GDI at Asp⁵⁵ suppresses its ability to inhibit GDP dissociation from Rho proteins [28]. Since cleavage occurs at near adjacent positions on the two proteins, proteolytic cleavage of an N-terminal flexible portion appears to be a generalized way of regulating the activity of different members of the GDI family. Inhibition of GDI function is expected to have marked consequences on the regulation of Rho protein activities and thus on cytoskeleton organization. For example, the failure of cleaved GDI to inhibit nucleotide exchange on Rho proteins could result in an increased activation of the cytosolic pool of Rho. Additionally, the inability of cleaved GDI to extract membrane-bound Rho proteins could have marked effects on signaling pathways activated by these small G proteins. Loss of the regulation of both Rho protein activities and targeting, due to a deficient GDI, would likely result in the assembly of inappropriate actin cytoskeletal structures. Furthermore, given the known involvement of caspases in apoptosis, cleavage of GDI

family members by caspase activity might contribute to the disabling of cytoskeletal functions that is associated with apoptotic processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Alan Hall for providing the GST-GDI plasmid and Dr. Sylvie Bourassa from the Eastern Quebec Peptide Sequencing Facility for analysing the amino acid sequence of the GST-GDI fragment. We are grateful to Dr. Denis Gingras for the production of recombinant GST-GDI protein in bacteria and for many helpful discussions. D.B. is a recipient of a fellowship from the Medical Research Council of Canada. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to R.R.D and from the Kidney Foundation of Canada to R.B.

ABBREVIATIONS

Ac-YVAD-CHO, acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyde; BBM, brush border membrane; CAPS, 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid; E. coli, Escherichia coli; GDI, GDP dissociation inhibitor; GST, glutathione S-transferase; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; ICE, interleukin-1 β -converting enzyme; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; PVDF, polyvinylidene difluoride membranes; TBS, Tris-buffered saline; Tris, tris(hydroxymethyl) aminomethane.

REFERENCES

- 1 Boivin, D., Bilodeau, D. and Béliveau, R. (1996) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**, 801-810
- 2 Gutkind, J.S. and Vitale-Cross, L. (1996) *Cell Dev. Biol.* **7**, 683-690
- 3 Lim, L., Hall, C. and Monfries, C. (1996) *Cell Dev. Biol.* **7**, 699-706
- 4 Collard J.G. (1996) *Int. J. Oncology* **8**, 131-138
- 5 Narumiya, S. (1996) *J. Biochem.* **120**, 215-228
- 6 Olson, M.F., Ashworth, A. and Hall, A. (1995) *Science* **269**, 1270-1272
- 7 Molnar, A., Theodoras, A.M., Zon, L. I. and Kyriakis, J.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13229-13235
- 8 Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Pérez, I., Bravo, R. and Lacal, J.C. (1997) *Genes Dev.* **11**, 463-475
- 9 Denhardt, D.T. (1996) *Biochem J.* **318**, 729-747
- 10 Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1996) *Bioessays* **18**, 567-577
- 11 Vojtek, A.B. and Cooper, J.A. (1995) *Cell* **82**, 527-529
- 12 Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lütcke, A., Parton, R.G. and Zerial, M. (1996) *Nature* **384**, 427-432
- 13 Foster, R., Hu, K.-Q., Lu, Y., Nolan, K.M, Thissen, J. and Settleman J. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2689-2699
- 14 Murphy, A.M. and Montell, D.J. (1996) *J. Cell Biol.* **133**, 617-630
- 15 Ridley, A.J. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1256-1264
- 16 Boivin D. and Béliveau R. (1995) *Am. J. Physiol.* **269**, F180-F189

- 17 Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. and Takai, Y. (1990) *Oncogene* **5**, 1321-1328
- 18 Hancock, J.F. and Hall, A. (1993) *EMBO J.* **12**, 1915-1921
- 19 Hart, M. J., Maru, Y., Leonard, D., Witte, O.N., Evans, T. and Cerione, R.A. (1992) *Science* **258**, 812-815
- 20 Bokoch, G.M., Bohl, B.P. and Chuang, T.-H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31674-31679
- 21 Leonard, D., Hart, M.J., Platko, J.V., Eva, A., Henzel, W., Evans, T. and Cerione, R.A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22860-22868
- 22 Isomura, M., Kikuchi, A., Ohga, N. and Takai, Y. (1991) *Oncogene* **6**, 119-124
- 23 Lelias, J.M., Adra, C.N., Wulf, G. M., Guillemot, J. C., Khagad, M., Caput, D. and Lim, B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1479-1483
- 24 Scherle, P., Behrens, T. and Staudt, L.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7568-7572
- 25 Adra, C.N., Manor, D., Ko, J.L., Zhu, S., Horiuchi, T., Van Aelst, L., Cerione, R.A. and Lim, B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4279-4289
- 26 Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honore, N., Rousseau-Merck, M.F., Tavitian, A. and Olofsson, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30366-30374
- 27 Na, S., Chuang, T.-H., Cunningham, A., Turi, T.G., Hanke, J.H., Bokoch, G.M. and Danley, D.E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 11209-11213

- 28 Danley, D.E., Chuang, T.-H. and Bokoch, G.M. (1996) *J. Immunol.* **157**, 500-503
- 29 Nagata, S. (1997) *Cell* **88**, 355-365
- 30 Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A (1997) *Trends. Biochem. Sci.* **22**, 299-306
- 31 Margolin, N., Raybuck, S.A., Wilson, K.P., Chen, W., Fox, T., Gu, Y. and Livingston, D.J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 7223-7228
- 32 Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J. A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D. and Wong, W.W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9677-9682
- 33 Thornberry, N. A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F J., Chin, J., Ding, G.J.G., Egger, L.A., Gaffney, E.P., Limjuco, G., Palyha, O.C., Raju, S.M., Rolando, A.M., Salley, J.P., Yamin, T.T., Lee, T.D., Shively, J.E., MacCross, M., Mumford, R.A., Schmidt, J.A. and Tocci, M.J. (1992) *Nature* **356**, 768-774
- 34 Martin, S.J. and Green, D.R. (1995) *Cell* **82**, 349-352
- 35 Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y.A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8395-8400
- 36 Brancolini, C., Benedetti, M. and Schneider, C. (1995) *EMBO J.* **14**, 5179-5190
- 37 Caulin, C., Salvesen, G.S. and Oshima, R.G. (1997) *J. Cell Biol.* **138**, 1379-1394

- 38 Cryns, V.L., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H. and Yuan, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31277-31282
- 39 Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D.K., Nicholson, D.W. and Tsuruo, T. (1997) *Oncogene* **14**, 1007-1012
- 40 Wen, L.-P., Fahrni, J.A., Troie, S., Guan, J.-L., Orth, K. and Rosen, G. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26056-26061
- 41 Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. and Williams, L.T. (1997) *Science* **278**, 294-298
- 42 Miura, M., Friedlander, R.M. and Yuan, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8318-8322
- 43 Tomita, Y., Kawasaki, T., Bilim, V., Takeda, M. and Takahashi, K. (1996) *Int. J. Cancer* **68**, 132-135
- 44 Kuida, K., Lippke, J., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S. and Flavell, R.A. (1995) *Science* **267**, 2000-2003
- 45 Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweig, E.A. and Yuan, J. (1993) *Cell* **75**, 653-660
- 46 Casciola-Rosen, L.A., Miller, D. K., Anhalt, G.J. and Rosen, A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 30757-30760
- 47 Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. (1993) *Cancer Res.* **53**, 3976-3985
- 48 Neamati, N., Fernandez, A., Wright, S., Kiefer, J. and McConkey, D.J. (1995) *J. Immunol.* **154**, 3788-3795
- 49 Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., LaBelle, M., Lazebnik, Y.A.,

- Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.-T., Yu, V.L. and Miller, D.K. (1995) *Nature* **376**, 37-43
- 50 Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- 51 Booth, A.G. and Kenny, A.J. (1974) *Biochem J.* **142**, 575-581
- 52 Gingras, D., Boivin, D. and Béliveau, R. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, F316-F322
- 53 Self, A.J. and Hall, A. (1995) *Methods Enzym.* **256**, 3-10
- 54 Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- 55 Keep, N.H., Barnes, M., Barsukov, I., Badii, R., Lian, L.Y., Segal, A.W. Moody, P.C., Roberts, G.C. (1997) *Structure* **5**, 623-633
- 56 Gosser, Y.Q., Nomanbhoy, T.K., Aghazadeh, B., Manor, D., Combs, C., Cerione, R.A. and Rosen, M.K. (1997) *Nature* **387**, 814-819
- 57 Black, R.A., Kronheim, S.R. and Sleath, P.R. (1989) *FEBS Lett.* **247**, 386-390
- 58 Krajewska, M., Wang, H.-G., Krajewski, S., Zapata, J.M., Shabaik, A., Gascoyne, R. and Reed, J.C. (1997) *Cancer Res.* **57**, 1605-1613

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 GDI and GST-GDI cleavage in the presence of BBM. Recombinant GDI or GST-GDI (0.36 μ M) were incubated with membranes (20 μ g of protein), in 20 mM Hepes/Tris (pH 7.2) for 60 min at 37°C, in the presence or absence of KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ l. Following incubation, membranes were rapidly chilled on ice and centrifuged at 40 000 X g for 30 min at 4°C. Supernatant proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with a GDI-specific polyclonal antibody as described under Materials and Methods section. Control (Ctl) GDI and GST-GDI were directly solubilized in Laemmli's sample buffer. This result is representative of two experiments done in duplicate.

Figure 2 Kinetic analysis of GST-GDI cleavage in the presence of BBM. GST-GDI (0.36 μ M) and membranes (20 μ g of protein) were incubated in 20 mM Hepes/Tris (pH 7.2) for the indicated time periods at 37°C, in the presence or absence of KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ l. Following incubation, membranes were rapidly chilled on ice and centrifuged at 40 000 X g for 30 min at 4°C. Supernatant proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with a GDI-specific polyclonal antibody, as described under Materials and Methods section. Control (Ctl) proteins were directly solubilized in sample buffer. This result is representative of two experiments done in duplicate.

Figure 3. Stimulation of BBM-mediated GST-GDI cleavage by increasing ionic strength. GST-GDI (0.36 μ M) and membranes (20 μ g of

protein) were incubated in 20 mM Hepes/Tris (pH 7.2) for 60 min at 37°C, in the presence of increasing concentrations of KCl in a final volume of 30 μ l. Following incubation, membranes were rapidly chilled on ice and centrifuged at 40 000 X *g* for 30 min at 4°C. Supernatant proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with a GDI-specific polyclonal antibody, as described under Materials and Methods section. Control (Ctl) proteins were directly solubilized in sample buffer. This result is representative of two experiments done in duplicate.

Figure 4. Tissue distribution of GST-GDI proteolysis. Crude membranes obtained from different tissues and kidney brush border membranes (20 μ g of protein) were incubated with GST-GDI (0.36 μ M) in 20 mM Hepes/Tris (pH 7.2) for 60 min at 37°C, in the presence (+) or absence (-) of KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ l. Following incubation, membranes were rapidly chilled on ice and centrifuged at 40 000 X *g* for 30 min at 4°C. Supernatant proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with a GDI-specific polyclonal antibody, as described under Materials and Methods section. Control (Ctl) proteins were directly solubilized in sample buffer. This result is representative of two experiments done in duplicate.

Figure 5. Effects of protease inhibitors on GST-GDI cleavage in BBM. Membranes (20 μ g of protein) were pre-incubated in 20 mM Hepes/Tris (pH 7.2) for 20 min at room temperature in the presence of 10 μ M E-64 , 1 μ M Ac-YVAD-CHO, 15 mM phenylmaleimide, 15 mM iodoacetamide, 3 mM EDTA, 300 μ M captopril, 0.03 μ g/ μ l aprotinin or 30 μ M pepstatin. Following the

addition of GST-GDI (0.36 μ M) the incubation was prolonged for an additional 60 min at 37°C, with (+) and without (-) KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ l. Membranes were then rapidly chilled on ice and centrifuged at 40 000 X *g* for 30 min at 4°C. Supernatant proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with a GDI-specific polyclonal antibody, as described under Materials and Methods section. Control (Ctl) proteins were directly solubilized in sample buffer. This result is representative of two experiments done in duplicate.

Figure 6. Dose-dependent inhibition of GST-GDI cleavage by the tetrapeptide Ac-YVAD-CHO. Kidney brush border membranes (20 μ g of protein) were pre-incubated in 20 mM Hepes/Tris (pH 7.2) for 20 min at room temperature with various concentrations of Ac-YVAD-CHO. Following the addition of GST-GDI (0.36 μ M) the incubation was prolonged for an additional 60 min at 37°C, with (+) and without (-) KCl (150 mM) in a final volume of 30 μ l. Membranes were then rapidly chilled on ice and centrifuged at 40 000 X *g* for 30 min at 4°C. Supernatant proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with a GDI-specific polyclonal antibody as described under Materials and Methods section. Control (Ctl) proteins were directly solubilized in sample buffer. This result is representative of two experiments done in duplicate.

Figure 7. Schematic structure and fragments resulting from proteolytic cleavage of GDI and D4GDI. The Ac-YVAD-CHO-sensitive cleavage site generated on GST-GDI upon incubation with kidney BBM is indicated. This result is compared to a known cleavage site previously

obtained by trypsin treatment of GDI [55] and to those observed by incubation of D4GDI with CPP32 and ICE [27-28]. Cleavage occurs after Arg⁵⁸ and Ala⁶³ on GDI and after Asp¹⁹ and Asp⁵⁵ on D4GDI.

Figure 8. Proteolytic cleavage of GST-GDI inhibits it from releasing Rho proteins from BBM. GST-GDI (0.36 μ M) was pre-incubated in 20 mM Hepes/Tris (pH 7.2) for 1 h at 37°C, in the presence of BBM (20 μ g of protein), with and without KCl (150 mM), in the presence or absence of Ac-YVAD-CHO (10 μ M), as indicated under each panel. Following preincubation, membranes were pelleted at 100 000 X *g* for 30 min at 4°C. Supernatants containing truncated and/or intact GST-GDI were dialyzed against 20 mM Hepes/Tris (pH 7.2) for 2 h in a cold room to remove KCl. Dialyzed truncated and/or intact GST-GDI were reincubated for 15 min at 20°C with fresh BBM (20 μ g of protein) in the absence of KCl to measure their ability to extract Rho proteins from BBM. Membranes were then rapidly chilled on ice and centrifuged at 40 000 X *g* for 30 min at 4°C to separate supernatants (S) from pellets (P). Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. The state, intact or truncated, of GST-GDI following preincubation is shown (A). The releasing activity of these preparations of GST-GDI on Cdc42 (B) and RhoA (C) is presented. These results are representative of two experiments.

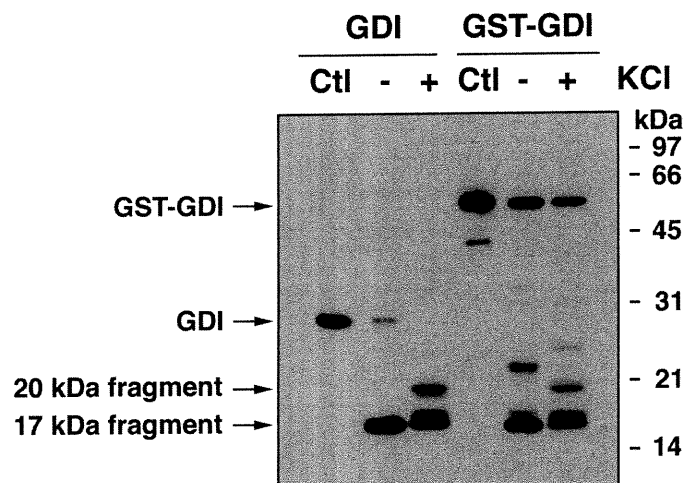


FIGURE 1. GDI and GST-GDI cleavage in the presence of BBM

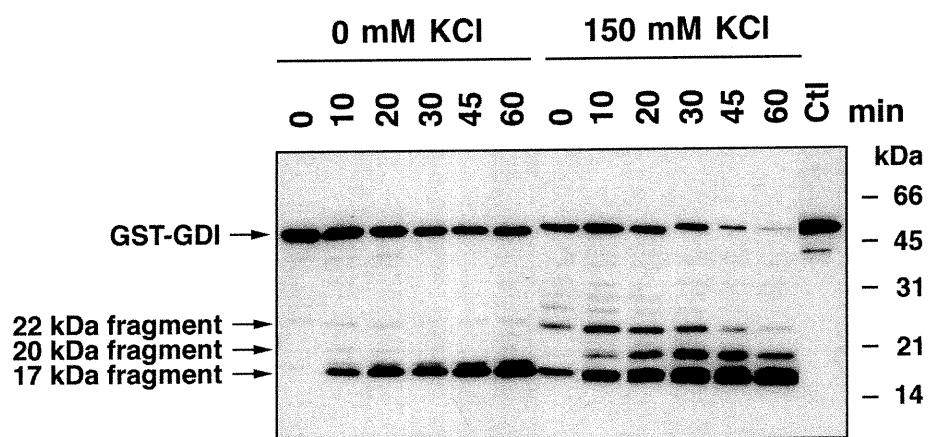


FIGURE 2. Kinetic analysis of GST-GDI cleavage in the presence of BBM

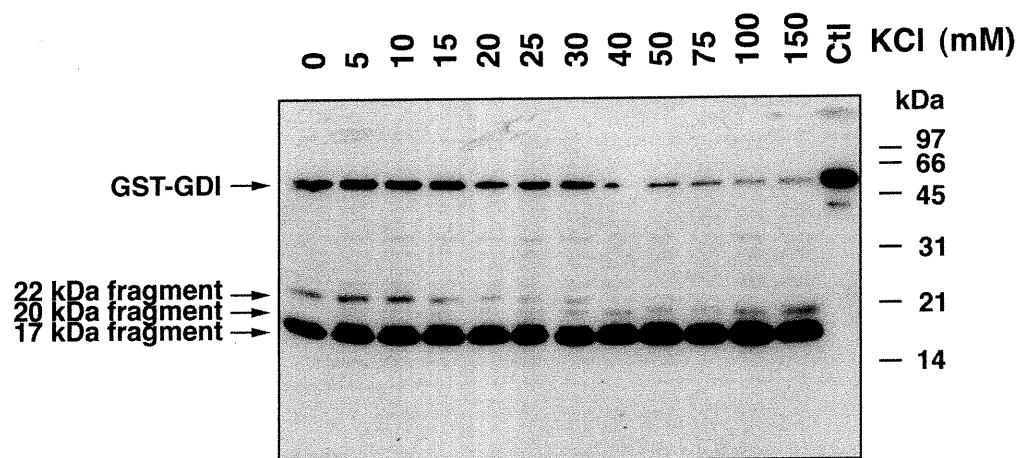


FIGURE 3. Stimulation of BBM-mediated GST-GDI cleavage by increasing ionic strength

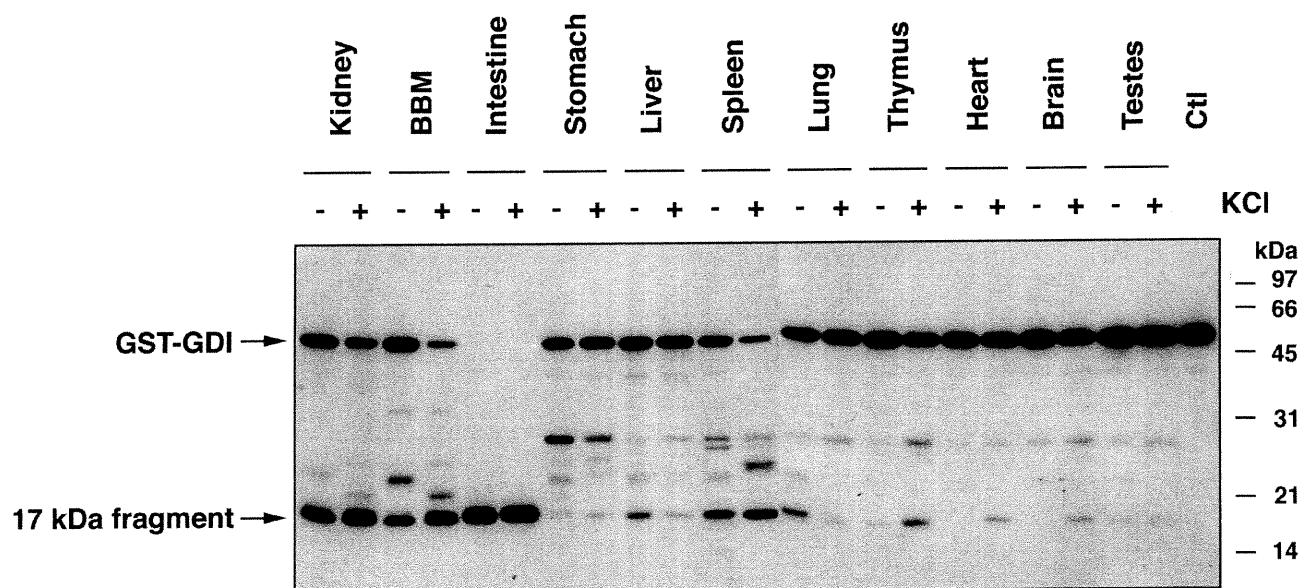


FIGURE 4. Tissue distribution of GST-GDI proteolysis

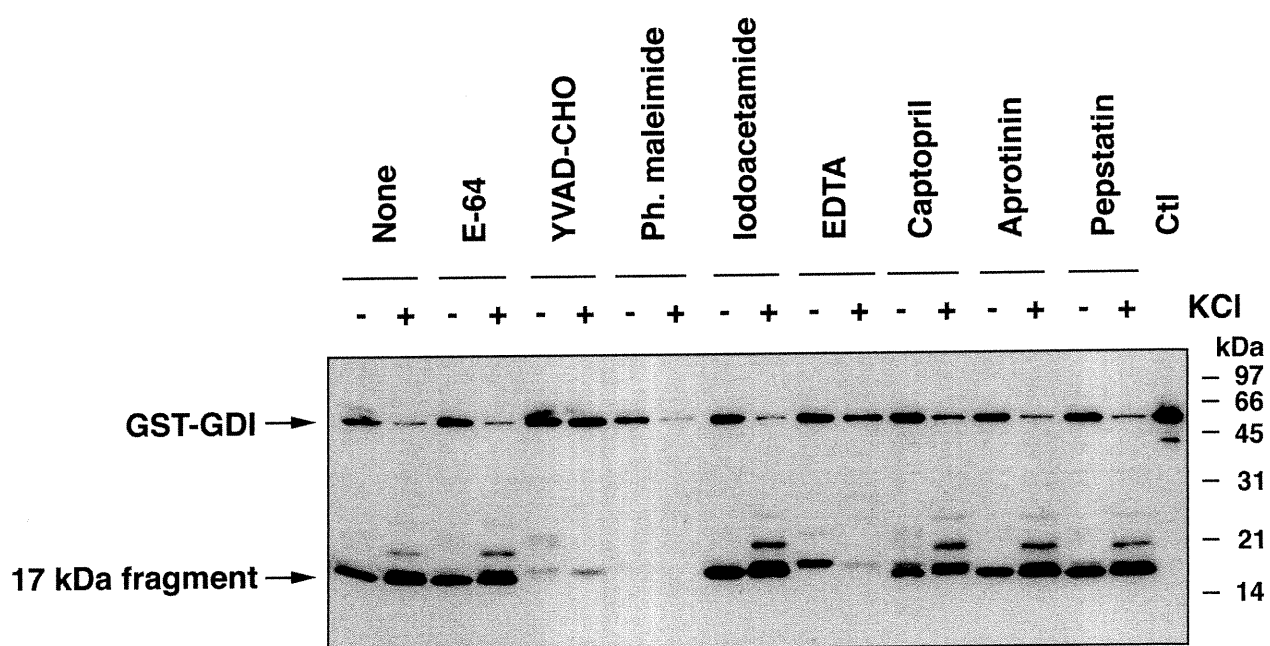


FIGURE 5. Effects of protease inhibitors on GST-GDI cleavage in BBM

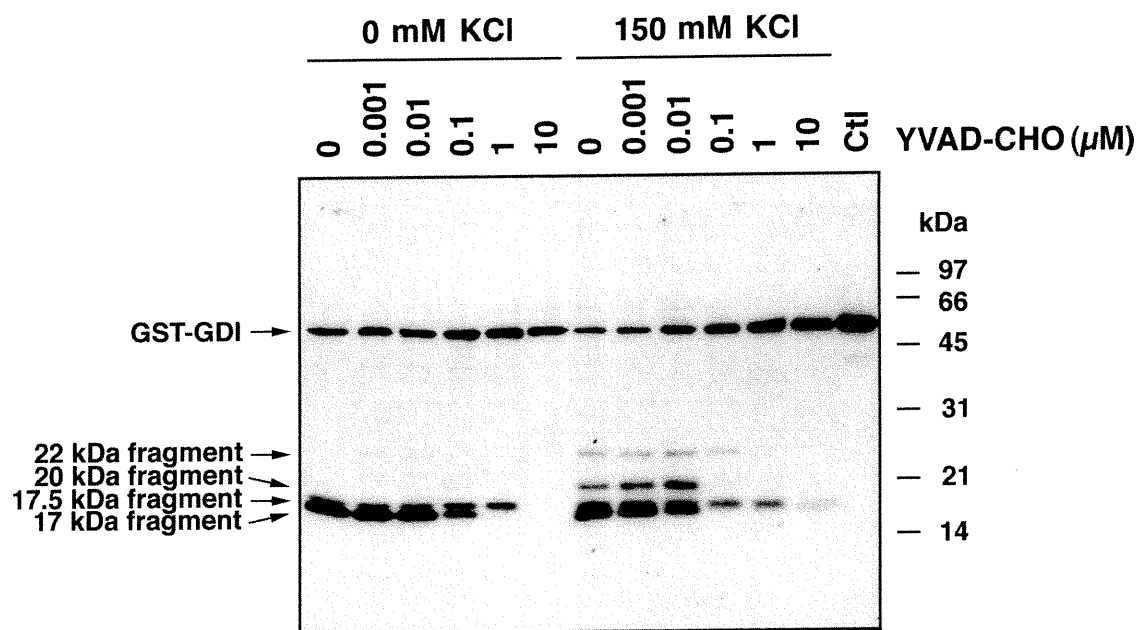


FIGURE 6. Dose-dependent inhibition of GST-GDI cleavage by the tetrapeptide Ac-YVAD-CHO

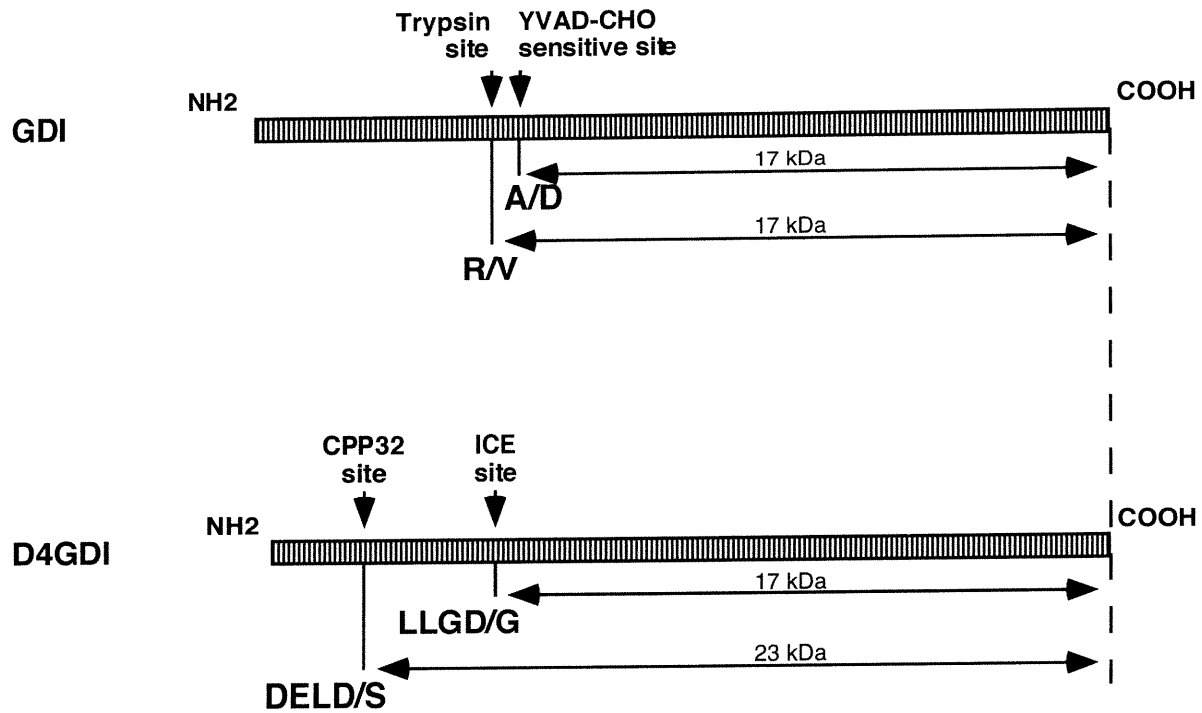


FIGURE 7. Schematic structure and fragments resulting from proteolytic cleavage of GDI and D4GDI

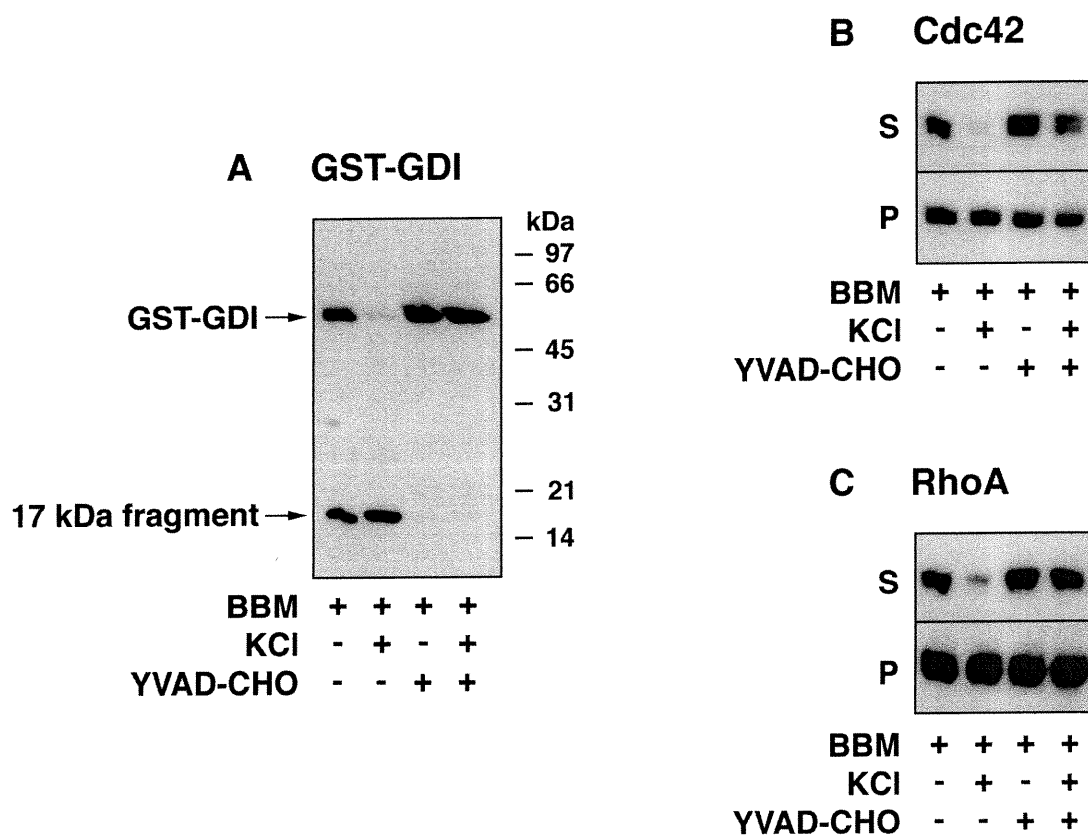


FIGURE 8. Proteolytic cleavage of GST-GDI inhibits it from releasing Rho proteins from BBM

2.4 Inhibition of GTP γ S-dependent L-isoaspartyl protein methylation by tyrosine kinase inhibitors in kidney

Diane BILODEAU and Richard BÉLIVEAU*

Laboratoire d'oncologie moléculaire, Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal et Centre d'oncologie Charles Bruneau, Hôpital Ste-Justine, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

Short title: Regulation of protein isoaspartyl methylation in kidney.

Key words: protein isoaspartyl methylation, phosphorylation, GTP γ S, kidney.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: (514) 987-3000, ext. 8551

Fax: (514) 987-4054

E-mail: oncomol@er.uqam.ca

OBJECTIFS

L'activité de méthylation des protéines sur résidus aspartyles est réputée participer à la réparation de protéines endommagées. Des résultats antérieurs, publiés par notre laboratoire, ont montré une stimulation de cette activité dans la fraction soluble par les nucléotides guanylés non hydrolysables, suggérant la participation d'une petite protéine G. Dans un effort pour caractériser la voie de signalisation stimulée par cette protéine G, nous avons examiné l'effet de divers inhibiteurs et stimulateurs sur l'activité de la méthyltransférase, en présence et en absence de GTP γ S. Nos résultats suggèrent la mobilisation d'une voie tyrosine kinase lors de la stimulation de l'activité méthyltransférase par les nucléotides guanylés.

ABSTRACT

Protein carboxyl methylation in rat kidney cytosol is increased by addition of guanosine 5'-O-[γ -thio]triphosphate (GTP γ S), a non-hydrolyzable analog of GTP. GTP γ S-stimulated methyl ester group incorporation occurs on isoaspartyl residues as attested by the alkaline sensitivity of the labelling and its competitive inhibition by L-isoaspartyl-containing peptides. GTP γ S was the most potent nucleotide tested while GDP β S and ATP γ S also stimulated methylation but to a lesser extent. Maximal stimulation (5-fold) of protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) activity by GTP γ S was reached at a physiological pH in the presence of 10 mM MgCl₂. Other divalent cations, such as Cu²⁺, Zn²⁺ and Co²⁺ (100 μ M), totally inhibited GTP γ S-dependent carboxyl methylation. The phosphotyrosine phosphatase inhibitor vanadate potentiated the GTP γ S stimulation of PIMT activity in kidney cytosol at concentration lower than 40 μ M, but increasing vanadate concentration over 40 μ M resulted in a dose-dependent inhibition of the GTP γ S effect. The tyrosine kinase inhibitors genistein (IC₅₀= 4 μ M) and tyrphostin (IC₅₀= 1 μ M) abolished GTP γ S-dependent PIMT activity by different mechanisms, as was revealed by acidic gel analysis of methylated proteins. While tyrphostin stabilized the methyl ester groups, genistein acted by blocking a crucial step required for the activation of PIMT activity by GTP γ S. The results obtained with vanadate and genistein suggest that tyrosine phosphorylation regulates GTP γ S-stimulated PIMT activity in kidney cytosol.

Abbreviations: AdoHcy, S-adenosyl-L-homocysteine; AdoMet, S-adenosyl-L-methionine; ADP β S, adenosine 5'-O-[β -thio]diphosphate; AFC, acetyl farnesyl cysteine; AMP-PNP, adenylyl-5'-imidodiphosphate; ATP γ S, adenosine 5'-O-[γ -thio]triphosphate; DMSO, dimethylsulfoxide; DSIP-isoD, δ -sleep-inducing peptide; GDP β S, guanosine 5'-O-[β -thio]diphosphate; GMP-PNP, guanosyl-5'-imidodiphosphate; GTP γ S, guanosine 5'-O-[γ -thio]triphosphate; Hcy, homocysteine; PPMT, prenylated protein methyltransferase; PIMT, protein isoaspartyl carboxyl methyltransferase.

INTRODUCTION

Protein carboxyl methylation is a widespread post-translational modification [1-4]. Four types of carboxyl methylation have been identified so far, differentiated by the nature of the modified amino acids. In bacteria, side-chain methylation-demethylation reactions at glutamyl residues of chemotactic receptors seem to act as a desensitizer to ensure that the cell vectorially responds only to changes in the level of chemoattractants and not to sustained high levels [5]. In eukaryotes, C-terminal methylation of isoprenylated cysteine residues by the membrane-associated prenylated cysteine protein methyltransferase (PCMT) might participate in membrane attachment of small G proteins [6]. A eukaryotic C-terminal leucine methyltransferase, which modifies the catalytic subunit of protein phosphatase 2a, was recently identified [7,8]; the role of this modification is not clear at the moment, but it appears that methylation at this site is modulated during the cell cycle [9]. Finally, methylation of the free α -carboxyl groups of atypical isoaspartyl residues by L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) (E.C. 2.1.1.77), which is found in vertebrates as well as in invertebrates, bacteria, plants and fungus [10,11], has been postulated to act as a repair system for damaged proteins [1, 2,12].

PIMT is a monomeric protein of 25-27 kDa [13] which is mainly cytosolic but is also found in membrane-associated forms [14-20]. The enzyme has a broad spectrum of substrates because it recognizes β -isoaspartyl linkages arising on proteins from spontaneous deamidation or racemization of asparaginyl and aspartyl residues [21]. The methyl esters formed are susceptible to alkaline treatment and hydrolyze spontaneously even at neutral pH [22]. Methylation at these impaired sites

can partially restore activity to deaminated calmodulin [23] and to HPr, a phosphocarrier found in *Escherichia coli* [24].

The importance of PIMT activity for cell survival was recently illustrated by the characterization of PIMT-negative mutants in *E. coli* [25] and mouse [26]. Consistent with the hypothesis of harmful accumulation of altered proteins in the absence of the methyltransferase, deletion mutation in bacteria decreases the survival of cells in stationary phase, especially under stress conditions, without affecting those in exponential growth [25]. Similarly, homozygous *pimt* (-/-) knockout mice also accumulate PIMT substrates, show growth retardation and die from fatal seizures at around 42 days of age [26]. Interestingly, heterozygous mice produced no particular phenotype although expressing only half the normal level of PIMT [26]. Clearly, enzyme activity is not saturated by endogenous substrates *in vivo*.

PIMT expression and activity are developmentally regulated [27-34] with some degree of tissue specificity [30, 33]. Both mRNA and protein levels usually increase in parallel during aging, suggesting that PIMT regulation occurs mainly at the transcriptional level [28, 29]. The promotor for the human gene contains nucleotide sequences corresponding to antioxidant and xenobiotic response elements, suggesting that PIMT expression might be sensitive to such agents [35]. The human gene also possesses multiple estrogen-responsive elements that may account for some reported age and sex-specific differences in PIMT activity [35, 36]. Hormonal regulation of expression and activity was also present in plant tissues, where the methyltransferase could be induced, during seedlings, in response to abscisic acid [37].

Control of PIMT activity may also occur at the protein level. For instance, enzymatic efficiency is influenced by the intracellular *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet) /*S*-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy) ratio. As shown recently, an increased AdoHcy level, resulting from accumulation of homocysteine, accounts for the reduced methyltransferase activity seen in chronic renal failure [38]. Regulation of PIMT activity by post-translational modification has not been demonstrated but, interestingly, PIMT is capable of automethylation [39]. The presence of a phosphorylated form was previously suggested based on the change in chromatographic behavior of a PIMT isozyme following protein phosphatase S treatment [40].

Our laboratory has previously reported an up-regulation of renal PIMT activity which is modulated by guanine nucleotides in a dose-dependent way [41] and, for cytosolic PIMT, seems to be unique to the kidney [41]. This study presents evidence that the GTP γ S-stimulated methylation observed in kidney cortex cytosol occurs on proteins containing altered aspartyl residues. A link between methylation and phosphorylation was established since both genistein, an inhibitor of protein tyrosine kinases, and vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, inhibited the stimulative effect of the guanine nucleotide analog on PIMT activity. These results suggest that phosphorylation regulates the GTP γ S-dependent carboxyl methylation and provides new perspectives for the study of isoaspartyl methylation.

MATERIAL AND METHODS

Materials

S-adenosyl-L-[methyl-³H]methionine (69.5-73 Ci/mmol) was from DuPont-New England Nuclear (Boston, MA). Nucleotides and protein A-Sepharose were from Sigma Chemical (St-Louis, MO). Phosphatase and kinase inhibitors were purchased from Gibco (Grand Island, NY) and Calbiochem (La Jolla, CA). The δ -sleep-inducing peptide containing an isoaspartyl residue (DSIP-isoD) was obtained from Bachem (Philadelphia, PA). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, Ont, Canada).

Tissue fractionation

Sprague-Dawley male rats (300-350 g) were anesthetized with CO₂ and killed by decapitation. The kidneys were then quickly removed and chilled in an ice-cold saline solution. Minced tissues were homogenized with a tight-fitting glass/Teflon motorized homogenizer in 8 volumes of 250 mM sucrose/ 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5. Unbroken cells and nuclei were sedimented by centrifugation at 1 000 xg for 10 min. The resulting supernatants were centrifuged at 100 000 xg for 60 min. The high-speed supernatant was used as a source of cytosolic proteins. Protein content was measured with the Bradford method [42].

Phosphorylation reactions

Endogenous phosphorylation of kidney cytosolic proteins (300 μ g) was carried out for 5 minutes at 30°C, in the presence of 10 μ M ATP, 10 mM MgCl₂, 100 μ M

sodium vanadate, 25 mM Hepes/Tris/pH 7.2 in a final volume of 100 μ L. Where required, aliquots containing 50 μ g of proteins were subsequently used for methylation reactions.

Methylation reactions

Cytosolic proteins (50 μ g) from kidney were incubated for 60 min at 37°C in a medium containing 10 μ M (2-3 μ Ci) *S*-adenosyl-L-[*methyl*-³H]methionine and 100 mM Hepes/Tris buffer, pH 7.5 in a final volume of 30 μ l. For GTP-dependent methylation, 100 μ M GTP γ S was added. For the quantification of total endogenous carboxyl methylation rate, reactions were stopped by adding an equal volume of 1% SDS in 0.2 M NaOH to hydrolyze the methyl esters on acceptor proteins. The PIMT methyltransferase activity was then measured by a methanol vapor diffusion assay [43], which detects methanol resulting from hydrolysis of methyl esters present on proteins at the end point of the reaction in addition to the methanol resulting from protein methyl ester turnover that accumulated during the length of the reaction [44]. For acidic gel electrophoresis analysis of methylated proteins, the reaction was stopped by adding an equal volume of 16-BAC sample buffer.

Acidic gel electrophoresis

In order to preserve the methyl esters formed on isoaspartyl residues, proteins (50 μ g) were separated by 16-BAC acidic gel electrophoresis using the method of Macfarlane [45] with minor modifications. Electrophoresis was performed overnight in 1.5 mm-thick, 9 % polyacrylamide-3M urea gels, at a constant current of 40 mA. Due to the lability of the methyl esters, the samples were not boiled prior to loading. Following

electrophoresis, gels were fixed, stained and destained as described in Gingras *et al.* [17], then soaked in 1M sodium salicylate acidified with 10 mM acetic acid. Gels were dried and exposed to Kodak XAR films at -80°C for at least one month. Molecular weight determination was performed using the following standards: β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21 kDa) and lysozyme (14.5 kDa).

Note : it is important to bare in mind that there is a fundamental difference between the two methods used here to quantify PIMTII activity. Acidic gel electrophoresis will give an instant flash picture of the methylated proteins at the end point of the reaction. On the other hand, the methanol vapor diffusion assay will give a measure of the methyl esters turnover on the accepting proteins for the length of the assay.

RESULTS

Identification of the methylation reaction stimulated in the presence of GTP γ S

According to previous studies using rat kidney cortex, endogenous cytosolic methylated proteins with apparent molecular weights of 14, 16, 27, 30, 36, 43, 47 and 48 kDa could be separated on acidic gel following incubation in the presence of [3 H]AdoMet [17, 34, 41] (Fig. 1, lane 1). Addition of 100 μ M GTP γ S (a non-hydrolyzable analog of GTP) to kidney soluble proteins increased the labelling of all these methyl acceptors by different amounts, varying from 2- to 5-fold (Fig. 1, lane 3). Furthermore, additional labelled proteins of 22, 25, 53, 56 and 65 kDa were also detected in the presence of the guanine nucleotide (Fig. 1, lane 3 vs lane 1). Except for the major methylated substrate migrating at 36 kDa, the increased labelling induced by GTP γ S did not survive the mild alkaline conditions (pH 8.8) of Laemmli's SDS-PAGE (data not shown) indicating that the methylation was likely occurring on isoaspartyl residues [46]. To verify this assumption, methylation reactions were conducted in the presence or absence of 1 mM δ -sleep-inducing peptide containing an L-isoaspartyl residue (DSIP-isoD), which is a known substrate for PIMT [47]. Addition of DSIP-isoD reduced the labelling on most methyl-acceptor proteins except for the 36 kDa substrate, in both the absence (Fig. 1, lane 2) and presence of GTP γ S (Fig. 1, lane 4), confirming that, with or without GTP γ S, methylation reactions were occurring on isoaspartyl residues of PIMT substrates.

Biochemical characterization of the carboxyl methylation stimulated by nucleotides in kidney cytosol

We next addressed the nucleotide specificity of this stimulatory effect on methylation reactions in kidney cytosol. When PIMT activity was measured by the methanol diffusion assay [43], it showed a 2.5-fold increase in the presence of GTP γ S and a 1.5-fold increase in the presence of GDP β S, but was not significantly affected by GDP, GTP, AMP-PNP, ATP or ADP β S (Table I). Stimulation of PIMT activity did not appear to be specific for guanine nucleotides since ATP γ S, a non-hydrolyzable analog of ATP which can be used as a phosphatase inhibitor, also increased the methylation level up to 1.8-fold (Table I). Nevertheless, effects of GTP γ S and ATP γ S were not additive, suggesting some kind of competitive convergence on a common signaling pathway (Table I).

Fig. 2 illustrates the effects of divalent ions (all chloride salts) on basal and GTP γ S-stimulated methylation activities. The GTP γ S-dependent methylation activity was slightly increased as external Mg²⁺ concentration was varied from 10 μ M to 1 mM but strongly increased at higher Mg²⁺ concentrations. At 10 mM Mg²⁺, the GTP γ S-stimulated methylation was twice that observed in absence of this ion. On the other hand, Mg²⁺ had no effect on basal methylation suggesting that this ion acted as an essential cofactor for the GTP γ S-dependent carboxyl methylation in kidney cytosol. Of the other divalent cations tested, Cu²⁺, Zn²⁺ and Co²⁺ caused complete inhibition of GTP γ S-dependent methylation at a concentration of 100 μ M.

Effects of phosphatase and kinase inhibitors on PIMT activity in kidney cytosol

Various classes of phosphatase inhibitors were used in an effort to discriminate between possible cellular pathways involved in the GTP γ S stimulation of PIMT activity (Table II). The serine/threonine phosphatase inhibitors okadaic acid and microcystin, as well as NaF, had no effect on either basal or GTP γ S-dependent PIMT activities. However, the tyrosine phosphatase inhibitor vanadate, at 200 μ M, slightly reduced the GTP γ S-dependent stimulation of methylation, without affecting basal PIMT activity (Table II). Surprisingly, a dose-response curve revealed a dual effect of vanadate on protein methylation in the presence of GTP γ S. Addition of vanadate at concentrations lower than 40 μ M potentiated the nucleotide effect while higher concentrations reduced it (Fig. 3).

Tyrosine kinase inhibitors were also tested for their effects on carboxyl methylation in the presence and absence of GTP γ S. Neither lavendustin A nor herbimycin showed any effect that was significantly different from that of DMSO, their solvent, which was itself slightly stimulatory to methylation in the presence of GTP γ S (Table II). The water soluble tyrosine kinase inhibitor RCAM lysozyme was also without effect. In contrast, genistein and tyrphostin completely abolished the GTP γ S-dependent methylation activity (Table II). The inhibitory effects of both genistein and tyrphostin were dose-dependent with IC₅₀ values of 4 μ M and 1 μ M respectively (Fig. 4A and B). In addition, tyrphostin but not genistein inhibited basal methylation up to 50% (Fig. 4B). Therefore, the results obtained with phosphatase and kinase inhibitors indicate a key role for tyrosine phosphorylation in the regulation of GTP γ S-stimulated carboxyl methylation in kidney cytosol.

Effects of phosphorylation on the methylation of endogenous substrates in kidney cytosol

To study the effects of phosphorylation on methylation, the methylated substrates were analyzed using acidic gels (Fig. 5). Cytosolic proteins from kidney were phosphorylated in the presence of ATP (10 μ M), while varying the presence of MgCl₂ (10 mM), vanadate (100 μ M), genistein (100 μ M), and tyrphostin (100 μ M), then methylated in the presence of [³H]AdoMet (10 μ M) with or without GTP γ S (100 μ M).

Under basal conditions, when only the methyl donor [³H]AdoMet was present (Fig. 5A, lane 1), a methylation pattern similar to that shown in Fig. 1 lane 1 was observed. Addition of MgCl₂ to the incubation medium resulted in an increase in methyl incorporation on 14, 36, 43, and 47 kDa substrates and led to additional labelling of a 39 kDa substrate (Fig. 5A, lane 2 vs lane 1). Furthermore, in the presence of Mg²⁺, the labelling of the protein at 48 kDa disappeared. Inclusion of ATP (Fig. 5A, lane 3 vs lane 2), vanadate (Fig. 5A, lane 4 vs lane 1, and lane 5 vs lane 3), or genistein (Fig. 5A, lane 6 vs lane 5) had no additional effect on the pattern of methylated substrates. Interestingly, the presence of tyrphostin resulted in the massive labelling of most methyl acceptor proteins (Fig. 5A, lane 7).

In the presence of GTP γ S, we observed a general increase in the methylation level of acceptor proteins (Fig. 5A, lane 8 vs lane 1). This increase was more pronounced for the 16, 27, and 30 kDa substrates, and additional substrates of 53 and 56 kDa were also detected. Inclusion of MgCl₂ resulted in increased incorporation

of methyl groups on the 14, 36, 43, 47, 53 and 56 kDa substrates and revealed an additional substrate around 39 kDa but decreased the methyl labelling of the 27 kDa protein (Fig. 5A, lane 9 vs lane 8). Inclusion of ATP had no additional effect (Fig. 5A, lane 10 vs lane 9), nor had vanadate at the concentration used (Fig. 5A, lane 11 vs lane 8, and lane 12 vs lane 10). Addition of genistein inhibited the GTP γ S-induced labelling on acceptor proteins except for the 14, 36, 43 and 47 kDa substrates which remained strongly methylated (Fig. 5A, lane 13 vs lane 12). Again tyrphostin caused a major incorporation of methyl groups on kidney cytosol substrates (Fig. 5A, lane 14). A less exposed gel showed that most of the proteins strongly labelled in the presence of tyrphostin have molecular weights corresponding to those of PIMT substrates labelled in the absence of tyrphostin although some new methylated proteins were detected (Fig. 5B vs Fig. 5A, lane 12). The tyrphostin effect on the methylation profile was independent of the presence of GTP γ S (Fig. 5A, lane 14 vs 7).

DISCUSSION

Methylation and phosphorylation are two major post-translational protein modifications essential to many cell functions. In this study, we have investigated the modulation of both basal and GTP γ S-dependent PIMT activity by phosphorylation in the kidney cortex cytosolic cell fraction using various inhibitors of phosphatases and kinases.

As previously reported [34, 41], we noted a significant increase in protein methylation activity in kidney cytosolic extract in the presence of GTP γ S. Three sets of evidence indicate that the increased methylation occurs on isoaspartyl residues. First, methylation of isoprenylated cysteine residues, which is known to be modulated by guanine nucleotides [48-51], is excluded in a cytosolic fraction since the corresponding methyltransferase, PCMT, is strictly located in membranes [3]. In support of this assumption, no methylation of acetyl farnesyl cysteine (AFC), a known substrate for PCMT, was observed with our cytosolic kidney preparation [48]. Second, the GTP γ S-stimulated methyl esters formed are base-labile and hydrolyze under the mild alkaline conditions associated with SDS-PAGE in the Laemmli system, except for two substrates migrating at 16 and 36 kDa (not shown). Such an alkaline sensitivity is a widely used criterion to distinguish PIMT activity from other types of protein methylation [24]. Third, and most importantly, the labelling of acceptor proteins is reduced in the presence of the isoaspartyl-containing peptide DSIP-isoD, a well known specific substrate for PIMT [47]. The only exception is a 36 kDa protein whose methylation, although stimulated in the presence of GTP γ S, is not affected by the PIMT substrate.

Comparing nucleotide specificities for this stimulation phenomenon showed that GTP γ S and GDP β S are stimulatory with the first being more potent, as previously reported [41]. These facts strongly implicate a GTP-binding protein. Additionally, we report that ATP γ S, a non-hydrolyzable analog of ATP, also induces increased methylation. ATP γ S and GTP γ S effects are not additive, suggesting a common nucleotide binding site. As suggested for other systems [52], this action of ATP γ S could be mediated by a nucleotide diphosphate kinase (NDPK). It was shown that this enzyme can transfer the γ -phosphate from ATP γ S to GDP, converting it to GTP γ S [52]. In agreement with this, AMP-PNP was ineffective, not being a substrate for NDPK.

The divalent cation study gives us some insight into the molecular mechanisms involved in the GTP γ S-dependent increase in protein methylation. For example, when using the methanol diffusion vapor assay, Mg $^{2+}$ potentiates the GTP γ S-induced methylation without affecting basal methylation, suggesting that it acts by stabilization of the interaction between the guanine nucleotide and a GTP binding protein. Zn $^{2+}$ decreases carboxyl methylation both in the presence and absence of GTP γ S. Given that Zn $^{2+}$ was also reported to be inhibitory to other types of methylation activities [53, 54], we can postulate a similar mode of action here. We propose that Zn $^{2+}$ inhibits PIMT activity by coordinating histidine and/or cysteine residues essential for catalysis or substrate recognition. In support of this hypothesis, PIMT from different sources have a conserved histidine at position 63 in a motif that has been proposed to be essential for PIMT substrate recognition [55]. Moreover, tertiary structure solution has implicated a cysteine in the catalytic process

of DNA methyltransferase [56]. On the other hand, Cu^{2+} and Co^{2+} are transition metal ions that can adopt different valency states. So, it is possible that their inhibitory effect on GTP γ S-dependent methylation might reflect a potential responsiveness of this stimulation phenomenon to the redox status of the cell.

The present results clearly demonstrated a regulation, by tyrosine phosphorylation, of protein carboxyl methylation which was stimulated by GTP γ S. Both genistein, which competes with ATP, and tyrphostin, which competes with substrates for binding to tyrosine kinases, completely inhibit the effect of GTP γ S on carboxyl methylation activity, with low IC_{50} values of 4 μM and 1 μM respectively. It is worth noting that these values fall in the normal inhibitory range observed for these products toward tyrosine kinases (Table II). Vanadate, a tyrosine phosphatase inhibitor, has a dual effect. At low concentrations it potentiates GTP γ S stimulation of methylation activity up to 5-fold over basal conditions. However, increasing the concentration of vanadate results in a dose-dependent inhibition of the GTP γ S-dependent methylation. This could mean that a dynamic system, coupling phosphorylation and dephosphorylation reactions, is implicated in the stimulation of PIMT activity by GTP γ S.

Analysis of the methylation profiles obtained with acidic gel electrophoresis of kidney soluble proteins indicates different mechanisms of inactivation for the two tyrosine kinase inhibitors. Genistein, which inhibits only the GTP γ S-induced methylation activity without affecting basal activity, does not affect the protein methylation pattern in the absence of GTP γ S. However, in the presence of the nucleotide, genistein abolishes the GTP γ S-induced increase in methylation of PIMT

substrates, resulting in a protein methylation pattern similar to that obtained under basal conditions. This suggests that the GTP γ S effect on protein methylation is mediated through a tyrosine kinase, possibly acting downstream of a GTP binding protein. On the other hand, tyrphostin, which also completely inhibits GTP γ S-induced methylation activity, additionally reduces basal methylation, as measured by the methanol diffusion assay. In contrast, analysis of methylated substrates by 16-BAC gel electrophoresis shows a major increase in the labelling of methyl acceptor proteins, suggesting that tyrphostin acts on the methyl turnover rate by blocking a demethylation step. This could imply either the inhibition of an esterase activity or the stabilization of the methyl ester groups on acceptor proteins. Since the presence of tyrphostin also renders methyl labelling resistant to the alkaline conditions associated with SDS-PAGE in the Laemmli system (not shown), tyrphostin apparently stabilizes methyl esters by direct interaction with methylated substrates. In agreement with this postulate, tyrphostin has previously been suggested to inhibit voltage-operated calcium channels by a direct interaction with the protein in vascular smooth muscle cells [57]. The biochemical basis for such an interaction is not understood at present. Meanwhile, tyrphostin may be an interesting tool for the study of protein methylation, as it could be used to stabilize labelled methyl esters during the purification of PIMT substrates.

Evidently, a better understanding of the molecular events underlying the role of tyrosine kinases and phosphatases in the GTP γ S-dependent stimulation of methylation activity in kidney cytosol will require the identification and characterization of such proteins. This will hopefully clarify the role of PIMT stimulation in kidney function.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are particularly grateful to Dr. Dominique Boivin for providing helpful remarks as well as to Drs. Denis Gingras and Richard Desrosiers for their critical reading of the manuscript. D.B. is a recipient of a scholarship from the Medical Research Council of Canada. This work was supported by a grant from the Kidney Foundation of Canada to R.B.

REFERENCES

- 1 Galletti, P., Ingrosso, D., Manna, C., Clemente, G., and Zappia, V. (1995) *Biochem. J.* **306**, 313-325
- 2 Barten, D.M. and O'Dea, R.F. (1990) *Life Sci.* **47**, 181-194
- 3 Hrycyna, C.A. and Clarke, S. (1993) *Pharmac. Ther.* **59**, 281-300
- 4 Gingras, D., Boivin, D., Bilodeau, D., Pelletier, J. and Béliveau, R. (1994) *Médecine Sciences* **10**, 55-64
- 5 Stock, J.B., Surette, M.G., McCleary, W.R. and Stock A.M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19753-19756
- 6 Clarke, S. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 355-386
- 7 Xie, H. and Clarke, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13364-13371
- 8 Lee J. and Stock, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19192-19195
- 9 Turowski, P., Fernandez, A., Favre, B., Lamb, N.J. and Hemmings, B.A. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 397-410
- 10 Johnson, B.A., Ngo, S.Q. and Aswad, D.W. (1991) *Biochem. Int.* **24**, 841- 847
- 11 Kagan, R.M., McFadden, H.J., McFadden, P.N., O'Connor, C. and Clarke, S. (1997) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **117**, 379-385
- 12 Visick, J.E. and Clarke, S. (1995) *Mol. Microbiol.* **16**, 835-845
- 13 Ota, I. M. and Clarke, S. (1990) in: *Protein Methylation: The Function and Enzymology of Protein D-Aspartyl L-isoAspartyl Methyltransferases in Eucaryotic and Prokaryotic Cells* (Paik, W. K. and Kim, S., eds.), pp. 179-194, CRC Press, Boca Raton, FL

- 14 Iqbal, M. and Steenson, T. (1976) *J. Neurochem.* **27**, 605-608
- 15 Saido, T.C., Toyoshima, S and Osawa, T. (1987) *J. Biochem.* **102**, 319- 326
- 16 Sellinger, O.Z. and Kramer, C.M. (1988) *Adv. Exp. Med. Biol.* **231**, 269-280
- 17 Gingras, D., Ménard, P. and Béliveau, R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1066**, 261-267
- 18 Boivin, D, Gingras, D. and Béliveau, R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2610- 2615
- 19 Gingras, D., Boivin, D. and Béliveau, R. (1994) *Biochem J.* **297**, 145-150
- 20 Boivin, D., Bilodeau, D. and Béliveau, R. (1995) *Biochem. J.* **309**, 993-998
- 21 Wright, H.T. (1991) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 1-52
- 22 McFadden, PN. and Clarke, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 2595-2599
- 23 Johnson, B.A., Langmack, E.L. and Aswad, D.W. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12283-12287
- 24 Brennan, T.V., Anderson, J.W., Jia, Z., Waygood, E.B. and Clarke, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24586-24595
- 25 Li, C. and Clarke, S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 9885-9889
- 26 Kim, E., Lowenson, J.D., MacLaren, D.C., Clarke S. and Young, S. G.(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 6132-6137
- 27 Sellinger, O.Z., Kramer, C.M., Conger, A. and Duboff, G.S. (1988), *Mech. Ageing Dev.* **43**, 161-173
- 28 Shirasawa, T., Endoh, R., Zeng, Y.X., Sakamoto, K. and Mori, H. (1995) *Neurosci. Lett.* **188**, 37-40

- 29 O'Connor, M.B., Galus, A., Hartenstine, M., Magee, M., Jackson, F.R. and O'Connor, C.M. (1997) *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **27**, 49-54
- 30 Mizobuchi, M., Murao, K., Takeda, R. and Kakimoto, Y. (1994) *J. Neurochem.* **62**, 322-328
- 31 Cusan, L., Andersen, D., Tuen, E. and Hansson, V. (1982) *Arch. Androl.* **8**, 285-292
- 32 O'Connor, C.M., Germain, B.J., Guthrie, K.M., Aswad, D.W. and Milette, C.F. (1989) *Gamete Res.* **22**, 307-319
- 33 Galus, A., Lagos, A., Romanik, E.A., and O'Connor, C.M. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 524-533
- 34 Pelletier, J., Desrosiers, R.R. and Béliveau, R. (1996) *Mech. Ageing Dev.* **86**, 115-135
- 35 DeVry, C.G., Tsai, W. and Clarke, S. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 321-332
- 36 Johnson, B.A., Shirokawa, J.M., Geddes, J.W., Choi, B.H., Kim, R.C. and Aswad, D.W. (1991) *Neurobiol. Aging* **12**, 19-24
- 37 Mudgett, M.B. and Clarke, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25606-25612
- 38 Perna, A.F., Ingrosso, D., De Santo, N.G., Galletti, P. and Zappia, V. (1995) *Kidney Int.* **47**, 247-253
- 39 Lindquist, J.A., Barofsky, E. and McFadden, P.N. (1996) *J. Protein Chem.* **15**, 115-122
- 40 Aswad, D.W. and Deight, E.A. (1983) *J. Neurochem.* **40**, 1718-1726

- 41 Gingras, D. and Béliveau, R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1136**, 150-154
- 42 Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- 43 Xie, H., Yamane, H.K., Stephenson, R.C., Ong, O.C., Fung, B.K.K. and Clarke, S. (1990) *Methods* **1**, 276-282
- 44 Ladino, C.A., and O'Connor, C.M. (1992) *J. Cell. Physiol.* **153**, 297-304
- 45 Macfarlane, D.E. (1983) *Anal. Biochem.* **132**, 231-235
- 46 Terwilliger, T.C. and Clarke, S. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 3067-3076
- 47 Johnson, B.A. and Aswad, D.W. (1991) *Anal. Biochem.* **192**, 384-391
- 48 Gingras, D., Boivin, D. and Béliveau, R. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, F316- F322
- 49 Gingras, D., and Béliveau, R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1204**, 149- 156
- 50 Boivin, D. and Béliveau, R. (1995) *Am. J. Physiol.* **267**, F180-189
- 51 Backlund, P.S., Jr. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18432-18439
- 52 Kikkawa, S., Takahashi, K., Takahashi, K., Shimada, N., Ui, M., Kimura, N. and Katada, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21536-21540
- 53 Pfohl-Leszkowicz, A., Baldacini, O., Keith, G. and Dirheimer, G. (1987) *Biochimie* **69**, 1235-1242
- 54 Rawal, N., Rajpurohit, R., Paik, W.K. and Kim, S. (1994) *Biochem. J.* **300**, 483-489
- 55 Kagan, R. M. and Clarke, S. (1995) *Biochemistry* **34**, 10794-10806
- 56 Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J. W. and Roberts, R. J. (1993) *Cell* **74**, 299-307

- 57 Wijetunge, S., Aalkjaer, C., Schachter, M. and Hughes, A. D. (1992)
Biochem. Biophys. Res. Com. **189**, 1620-1623

TABLE I Nucleotide dependency of PIMT activity in kidney cytosol

Cytosolic proteins (50 μ g) were incubated for 60 min at 37°C with 10 μ M [³H]AdoMet (2 μ Ci) in 100 mM Hepes/Tris (pH 7.5), in the presence of various nucleotides (100 μ M). PIMT activity was measured as described under "Materials and Methods" and expressed as a percentage of the activity observed under basal conditions. These results are representative of two experiments done in triplicate.

Nucleotides	PIMT activity (%)
None	100.0 \pm 3.3
GDP	95.4 \pm 0.2
GTP	97.8 \pm 6.4
GD β S	145.4 \pm 2.1
GTP γ S	251.9 \pm 3.1
AMP-PNP	97.2 \pm 2.1
ATP	102.9 \pm 9.3
ADP β S	111.2 \pm 0.9
ATP γ S	176.2 \pm 3.7
GTP γ S + ATP γ S	166.3 \pm 0.5

TABLE II Effect of phosphatase and kinase inhibitors on PIMT activity in kidney cytosol

Cytosolic proteins (50 μ g) were incubated for 60 min at 37°C with 10 μ M [3 H]AdoMet (2 μ Ci) in 100 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5) with or without 100 μ M GTP γ S in the presence of various phosphatases and kinases inhibitors. PIMT activity was then measured as described under "Materials and Methods". These results are representative of two experiments done in triplicate.

Inhibitors	Inhibitory range (μ M)	Concentration used (μ M)	PIMT activity - GTP γ S (pmol/h/mg)	PIMT activity + GTP γ S (pmol/h/mg)
None	-----	-----	54.2 \pm 1.0	199.6 \pm 2.5
DMSO	-----	845x10 ³	54.3 \pm 2.5	212.1 \pm 3.9
Okadaic acid	0.01-1.0	1.0	57.3 \pm 4.9	198.1 \pm 19.1
Mycrocystin	0.1	1.0	54.1 \pm 0.2	196.8 \pm 13.7
NaF	100-1000	1000	61.7 \pm 0.7	196.0 \pm 16.4
Vanadate	broad	200	66.0 \pm 6.4	169.9 \pm 8.1
Lavendustin A	0.01-0.2	100	64.7 \pm 0.4	223.4 \pm 3.5
Herbimycin	0.8-1.0	100	54.7 \pm 0.4	207.8 \pm 3.8
RCAM lysozyme	0.5-1.0	1.0	45.7 \pm 0.8	172.0 \pm 3.8
Genistein	2.0-3.0	100	49.4 \pm 0.4	50.6 \pm 1.0
Tyrphostin	3.0-15.0	100	33.2 \pm 4.6	32.4 \pm 1.0

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Competition by DSIP-isoD of basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol.

Cytosolic proteins (50 μ g) were incubated for 60 min at 37°C with 10 μ M [3 H]AdoMet (3 μ Ci) in 100 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5) with (lanes 2 and 4) or without (lanes 1 and 3) 1 mM DSIP-isoD in the presence (lanes 3 and 4) or the absence (lanes 1 and 2) of 100 μ M GTP γ S. Reactions were stopped by adding 16-BAC sample buffer. Aliquots of the methylated proteins (30 μ g) were fractionated by 16-BAC electrophoresis under acidic conditions using 1.5 mm-thick, 9 % polyacrylamide 3M urea gels and detected by fluorography. Molecular mass of standard proteins are indicated on the *right* and molecular mass of methylated proteins on the *left*. These results are representative of two experiments done in duplicate.

Figure 2. Effects of divalent cations on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol.

Cytosolic proteins (50 μ g) were incubated for 60 min at 37°C with 10 μ M [3 H]AdoMet (2 μ Ci) in 100 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5) with (○) or without (●) 100 μ M GTP γ S in the presence of different concentrations of the following divalent ions: Mg $^{2+}$, Cu $^{2+}$, Zn $^{2+}$ and Co $^{2+}$, (all chloride salts). PIMT activity was then measured as described under "Materials and Methods". These results are representative of two experiments done in triplicate.

Figure 3. Dose-response effect of vanadate on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol.

Cytosolic proteins (50 μ g) were incubated for 60 min at 37°C with 10 μ M [3 H]AdoMet (2 μ Ci) in 100 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5) with (○) or without (●) 100 μ M GTP γ S in the presence of different concentrations of vanadate. PIMT activity was then measured as described under "Materials and Methods". These results are representative of two experiments done in triplicate.

Figure 4. Dose-response effect of genistein and tyrphostin on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol.

Cytosolic proteins (50 μ g) were incubated for 60 min at 37°C with 10 μ M [3 H]AdoMet (2 μ Ci) in 100 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5) with (○) or without (●) 100 μ M GTP γ S in the presence of different concentrations of *A*: genistein and *B*: tyrphostin. PIMT activity was then measured as described under "Materials and Methods". These results are representative of two experiments done in triplicate.

Figure 5. Effect of phosphorylation on the methylation of soluble proteins in kidney.

Phosphorylation of cytosolic proteins (300 μ g) was performed with 10 μ M ATP, in the presence or absence of 10 mM MgCl₂, 100 μ M vanadate, 100 μ M genistein, 100 μ M tyrphostin, and in 25 mM Hepes/Tris buffer (pH 7.5) for 5 minutes at 30°C. Aliquots of the phosphorylated proteins (50 μ g) were then methylated in the presence and absence of GTP γ S, as described under "Materials and Methods". Reactions were

stopped by adding sample buffer and aliquots of proteins (50 μg) were fractionated by 16-BAC gel electrophoresis under acidic conditions on 1.5 mm-thick, 9% polyacrylamide, 3M urea gels. Methylated proteins were detected by fluorography following two months exposure (**A**), as well as two weeks exposure (**B**) for kidney soluble proteins treated with tyrphostin. Molecular mass of standard proteins are indicated on the *right* and molecular mass of methylated proteins on the *left* of each panel. These results are representative of two experiments done in duplicate.

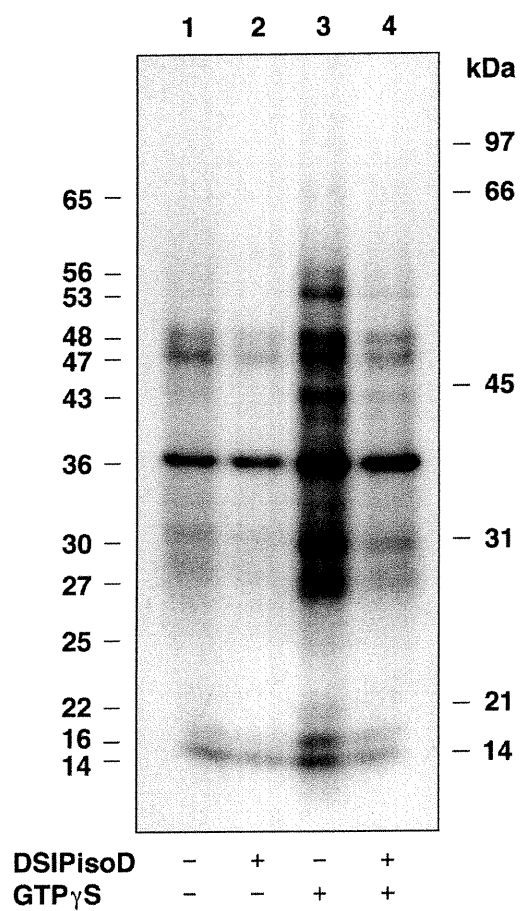


FIGURE 1. Competition by DSIP-isoD of basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol

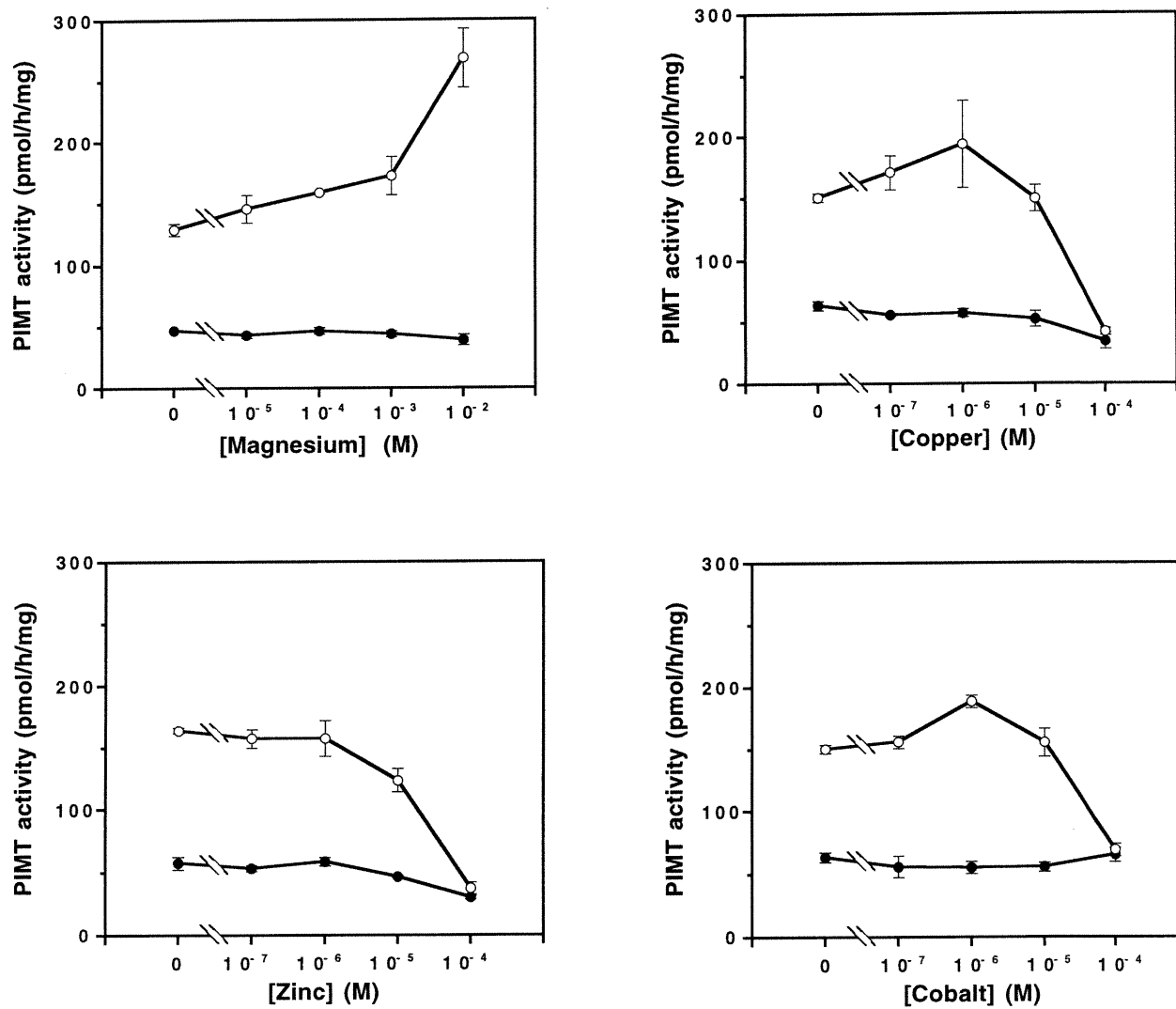


FIGURE 2. Effects of divalent cations on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol

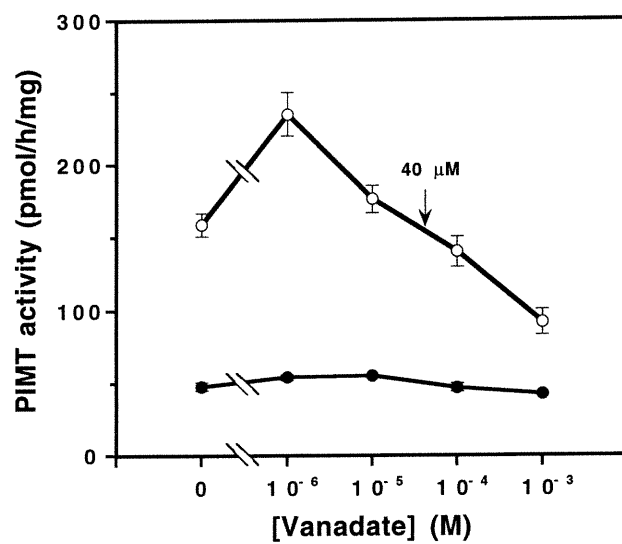


FIGURE 3. Dose-response effect of vanadate on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol

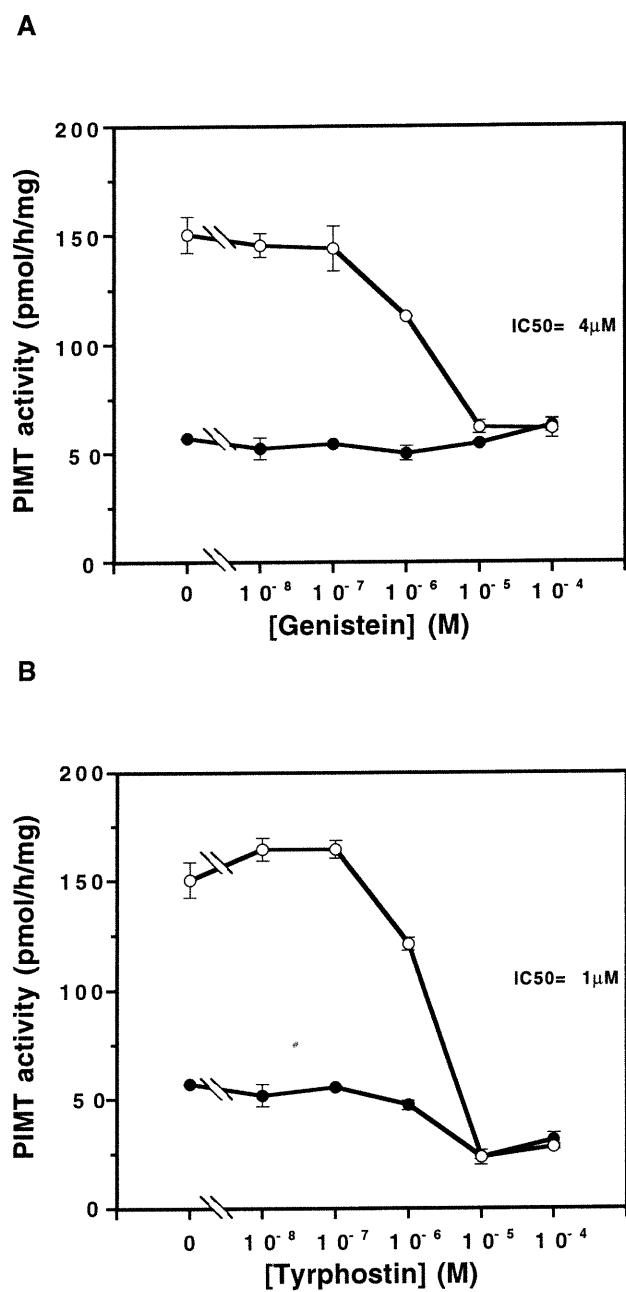


FIGURE 4. Dose-response effect of genistein and tyrphostin on basal and GTP γ S-stimulated endogenous protein methylation in kidney cytosol

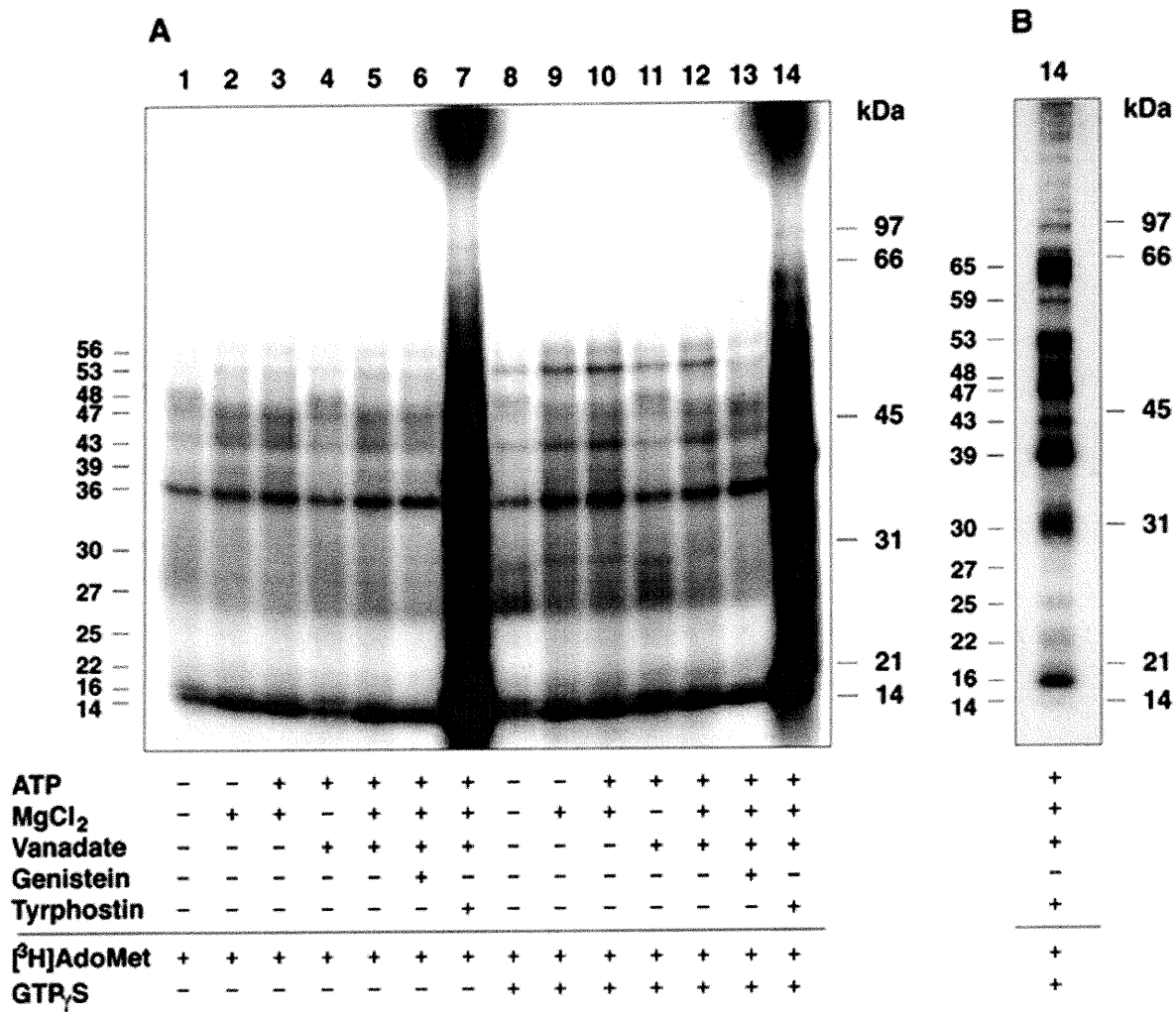


FIGURE 5. Effect of phosphorylation on the methylation of soluble proteins in kidney

CHAPITRE III : DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons caractérisé l'activité de petites protéines G présentes au niveau du cortex rénal. Des études antérieures ont montré que les petites protéines G de la famille Rho, RhoA et Cdc42, sont fortement exprimées dans le tissu épithélial rénal (Boivin et Béliveau, 1995). Ces protéines sont reconnues pour gérer la réorganisation du cytosquelette accompagnant de nombreuses fonctions cellulaires tant en conditions normales que pathologiques. Elles collaborent également à la transmission vers le noyau des signaux relayés par les récepteurs couplés aux protéines G et par les récepteurs à activité tyrosine kinase. Étant donné leur importance cruciale pour la vie cellulaire, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant leur activité peut avoir des retombées multiples. Nous avons choisi d'exploiter une de leurs caractéristiques, soit cette capacité qu'elles ont d'osciller entre localisation membranaire et cytoplasmique, pour mieux cerner ces mécanismes. Nous avons aussi étudié une activité de carboxyméthylation des protéines sur résidus isoaspartyles qui, bien qu'ubiquitaire, a l'originalité d'être stimulée par le GTP γ S dans le tissu rénal suggérant fortement un rôle pour les petites protéines G dans ce processus.

3.1 Contrôle de l'activité des petites protéines G de la famille Rho par leur localisation intracellulaire

La mobilité des protéines Rho est une caractéristique importante, liée au contrôle de leur activité. Par exemple, chez les cellules Swiss 3T3, une stimulation par les esters de phorbol provoque la translocation d'un pool cytosolique de RhoA vers le sillon de division ("cleavage furrow") formé au cours de la mitose (Takaishi *et al.*, 1995). Par ailleurs, un traitement à l'insuline provoque l'acheminement rapide de RhoA vers la membrane plasmique chez les adipocytes (Karman *et al.*, 1997), alors que la translocation de RhoA se fait plutôt vers le noyau en réponse à la thrombine chez les cellules IIC9 (Baldassare *et al.*, 1997). Les protéines Rho sont donc acheminées temporairement à des localisations spécifiques variant selon le type de stimuli et cette migration est essentielle à la réponse cellulaire. Étant

donné leur caractère fortement hydrophobe, les protéines Rho ne peuvent se déplacer par simple diffusion. Elles mobilisent donc les services d'une escorte protéique.

C'est la protéine GDI qui sert de navette aux protéines Rho lors de leurs déplacements. Elle achemine les protéines Rho à la membrane, où les petites protéines G sont activées, et les en retire au besoin. Elle maintient également une réserve cytosolique de RhoA et Cdc42 en formant un complexe soluble avec elles. On connaît cependant encore peu les mécanismes moléculaires régissant le chargement et le déchargement des protéines Rho à la membrane. Le fait qu'une fraction importante des petites protéines G, RhoA et Cdc42, résiste à l'extraction par GDI, au niveau de la membrane à bordure en brosse rénale, montre bien que cette fonction puisse être régulée et suggère l'existence de deux sous-populations de Rho. Tel que mentionné en introduction, un des facteurs reconnu pour influencer l'attachement membranaire des protéines Rho est leur degré de modification post-traductionnelle. La présence de sous-populations pourrait donc refléter différents états de phosphorylation et/ou de méthylation des protéines RhoA et Cdc42. D'autre part, il est possible que la population non extraite par GDI soit rendue inaccessible à cette dernière par son attachement au cytosquelette. Cette sous-population membranaire des Rho pourrait vraisemblablement assurer le maintien de fonctions cellulaires basales, alors que la sous-population mobilisable pourrait répondre à des besoins plus ponctuels selon les stimuli reçus par la cellule. Il est également possible que l'extraction incomplète des protéines Rho reflète plutôt la pénurie d'une protéine inconnue régissant une étape limitante lors de l'extraction.

À notre surprise, nous avons remarqué que l'activité d'extraction des protéines Rho par GDI était fortement inhibée, en système acellulaire, en présence d'une concentration physiologique de sels. Le phénomène n'est pas dû à la présence d'un ion particulier puisqu'il a pu être observé avec une intensité similaire en présence de sels divers (résultat non publié). Le phénomène est également observé chez tous les tissus étudiés suggérant qu'en système cellulaire GDI ne puisse pas spontanément extraire les Rho

des membranes. À première vue, on pourrait croire que la force ionique agit sur la liaison entre les protéines Rho et GDI. Cette hypothèse est réfutée par coprécipitation sur billes de glutathion-sépharose des complexes Rho/AGST-GDI en présence et en absence de sels. Il est cependant possible que la liaison et l'extraction des Rho soient deux fonctions indépendantes et que la capacité d'extraction de GDI soit tout de même affectée par le sel. À l'appui de cette hypothèse, une étude a récemment montré que GDI privé de ses 42 acides aminés N-terminaux liait toujours Cdc42, sans toutefois pouvoir l'extraire (Gosser *et al.*, 1997). Cette région est particulièrement flexible et désorganisée et pour cette raison risque d'être vulnérable aux bris de liens électrostatiques en présence de sels.

Bien que plausible, cette explication ne nous paraît cependant pas entièrement satisfaisante. Nous avons montré que GDI ne peut extraire les protéines Rho de membranes pré-lavées au sel suggérant qu'un élément essentiel, soit un facteur additionnel ou une interaction entre molécules, est perdu lors du traitement. Ceci démontre du même coup que l'absence de sel n'induit pas automatiquement une capacité artéfactuelle de GDI à dissocier les Rho. L'identité du facteur perdu lors du traitement au sel demeure inconnue, mais il pourrait s'agir d'une protéine chaperon dirigeant et stabilisant les interactions entre la portion N-terminale de GDI et les protéines Rho à la membrane. D'autre part, ce pourrait être un facteur de déplacement facilitant le chargement et le déchargement des protéines Rho sur GDI à l'interface membrane/cytosol. La participation d'un facteur de déplacement aurait le mérite de résoudre quelques énigmes entourant les protéines Rho. Par exemple, le déplacement des protéines Rho sur GDI nécessite la présence de membranes (Bokoch *et al.*, 1994). De plus, lors d'essais *in vitro* réalisés en présence de protéines recombinantes, GDI s'oppose à l'activité d'échange de GDS, cependant le fait d'augmenter la quantité de GDS ne permet pas de lever cette inhibition (Kikuchi *et al.*, 1992; Leonard *et al.*, 1992). À l'appui de cette hypothèse, la participation d'un tel facteur a été démontrée lors de la translocation des protéines Rab (Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997). Puisque les Rab comme les Rho se déplacent entre différents compartiments cellulaires avec l'aide de leurs propres GDI, peut-être

pourrions-nous transposer vers les Rho quelques-unes des informations obtenues sur les Rab.

Une même protéine pourrait assumer simultanément les fonctions de chaperon et de débardeur sur GDI. A cet égard, la famille ERM (ezrine/radixine/moesine) a récemment attiré l'attention. Ces trois protéines, étroitement apparentées, servent de crochets permettant l'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique (Bretscher *et al.*, 1997; Tsukita *et al.*, 1997). Leur portion N-terminale lie directement ou indirectement certains récepteurs membranaires, tandis que la liaison aux filaments d'actine polymérisée se fait via la portion C-terminale. En conditions physiologiques, les protéines ERM sont inactivées par la formation d'un lien intramoléculaire entre leurs extrémités C et N-terminales et demeurent solubles. Cependant, lorsque phosphorylées (Crepaldi *et al.*, 1997; Hirao *et al.*, 1996), ou mises en présence de PIP2 ou encore de GTP γ S (Heiska *et al.*, 1998; Hirao *et al.*, 1996), ces protéines se délient et assument leurs fonctions de liaison à l'interface membrane-cytosol. L'effet du GTP γ S est aboli par un traitement à la toxine C3, suggérant que les protéines Rho participent au recrutement et à l'activation des protéines ERM, possiblement en commandant la production de PIP2 via leur effecteur PIP5-K (Hirao *et al.*, 1996). Il est également probable que les protéines Rho contribuent à l'activation des protéines ERM en les phosphorylant, puisqu'une phosphorylation de la radixine par Rho-kinase a récemment été démontrée *in vitro* (Matsui *et al.*, 1998). Bien que les protéines Rho ne s'associent pas directement aux protéines ERM, GDI coprécipite avec les complexes ERM-récepteurs membranaires *in vivo* (Heiska *et al.*, 1998; Hirao *et al.*, 1996). A l'interface cytosol/membrane, la liaison des complexes GDI/Rho via la protéine GDI à la portion N-terminale de ERM provoque apparemment l'expulsion des Rho du complexe, ce qui permet l'activation subséquente des petites protéines G par échange nucléotidique (Takahashi *et al.*, 1997). L'échange du GDP pour le GTP est possiblement favorisé par le recrutement

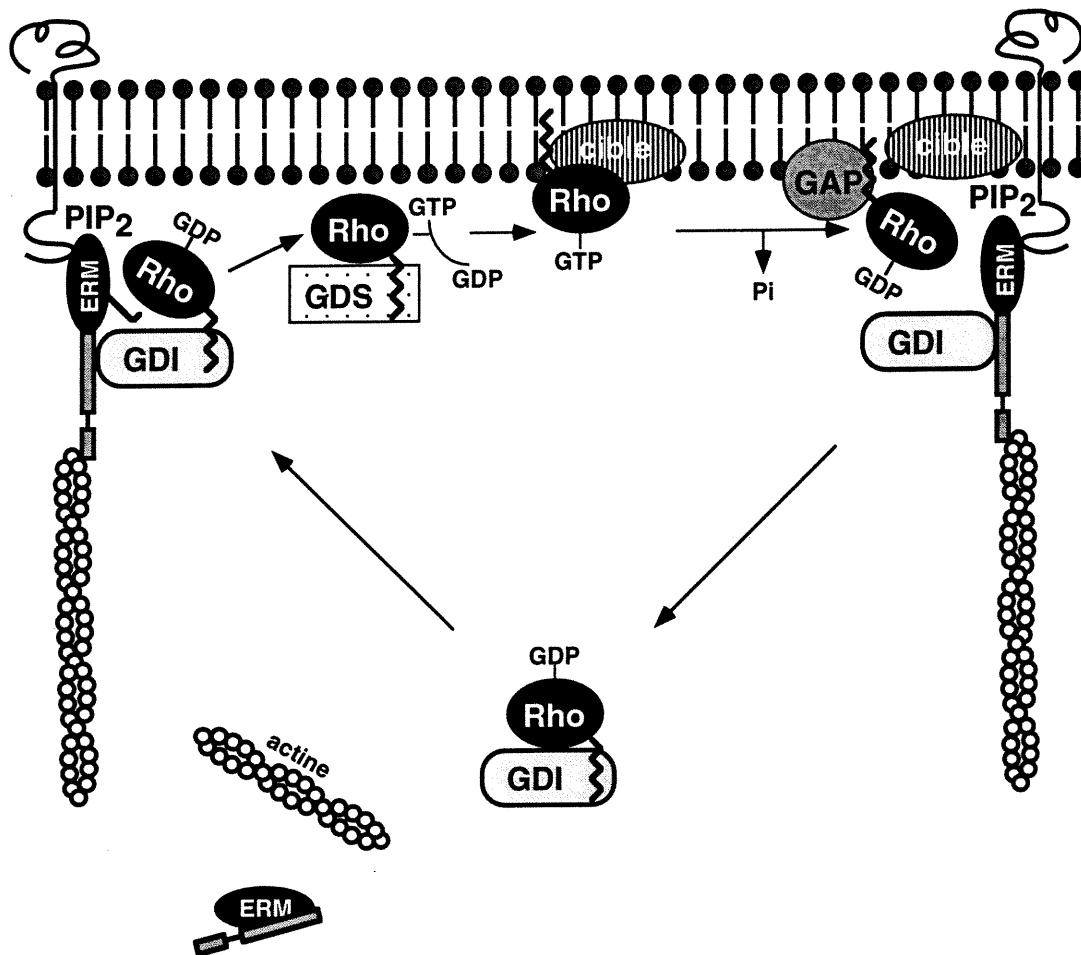


FIGURE 12. Modèle du cycle de translocation des protéines Rho.

préalable de protéines GDS à la membrane, hypothèse supportée par la coprécipitation *in vitro* de radixine et Dbl (Takahashi *et al.*, 1998).

À la lumière de ces faits, il semble permis de spéculer sur l'identité du facteur perdu lors du prétraitement au sel des membranes à bordure en brosse rénale. Il pourrait s'agir d'une protéine de la famille ERM, les trois membres étant exprimés au niveau de la membrane à bordure en brosse rénale (Bretsher *et al.*, 1997). Ceci nous amène à proposer le modèle de translocation des protéines Rho illustré à la figure 12. Sur ce modèle, le cycle de translocation des protéines Rho est initié par une production locale de PIP₂ à la membrane. La présence du phosphoinositide permet le déploiement de ERM qui forme un pont entre les fibres d'actine et les récepteurs membranaires. ERM recrute alors dans un premier temps une protéine GDS puis, dans un deuxième temps, les complexes solubles GDI/Rho à l'interface membrane/cytosol. La liaison de GDI à ERM déplace la GDS et induit un changement de conformation sur GDI qui libère les Rho. Rho est alors activée par la GDS. Rho-GTP activée recrute et stimule un certain nombre d'effecteurs membranaires dont possiblement PIP₅-K et Rho-kinase, ce qui amplifie le signal, jusqu'à ce qu'intervienne une GAP pour hydrolyser le GTP en GDP. Rho inactivée par l'action d'une GAP et possiblement modifiée post-traductionnellement par phosphorylation peut maintenant être recueillie par GDI et le complexe GDI/Rho reformé retourne à la fraction soluble. Ce modèle suppose que les Rho cytosoliques constituent une réserve normalement inactive en conditions physiologiques, que la translocation des Rho vers les membranes via GDI est régulée localement par un signal transitoire et que GDI n'a pas d'activité d'extraction des Rho membranaires *per se*.

3.2 Contrôle de l'activité des petites protéines G de la famille Rho par la protéolyse

Au cours des essais d'extraction en présence de membranes à bordure en brosse rénale, nous avons remarqué que les petites protéines G, RhoA et de manière plus importante Cdc42, tout comme la protéine de fusion GST-GDI

sont sensibles à la protéolyse. La protéolyse de RhoA et Cdc42 affecte principalement la fraction qui demeure attachée à la membrane rénale lorsque l'extraction est réalisée en absence de sel. La fraction extraite dans ces conditions est protégée par GDI. En présence de sel, la protéolyse affecte les deux fractions de petites protéines G. Un examen plus approfondi a révélé qu'une quantité importante de GST-GDI est également protéolysée en absence de sel. Le phénomène augmente avec la force ionique. GST-GDI est totalement protéolysée après une heure d'incubation en conditions physiologiques de force ionique et de température. La plus grande vulnérabilité des complexes GST-GDI/Rho à l'attaque protéolytique en présence de sel peut s'expliquer par une désorganisation accrue de la portion N-terminale de GDI résultant soit de la rupture de liens électrostatiques entre GDI et les Rho, soit de la perte du soutien d'une protéine chaperon. Ceci est cohérent avec notre interprétation de l'inhibition de l'extraction des Rho par GDI en présence de sel. Au niveau rénal, la protéolyse accrue des protéines Rho et de GST-GDI contribue au moins partiellement à l'apparente incapacité de GDI à dissocier les Rho des membranes.

La protéolyse n'est cependant pas la cause majeure et universelle de l'inhibition de l'extraction des protéines Rho par GDI à force ionique physiologique. L'inhibition de l'extraction est en effet observée au niveau de tissus comme l'estomac et le cerveau où la protéolyse de RhoA, Cdc42 et GST-GDI est négligeable dans les mêmes conditions. De plus, la cinétique d'inhibition de l'extraction est nettement plus rapide que celle de la protéolyse de GST-GDI au niveau de la membrane à bordure en brosse rénale. Il ne faudrait pas oublier non plus que l'extraction des protéines Rho est inhibée par un prétraitement des membranes avec le sel, alors que dans ces conditions la protéolyse de GST-GDI n'est pas stimulée.

Intrigués par ce phénomène de protéolyse de GST-GDI et par ses conséquences potentielles sur l'activité des Rho, nous avons approfondi sa caractérisation. En présence de membranes à bordure en brosse rénales, la protéolyse de GST-GDI augmente avec la force ionique et est pour ainsi dire complète après une heure d'incubation en conditions physiologiques de

température et de sel. Une protéolyse importante est également observée en présence de membranes totales de rate, d'intestin et de rein. Une protéolyse beaucoup plus lente est observée, surtout en présence de sel, avec des membranes provenant d'autres tissus. Au niveau rénal, l'activité protéolytique mesurée en présence de sel semble enrichie dans une préparation de membranes à bordure en brosse, par rapport à une préparation de membranes totales. Fait intéressant, dans tous les cas, un même fragment immunoréactif majeur d'environ 17 kDa est généré, suggérant la présence d'une région particulièrement vulnérable à l'attaque protéolytique sur GST-GDI.

La protéolyse de GST-GDI au niveau rénal résiste à la plupart des inhibiteurs de protéases employés isolément. L'intégrité de GST-GDI est cependant préservée en présence de concentrations micromolaires du peptide Ac-YVAD-CHO, un inhibiteur hautement spécifique aux protéases de type ICE appartenant à la famille des caspases. Ce fait suggère qu'une activité caspase puisse être présente au niveau de la membrane à bordure en brosse rénale. Afin de confirmer le clivage de GST-GDI par une caspase, le fragment de 17 kDa a été isolé et séquencé. La protéine est clivée entre les acides aminés A⁶³/D⁶⁴. Le site de clivage obtenu ne correspond donc pas à celui des caspases, reconnues pour couper après un aspartate et non pas avant. Ceci suggère que la caspase incriminée agit indirectement sur GST-GDI à l'intérieur d'une cascade protéolytique.

La susceptibilité protéolytique de GDI a été récemment suggérée par des études de cristallographie et de spectroscopie RMN (Keep *et al.*, 1997; Gosser *et al.*, 1997). Ces études ont montré que GDI possède une structure dichotomique composée d'une région C-terminale rigide et d'une région N-terminale hautement flexible. Cette opposition structurale rend le point de jonction, aux environs de l'acide aminé 60, particulièrement susceptible au bris par protéolyse. De fait, chez les neutrophiles, la protéine apparentée GDI/D4 est clivée dans cette région (D⁵⁵/G⁵⁶) *in vitro* et *in vivo* par une protéase de type ICE et ce bris interfère avec l'activité d'inhibition de l'échange nucléotidique de la protéine (Danley *et al.*, 1996). Bien que ce site

caspase ne soit pas présent sur GDI, nos résultats démontrent que cette dernière est tout de même clivée dans la même région (A⁶³/D⁶⁴) par une activité protéolytique impliquant une caspase. De plus, le fragment résultant s'avère incapable d'extraire les protéines Rho de la membrane à bordure en brosse. Ces faits suggèrent que la protéolyse des protéines RhoGDI puisse constituer un mode généralisé de régulation de l'activité des Rho. Que ce soit directement ou indirectement, les caspases semblent prendre une part active à cette régulation. Sachant que les caspases participent au phénomène apoptotique (Nicholson et Thornberry, 1997), nous suggérons que la protéolyse de GDI est un événement important qui pourrait permettre la déstabilisation du cytosquelette d'actine par inhibition de l'activité des Rho au cours de l'apoptose. Ceci pourrait constituer une hypothèse de travail intéressante dans le cadre d'un futur projet.

3.3 Régulation de la stimulation GTP γ S-dépendante de la méthylation des protéines sur résidus isoaspartyles

Des études antérieures réalisées à notre laboratoire ont montré qu'une activité de méthylation des protéines est stimulée par le GTP γ S au niveau rénal, laissant soupçonner la participation d'une protéine liant le GTP (Gingras et Béliveau, 1992; Pelletier *et al.*, 1996). La labilité des esters de méthyle formés suggérait alors fortement une méthylation sur résidus aspartyles catalysée par une PIMT. À l'appui de cette hypothèse, nous avons montré par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions acides que la stimulation de la carboxyméthylation des substrats endogènes aux BBM par le GTP γ S est inhibée en présence d'un peptide synthétique substrat de la PIMT. Nous rapportons également une modulation de l'effet du nucléotide sur la méthylation en présence d'inhibiteurs des voies tyrosine kinase et phosphatase.

La présence de vanadate, un inhibiteur de tyrosine phosphatase, stimule l'effet du nucléotide sur l'activité PIMT mesurée selon la méthode de diffusion du méthanol, à des concentrations inférieures à 40 μ M. Au-delà de cette concentration, le vanadate inhibe graduellement l'effet du GTP γ S. D'autre

part, l'ajout de concentrations micromolaires de génistéine et de tyrphostin, deux inhibiteurs de tyrosine kinase, inhibe totalement la stimulation de l'activité PIMT en présence de $GTP\gamma S$. Cependant, les cibles des deux inhibiteurs diffèrent puisque la génistéine n'affecte que l'activité de la PIMT dépendante du $GTP\gamma S$, alors que le tyrphostin touche également l'activité basale en absence de nucléotide. Un mécanisme d'action différent est confirmé par l'examen des profils de méthylation sur gel de polyacrylamide. L'incorporation de méthyles tritiés sur les substrats de la PIMT, habituellement augmentée en présence de $GTP\gamma S$, est ramenée au niveau basal par l'ajout de génistéine. Ceci suggère qu'une activité tyrosine kinase sensible à la génistéine puisse être requise lors de l'activation de l'activité PIMT par le $GTP\gamma S$. Pour sa part, l'ajout de tyrphostin provoque une stimulation importante de l'incorporation de groupes méthyles en absence et en présence de $GTP\gamma S$. Selon toute vraisemblance, le tyrphostin stabilise les groupes méthyles sur les substrats de la PIMT en bloquant leur déméthylation enzymatique ou spontanée. Cette propriété du tyrphostin pourrait être mise à profit afin de purifier les substrats de la PIMT.

Les résultats obtenus en présence de $GTP\gamma S$, de vanadate et de génistéine suggèrent fortement l'existence d'une voie de signalisation réunissant phosphorylation, méthylation et petites protéines G au niveau rénal. Ceci ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle de la carboxyméthylation des protéines sur résidus aspartyles dans cet organe.

CHAPITRE IV: CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence l'existence de mécanismes moléculaires capables d'interrompre le cycle de va-et-vient entre le cytosol et les membranes des protéines RhoA et Cdc42. La protéine GDI joue un rôle déterminant au cours de ce cycle. Sa capacité d'extraire les protéines Rho des membranes et de les maintenir sous forme de complexes solubles est une composante importante de leur cycle d'activation. Nous avons montré qu'une force ionique croissante freinait cette activité GDI, jusqu'à inhibition totale en conditions physiologiques. La généralité du phénomène laisse supposer que la fonction d'extraction de GDI est étroitement régulée et suggère que, chez les cellules intactes, GDI ne puisse pas extraire spontanément les Rho des membranes. Cependant, l'incapacité de GDI à extraire les protéines Rho de membranes prétraitées au sel suggère qu'un facteur additionnel, possiblement protéique, soit perdu lors du traitement des membranes. Pour prouver cette assertion, il conviendrait de reconstituer l'activité perdue. Ceci pourrait être réalisé en dialysant le surnageant résultant du prétraitement des membranes, pour ensuite le remettre en présence de la fraction membranaire prétraitée. Si GDI peut extraire RhoA et Cdc42 de ces membranes reconstituées, alors notre hypothèse sera vérifiée.

L'étape suivante consisterait à purifier, identifier et caractériser cette protéine. La littérature semble déjà désigner les membres de la famille ERM (ezrine, radixine, moésine) comme étant des candidats logiques. Puisque des anticorps commerciaux dirigés contre ces protéines sont disponibles, leur présence pourrait être recherchée en immunobuvardage dans les surnageants de membranes prétraitées au sel. La participation d'une protéine ERM pourrait être démontrée par reconstitution de l'activité d'extraction des Rho par GDI sur des membranes prétraitées au sel en présence d'une protéine ERM recombinante. Si cette approche s'avérait négative, il serait toujours possible de purifier la protéine en cause en utilisant les techniques de chromatographie sur colonne. La reconstitution de l'activité d'extraction par GDI, sur des membranes prétraitées au sel, pourrait être utilisée comme

mesure d'activité. La protéine purifiée serait ensuite séquencée et la séquence ainsi obtenue comparée à celle de protéines connues, pour identification.

Nos travaux ont aussi mis en évidence la vulnérabilité de la protéine GDI aux attaques protéolytiques. Un fragment similaire, inactif, de 17 kDa est généré par simple incubation de GDI en présence de membranes de diverses origines. Au niveau rénal, l'importante activité protéolytique est complètement inhibée par des concentrations micromolaires du peptide Ac-YVAD-CHO, un inhibiteur spécifique des protéases de la famille ICE. Ce fait suggère fortement qu'une caspase endogène à la membrane à bordure en brosse participe à la régulation par protéolyse de l'activité GDI. Le site de clivage sur GDI ne correspond cependant pas à celui habituellement reconnu par les caspases suggérant que la caspase fait partie d'une cascade protéolytique. La purification sur colonne chromatographique de la caspase impliquée pourrait être suivie à l'aide d'un substrat chromogénique disponible commercialement. L'utilisation d'anticorps (générés si non disponibles commercialement) reconnaissant la caspase purifiée permettrait de mieux caractériser cette activité. La signification physiologique du phénomène pourrait être recherchée en utilisant deux modèles de pathologie rénale reconnus pour affecter l'organisation du cytosquelette soient : l'ischémie rénale et la maladie polykystique du rein. Il serait intéressant de comparer les niveaux d'expression et d'activité de la caspase, des protéines Rho et de GDI, en conditions normales et pathologiques.

L'étude des mécanismes moléculaires régulant le cycle de localisation entre cytosol et membranes des protéines RhoA et Cdc42 pourrait être complétée en évaluant les effets de modifications post-traductionnelles. De toute évidence l'état de phosphorylation des protéines Rho influence leur localisation. Nous avons obtenu des résultats préliminaires (non montrés) indiquant que la préphosphorylation de membranes à bordure en brosse rénales favorise une protéolyse accélérée de GDI lors de l'essai d'extraction en absence de sel. Par contre, en présence de sel, l'extraction de RhoA est favorisée par le prétraitement, levant ainsi l'effet inhibiteur de la force ionique,

habituellement observé. À ce stade, il est difficile de discerner l'effet de la phosphorylation sur l'activité protéolytique, de celui sur l'interaction des protéines Rho avec GDI ou avec la membrane. La production de protéines Cdc42 et RhoA recombinantes et post-traductionnellement matures, actuellement en cours au laboratoire, devrait permettre d'étudier séparément chacun de ces effets. Avec ces protéines recombinantes il deviendra possible d'analyser leur interaction avec GDI en temps réel par résonance à plasma sur un appareil BIAcore. Ce type d'appareillage permettra de mesurer les constantes d'affinité et de caractériser la cinétique des interactions en présence de différents modulateurs potentiels tels nucléotides, peptides, lipides, etc. Dans ce contexte, on pourra également mesurer les effets de modifications post-traductionnelles telles la phosphorylation, la méthylation et l'ADP-ribosylation sur les interactions entre les protéines Rho et GDI.

Lors de la caractérisation de l'activité d'extraction des protéines Rho par GDI, nous avons relevé qu'une fraction importante des protéines RhoA et Cdc42 résistait à son extraction par GDI, au niveau de la membrane à bordure en brosse rénale. Ce fait suggère l'existence de deux sous-populations membranaires. Il nous semble important de mieux caractériser ce phénomène. S'agit-il d'une association au cytosquelette? Le degré d'association des protéines Rho au cytosquelette pourrait être évalué par immunodétection après extraction des membranes au Triton X-100. D'autre part, des études réalisées à notre laboratoire ont permis de localiser RhoA au niveau des cavéolae (Gingras *et al*, 1998) Les cavéolae sont des microdomaines formant des invaginations dans la membrane plasmique. Ces structures sont en quelque sorte des ghettos membranaires où sont concentrées certaines protéines signalisatrices telles Src, G α s, Ras et eNOS. Puisqu'il est possible d'isoler ces structures, il serait intéressant de vérifier si elles abritent préférentiellement l'une des deux sous-populations des Rho en procédant à un test d'extraction en présence de GDI.

Il est cependant possible que l'extraction incomplète des protéines Rho par GDI ne soit pas due à la présence de sous-populations de ces petites protéines G. Si, comme nous le proposons, le chargement et le

déchargement des protéines Rho à la membrane est une étape limitante, impliquant une protéine autre que les Rho et GDI, alors le phénomène pourrait être dû à une pénurie de cette protéine inconnue. Ce facteur additionnel pourrait vraisemblablement être celui qui est perdu lors du pré lavage salin des membranes. Cette hypothèse pourrait être testée par l'ajout de ce facteur purifié lors de l'essai d'extraction. Si l'hypothèse se vérifie alors la proportion des Rho dissociées des membranes devrait augmenter en fonction des quantités ajoutées de ce facteur.

En ce qui concerne la méthylation sur résidus aspartyles anormaux reconnus par la PIMT, il conviendrait d'établir clairement l'identité de la protéine G responsable de la stimulation de la méthylation par le $GTP\gamma S$ au niveau rénal. Des expériences préliminaires (résultats non montrés) ont révélé une stimulation accrue de l'activité PIMT en présence d'une fraction enrichie en protéines Rho provenant de la fraction cytosolique de cortex rénaux. Ceci n'est cependant pas une preuve formelle de la participation des Rho au phénomène. Une stimulation de l'activité PIMT en présence de protéines Rho recombinantes et post-traductionnellement matures serait plus convaincante. Cette expérience deviendra bientôt réalisable, puisque ces protéines sont en cours de production dans notre laboratoire. Il se peut toutefois que l'activation de la petite protéine G ne soit pas l'étape limitante, auquel cas l'ajout de la protéine recombinante serait sans effet sur le système. Dans ce cas, il deviendrait nécessaire d'identifier les autres composantes du système. Pour ce faire, nous recommandons fortement la production d'une protéine de fusion GST-PIMT. Cette PIMT pourrait être immobilisée sur billes de glutathion-sépharose et incubée avec et sans $GTP\gamma S$, en présence de cytosol rénal. En établissant le profil différentiel des protéines retenues, il serait alors possible d'isoler celles dont l'interaction avec la PIMT requiert la présence du nucléotide. Les protéines ainsi obtenues pourraient être séquencées et possiblement identifiées par comparaison de leur séquence à celles provenant de banques de données. La présence de RhoA et de Cdc42 au sein de ces protéines serait recherchée en immunobuvardage.

Jusqu'à présent l'identification de substrats méthylés par la PIMT a été compliquée par l'instabilité des liens esters formés. Cependant, les résultats obtenus en présence de tyrphostin indique que ce produit a un effet stabilisateur sur les groupements méthyles. La purification des substrats méthylés en présence de S-Adénosyle-méthionine tritié et de tyrphostin pourra désormais être suivie par simple mesure de la radioactivité incorporée. Les protéines purifiées pourront ensuite être identifiées et caractérisées. Idéalement, il serait souhaitable de parvenir à une reconstitution du phénomène de la stimulation de l'activité PIMT par le GTP γ S en système acellulaire. Pour y parvenir, il sera possiblement nécessaire de purifier et d'identifier quelques participants additionnels, tels une estérase, ou encore cette kinase dont l'inhibition par la génistéine affecte la stimulation GTP γ S-dépendante de l'activité PIMT. L'identification (dans la mesure du possible) de toutes les protéines impliquées devrait nous éclairer sur la signification physiologique de la régulation par le GTP de la carboxyméthylation pour les fonctions rénales.

CHAPITRE V: BIBLIOGRAPHIE

Adra, C.N., Manor, D., Ko, J.L., Zhu, S., Horiuchi, T., Van Aelst, L., Cerione, R.A. and Lim B., (1997) RhoGDI γ : A GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94, 4279-4284**

Aktories, K., (1997) Bacterial Toxins That Target Rho Proteins. *J. Clin. Inv.* **99, 827-829**

Alam, M.R., Johnson, R.C., Darlington, D.N., Hand, T.A., Mains, R.E. and Eipper, B.A., (1997) Kalirin, a Cytosolic Protein with Spectrin-like and GDP/GTP Exchange Factor-like Domains That Interacts with Peptidylglycine α -Amidating Monooxygenase, an Integral Membrane Peptide-processing Enzyme. *J. Biol. Chem.* **272, 12667-12675**

Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M.C. and Zerial, M., (1994) Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* **13, 5262-5273**

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K., (1996) Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* **271, 20246-20249**

Armstrong, S.A., Hannah, V.C., Goldstein, J.L. and Brown, M.S., (1995) CAAX Geranylgeranyl Transferase Transfers Farnesyl as Efficiently as Geranylgeranyl to RhoB. *J. Biol. Chem.* **270, 7864-7868**

Aspenström, P., Lindberg, U. and Hall, A., (1996) Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Biol.* **6**, 70-75

Aspenström, P., (1997) A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* **7**, 479-487

Backlund, P.S. Jr., (1997) Post-translational Processing of RhoA. Carboxyl Methylation of the Carboxyl-terminal Prenylcysteine Increases the Half-life of RhoA. *J Biol Chem.* **272**, 33175-33180.

Bagrodia, S., Taylor, S.J., Creasy, C.L., Chernoff, J. and Cerione, R.A., (1995a) Identification of a Mouse p21^{Cdc/Rac} Activated Kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 22731-22737

Bagrodia, S., Dérijard, B., Davis, R.J. and Cerione, R.A., (1995b) Cdc42 and PAK-mediated Signaling Leads to Jun Kinase and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *J. Biol. Chem* **270**, 27995-27998

Baldassare, J.J., Jarpes, M.B., Alferes, L. and Raben, D.M., (1997) Nuclear Translocation of RhoA Mediates the Mitogen-induced Activation of Phospholipase D Involved in Nuclear Envelope Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **272**, 4911-4914

Bashour, A.-M., Fullerton, A.T., Hart, M.J. and Bloom, G.S., (1997) IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding Protein, Directly Binds and Cross-links Microfilaments. *J. Cell Biol.* **137**, 1555-1566

Best, A., Ahmed, S., Kozma, R. and Lim, L., (1996) The Ras-related GTPase Rac1 Binds Tubulin. *J. Biol. Chem.* **271**, 3756-3762

Billuart, P., Biennu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, M.C., Zemni, R., Roest Crolius, H., Carrié, A., Fauchereau, F., Cherry, M., Briault, S., Hamel, B., Fryns, J-P., Beldjord, C., Kahn, A., Moraine, C and Chelly, J., (1998) Oligophrenin-1 encodes a rhoGap protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* **392**, 923-926

Boivin, D. and Béliveau, R., (1995) Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *Am. J. Physiol.* **269**, F180-F189

Bokoch, G. M., Bohl, B.P. and Chuang, T.-H., (1994) Guanine Nucleotide Exchange Regulates Membrane Translocation of Rac/Rho GTP-Binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 31674-31679

Bokoch, G.M., (1995) Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol.* **5**, 109-113

Bokoch, G.M., Wang, Y., Bohl, B.P., Sells, M.A., Quilliam, L.A. and Knaus, U.G., (1996a) Interaction of the Nck Adapter Protein with p21-activated Kinase (PAK1). *J. Biol. Chem.* **271**, 25746-25749

Bokoch, G.M., Vlahos, C.J., Wang, Y., Knaus, U.G. and Traynor-Kaplan, A.E., (1996b) Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. J.* **315**, 775-779

Bokoch, G.M., (1996c) Interplay between Ras-related and heterotrimeric GTP binding proteins: lifestyles of the BIG and little. *FASEB J.* **10**, 1290-1295

Bourmeyster, N. and Vignais, P.V., (1996) Phosphorylation of Rho GDI Stabilizes the Rho A-Rho GDI Complex in Neutrophil Cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **218**, 54-60

Bowtell, D., Fu, P., Simon, M. and Senior, P., (1992) Identification of murine homologues of the *Drosophila* son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6511-6515

Bretscher, A., Reczek, D. and Berryman, M., (1997) Ezrin: a Protein Requiring Conformational Activation to Link Microfilaments to the Plasma Membrane in the Assembly of Cell Surface Structures. *J. Biol. Chem.* **273**, 19797-19801

Burbelo, P.D., Drechsel, D. and Hall, A., (1995) A Conserved Binding Motif Defines Numerous Candidate Target Proteins for Both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* **270**, 29071-29074

Cantley, L.G., (1996) Growth factors and the kidney: regulation of epithelial cell movement and morphogenesis. *Am. J. Physiol.* **271**, F1103-F1113

Carlier, M.F. and Pantaloni, D., (1997) Control of actin dynamics in cell motility. *J. Mol. Biol.* **269**, 459-467

Chan, A.M.-L., McGovern, E.S., Catalano, G., Fleming, T.P. and Miki, T., (1994) Expression cDNA cloning of a novel oncogene with sequence similarity to regulators of small GTP-binding proteins. *Oncogene*, **9**, 1057-1063

Chan, A.M.-L., Takai, S., Yamada, K. and Miki, T., (1996) Isolation of a novel oncogene, NET1, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning. *Oncogene* **12**, 1259-1266

Chen, Y., Ma, Y.T. and Rando, R.R., (1996) Solubilization, partial purification, and affinity labeling of the membrane-bound isoprenylated protein endoprotease. *Biochemistry* **35**, 3227-3237

Chong, L.D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G.M. and Schwartz, M.A., (1994) The Small GTP-Binding Protein Rho Regulates a Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase in Mammalian Cells. *Cell* **79**, 507-513

Chou, M.M. and Blenis, J., (1996) The 70 kDa S6 Kinase Complexes with and is Activated by the Rho Family G Proteins Cdc42 and Rac1. *Cell* **85**, 573-583

Chuang, T-H., Xu, X., Kaartinen, V., Heisterkamp, N., Groffen, J. and Bokoch, G.M., (1995) Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10282-10286

Coso. O.A., Chiariello, M., Yu, J.-C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. and Gutkind, J.S., (1995) The small GTP-Binding Proteins Rac1 and Cdc42 Regulate The Activity of the JNK/SAPK Signaling Pathway. *Cell* **81**, 1137-1146

Coso. O.A., Teramoto, H., Simonds, W.F. and Gutkind, J.S., (1996) Signaling from G Protein-coupled Receptors to c-Jun Kinase Involves Beta Gamma Subunits of Heterotrimeric G Proteins Acting on a Ras and Rac1-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 3963-3966

Crepaldi, T., Gautreau, A., Comoglio, P.M., Louvard, D. and Arpin, M., (1997) Ezrin Is an Effector of Hepatocyte Growth Factor-mediated Migration and Morphogenesis in Epithelial Cells. *J. Cell Biol.* **138**, 423-434

Dai, Q., Choy, E., Chiu, V., Romano, J., Slivka, S.R., Steitz, S.A. Michaelis, S. and Philips, M.R., (1998) Mammalian Prenylcysteine Carboxyl Methyltransferase is in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **273**, 15030-15034

Dallery E., Galiègue-Zouitina, S., Collyn-d'Hooghe, M., Quief, S., Denis, C., Hildebrand, M-P., Lantoine, D., Deweindt, C., Tilly, H., Bastard, C. and Kerckaert, J-P., (1995) *TTF*, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma-associated *LAZ3* gene by t(3;4) chromosomal translocation. *Oncogene* **10**, 2171-2178

Dallery-Prudhomme E., Roumier, C., Denis, C., Preudhomme C., Kerckaert, J-P. and Galiègue-Zouitina, S., (1997) Genomic Structure and Assignment of the RhoH/TTF Small GTPase Gene (*ARHH*) to 4p13 by *in Situ* Hybridization. *Genomics* **43**, 89-94

Danley, D.E., Chuang, T-H. and Bokoch, G.M., (1996) Defective Rho GTPase Regulation by IL-1-B-Converting Enzyme-Mediated Cleavage of D4 GDP Dissociation Inhibitor. *J. immunol.* **157**, 500-503

Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. and Ullrich A., (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**, 557-560

Debant, A., Serra-Pagès, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S-H. and Streuli, M., (1996) The multidomain protein Trio binds the LAR

transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**, 5466-5471

Diekmann, D., Nobes, C.D., Burbelo, P.D., Abo, A. and Hall, A., (1995) Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites. *EMBO J.* **14**, 5297-5305

Dirac-Svejstrup, A.B., Sumizawa, T. and Pfeffer, S.R., (1997) Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* **16**, 465-472

Drivas, G.T., Shih, A., Coutavas, E., Rush, M.G. and D'Eustachio, P., (1990) Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1793-1798

Dunten, R.L., Wait, S.J., and Backlund, P.S. Jr., (1995) Fractionation and characterization of protein C-terminal prenylcysteine methylesterase activities from rabbit brain. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 174-182

Eva, A. and Aaronson, S.A., (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma *Nature* **316**, 273-275

Esteve, P., del Peso, L. and Lacal, J.C., (1995) Induction of apoptosis by *rho* in NIH3T3 cells requires two complementary signals. Ceramides function as a progression factor for apoptosis. *Oncogene* **11**, 2657-2665

Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C. and Boquet, P., (1997) Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **387**, 729-733

Foster, R., Hu, K.-Q., Lu, Y., Nolan, K.M., Thissen, J. and Settleman, J., (1996) Identification of a Novel Human Rho Protein with Unusual Properties: GTPase Deficiency and In Vivo Farnesylation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2689-2699

Franger, G.R., Lassignal Johnson, N. and Johnson, G.L., (1997) MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J.* **16**, 4961-4972

Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R. and Tschlis, P.N., (1995) The protein kinase encoded by Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**, 727-736

Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A. and Cheresh, D.A., (1995) Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* **27**, 1500-1502

Frohman, M.A. and Morris, A.J., (1996) Phospholipid signalling: Rho is only ARF the story. *Curr. Biol.* **6**, 945-947

Frost, J.A., Xu, S., Hutchison, M.R., Marcus, S. and Cobb, M.H., (1996) Actions of Rho Family Small G Proteins and p21-Activated Protein Kinases on Mitogen-Activated Protein Kinase Family Members. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3707-3713

Fritz, G., Kaina, B. and Aktories, K., (1995) The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J. Biol. Chem.* **270**, 25172-25177

Fujisawa, K., Fujita, A., Ishizaki, T., Saito, Y. and Narumiya, S., (1996) Identification of the Rho-binding Domain of p160^{ROCK}, a Rho-associated Coiled-coil Containing Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 23022-23028

Fukamoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. and Takai, Y., (1990) Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the *rho* proteins, *ras* p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* **5**, 1321-1328

Gauthier-Rouvière, C., Vignal, E., Mériane, M., Roux, P., Montcourier, P. and Fort, P., (1998) RhoG GTPase Controls a Pathway That Independently Activates Rac1 and Cdc42Hs. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1379-1394

Gebbink, M.F.B.G., Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F.P.G., Houssa, B. and Moolenaar, W.H., (1997) Identification of a Novel, Putative Rho-specific GDP/GTP Exchange Factor and a RhoA-binding Protein: Control of Neuronal Morphology. *J. Cell. Biol.* **137**, 1603-1613

Ghomashchi, F., Zhang, X., Liu, L. and Gelb, M.H., (1995) Binding of prenylated and polybasic peptides to membranes: affinities and intervesicle exchange. *Biochem.* **34**, 11910-11918

Gilmore, A.P. and Burridge, K., (1996) Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure* **4**, 647-651

Gingras, D. and Béliveau, R., (1992) Guanine nucleotides stimulate carboxyl methylation of kidney cytosolic proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1136**, 150-154

Gingras, D., Gauthier, F., Lamy, S., Desrosiers, R.R. and Béliveau, R., (1998) Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 888-893

Glomset, J.A. and Farnsworth, C.C., (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 181-205

Gorvel, J.P., Chang, T.C., Boretto, J., Azuma, T. and Chavrier, P., (1998) Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett.* **422**, 269-273.

Gosser, Y.Q., Nomanbhoy, T.K., Aghazadeh, B., Manor, D., Combs, C., Cerione, R.A. and Rosen, M.K., (1997) C-terminal binding domain of RhoGDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* **387**, 814-819

Guasch, R.M., Scambler, P., Jones, G.E. and Ridley, A.J., (1998) RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4761-4771.

Guillemot, J.-C., Kruskal, B.A., Adra, C.N., Zhu, S., Ko, J.-L., Burch, P., Nocka, K., Seetoo, K., Simons, E. and Lim, B., (1996) Targeted Disruption of Guanosine Diphosphate-Dissociation Inhibitor for Rho-Related Proteins, GDID4: Normal Hematopoietic Differentiation but Subtle defect in Superoxide Production by Macrophages Derived From In Vitro Embryonal Stem Cell Differentiation. *Blood* **88**, 2722-2731

Gulbins, E., Coggeshall, K.M., Brenner, B., Schlottmann, K., Linderkamp, O. and Lang, F., (1996) Fas-induced Apoptosis is Mediated by

Activation of a Ras and Rac Protein-regulated Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 26389-26394

Gutkind, J.S. and Vitale-Cross, L., (1996) The pathway linking small GTP-binding proteins of the Rho family to cytoskeletal components and novel signaling kinase cascades. *Cell Dev. Biol.* **7**, 683-690

Haataja, L., Groffen, J. and Heisterkamp, P., (1997) Characterization of *Rac3*, a Novel Member of the Rho Family. *J. Biol. Chem.* **272**, 20384-20388

Habets, G.G.G., Scholtes, E.H.M., Zuydgeest, D., van der Kammen, R.A., Stam, J.C., Berns, A. and Collard, J.G., (1994) Identification of an Invasion-Inducing Gene, *Tiam-1*, That Encodes a Protein with Homology to GDP-GTP Exchangers for Rho-Like Proteins. *Cell* **77**, 537-549

Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G.D., Frohman, M.A. and Morris, A.J., (1997) Characterization of Two Alternately Spliced Forms of Phospholipase D1. Activation of the Purified Enzymes by Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation Factor, and Rho Family Monomeric GTP-binding Proteins and Protein Kinase C- α . *J. Biol. Chem.* **272**, 3860-3868

Hancock, J.F. and Hall, A., (1993) A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *EMBO J.* **12**, 1915-1921

Harhammer, R., Gohla, A. and Schultz, G., (1996) Interaction of G protein $G\beta\gamma$ dimers with small GTP-binding proteins of the Rho family. *FEBS lett.* **399**, 211-214

Hart, M.J., Sharma, S., elMasry, N., Qiu, R-G., McCabe, P., Polakis, P. and Bollag, G., (1996) Identification of a Novel Guanine Nucleotide Exchange Factor for the Rho GTPase. *J. Biol. Chem.* **271**, 25452-25458

Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C. and Bollag, G., (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* **280**, 2112-2114.

Hartwig, J.H., Bokoch, G.M. Carpenter, C.L., Janmey, P.A., Taylor, L.A., Toker, A. and Stossel, T.P., (1995) Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* **82**, 643-653

Hawinks, P.T., Eguinoa, A., Qiu, R.G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M. and Stephens, L., (1995) PDGF stimulates an increase in GTP-rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* **5**, 393-403

Heiska, L., Alfthan, K., Gronholm, M., Vilja, P., Vaheri, A., Carpen, O., (1998) Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation By phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol. Chem.* **273**, 21893-21900

Hildebrand, J.D., Taylor, J.M. and Parsons, T., (1996) An SH3 Domain-Containing GTPase-activating Protein for Rho and Cdc42 Associates with Focal Adhesion Kinase. *Mol Cell. Biol.* **16**, 3169-3178

Hill, C.S., Wynne, J. and Treisman, R., (1995) The Rho Family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs Regulate Transcriptional Activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-1170

Hirao, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y., Tsukita, S. and Tsukita, S., (1996) Regulation Mechanism of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Protein/Plasma Membrane Association: Possible Involvement of Phosphatidylinositol Turnover and Rho-dependent Signaling Pathway. *J. Cell Biol.* **135**, 37-51

Homma, Y. and Emori, Y., (1995) A dual functional signal mediator showing RhoGap and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J.* **14**, 286-291

Hooley, R., Yu, C-Y., Symons, M. and Barber, D.L., (1996) G alpha 13 stimulates Na-H exchange through distinct Cdc42-dependent and Rho-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **271**, 6152-6158

Horii, Y., Beeler, J.F., Sakaguchi, K., Tachibana, M. and Miki, T., (1994) A novel oncogene *ost*, encodes a guanine nucleotide exchange factor that potentially links Rho and Rac signaling pathways. *EMBO J.* **13**, 4776-4786

Hotta, K., Tanaka, K., Mino, A., Kohno, H. and Talai, Y., (1996) Interaction of the Rho Family Small G Proteins with Kinectin, an Anchoring Protein of Kinesin Motor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **225**, 69-74

Hrycyna, C.A., Sapperstein, S.K., Clarke, S. and Michaelis, S., (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* *STE14* gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of α -factor and RAS proteins. *EMBO. J.* **10**, 1699-1709

Hu, K.Q. and Settleman, J., (1997) Tandem SH2 binding sites mediate the RasGap-RhoGap interaction: A conformational mechanism for SH3 domain regulation. *EMBO. J.* **16**, 473-483

Imai, Y., Davey, J., Kawagishi, M. and Yamamoto, M., (1997) Genes encoding farnesyl cysteine carboxyl methyltransferase in *Schizosaccharomyces pombe* and *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1543-1551

Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. and Narumiya, S., (1996) *EMBO. J.* **15**, 1885-1893

Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y., and Narumiya, S., (1997) *FEBS Lett.* **404**, 118-124

Jiménez, B., Arends, M., Esteve, P., Perona, R., Sanchez, R., Ramon y Cajal, S., Wyllie A. and Lacal, J.C., (1995) Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpression of *rho-p21*, a GTPase protein of the *ras* superfamily. *Oncogene* **10**, 811-816

Julien-Flores, V.J., Dorseuil, O., Romero, F., Letourneur, F., Saragosti, S., Berger, R., Taviatan, A., Gacon, G. and Camonis, J.H., (1995) Bridging RalGTPase to Rho Pathways. RLIP76, a Ral effector with Cdc42/Rac GTPase-activating protein activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 22473-22477

Karnam, P., Standaert, M. L., Galloway, L. and Farese, R. V., (1997) Activation and Translocation of Rho (and ADP Ribosylation Factor) by Insulin in Rat Adipocytes. *J. Biol.Chem.* **272**, 6136-6140

Katzav, S., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M., (1989) vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J.* 8, 2283-2290

Keep, N.H., Barnes, M., Barsukov, I., Badii, R., Lian, L.-Y., Segal, A.W., Moody, P.C.E. and Roberts, G.C.K., (1997) A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. *Curr. Biol.* 5, 623-633

Keller, J., Schmidt, M., Hussein, B., Rümenapp, U. and Jakobs, K.H., (1997) Muscarinic receptor-stimulated cytosol-membrane translocation of RhoA. *FEBS Letters* 403, 299-302

Khosravi-Far, R., Chrzanowska-Wodnicka, M., Solski, P.A., Eva, A., Burridge, K. and Der, C.J., (1994) Dbl and Vav Mediate Transformation via Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways That Are Distinct from Those Activated by Oncogenic Ras. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6848-6857

Kikuchi, A., Kuroda, S., Sasaki, T., Kotani, K., Hirata, K.-I., Katayama, M. and Takai, Y., (1992) Functional Interactions of Stimulatory and Inhibitory GDP/GTP Exchange Proteins and Their Common Substrate Small GTP-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 267, 14611-14615

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K., (1996) Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase) *Science* 273, 245-248

Kirchhausen, T. and Rosen, F.S., (1996) Disease mechanism: unravelling Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Biol.* **6**, 667-678

Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh, T. and Takai, Y., (1993) Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI). *J. Cell Biol.* **120**, 1187-1195

Kowluru, A. Li, G. and Metz, S.A., (1996) Glucose- and GTP-dependent stimulation of the carboxyl methylation of CDC42 in rodent and human pancreatic islets and pure beta cells. Evidence for an essential role of GTP-binding proteins in nutrient-induced insulin secretion. *J Clin Invest.* **98**, 540-555

Komuro, R., Sasaki, T., Takaishi, K., Orita, S. and Takai, Y., (1996) Involvement of Rho and Rac small G proteins and Rho GDI in Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells. *Genes Cells* **1**, 943-951

Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J. Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G. and Sternweis, P.C., (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* **280**, 2109-2111.

Lacal, J.C., (1997) Regulation of proliferation and apoptosis by Ras and Rho GTPases through specific phospholipid-dependent signaling. *FEBS Lett.* **410**, 73-77

Lamarche, N. and Hall, A., (1994) GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* **10**, 436-440

Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P.D., Aspenström, P., Bridges, T., Chant, J. and Hall, A., (1996) Rac and Cdc42 Induce Actin

Polymerisation and G1 Cell Cycle Progression Independently of p65^{PAK} and the JNK/SAPK MAP Kinase Cascade. *Cell* **87**, 519-529

Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. and Bertoglio, J., (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* **15**, 510-519

Laudanna, C., Campbell, J.J. and Butcher, E.C., (1996) Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* **271**, 981-983.

Lebowitz, P.F., Davide, J.P. and Prendergast, G.C., (1995) Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol.* **15**, 6613-6622.

Lebowitz, P.F., Casey P.J., Prendergast, G.C. and Thissen J.A., (1997) Farnesyltransferase inhibitors alter the prenylation and growth-stimulating function of RhoB. *J. Biol. Chem.* **272**, 15591-15594

Lelias, J.-M., Adra, C.N., Wulf, G.M., Guillemot, J.-C., Khagad, M., Caput, D. and Lin, B., (1993) cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDI-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1479-1483

Leonard, D., Hart, M.J., Platko, J.V., Eva, A., Henzel, W., Evans, T. and Cerione, R.A., (1992) The Identification and Characterization of a GDP-dissociation Inhibitor (GDI) for the CDC42Hs Protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 22860-22868

Leung, T., Manser, E., Tan, L. and Lim, L., (1995) A Novel Serine/threonine Kinase Binding the Ras-related RhoA GTPase which Translocates the Kinase to Peripheral Membranes. *J. Biol. Chem.* **270**, 29051-29054

Li G., Kowluru, A. and Metz, S.A., (1996) Characterization of prenylcysteine methyltransferase in insulin-secreting cells. *Biochem. J.* **316**, 345-351

Lim, L., Manser, E., Leung, T. and Hall, C., (1996) Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. *Eur. J. Biochem.* **242**, 171-185

Lin, R., Bagrodia, S., Cerione, R. and Manor, D., (1997) A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr Biol.* **7**, 794-797.

Liscovistch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C.S. and Cantley, L.C., (1994) Novel function of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **269**, 21403-21406

Lores, P., Morin, L., Luna. and Gacon, G., (1997) Enhanced apoptosis in the thymus of transgenic mice expressing constitutively activated forms of human Rac2 GTPase. *Oncogene* **15**, 601-605

Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J., Witte. O.N., (1990) Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247**, 1079-1082

Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y., Jan, Y.N., (1994) Distinct morphogenetic functions of similar samll GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* **8**, 1787-1802

Lu, W., Katz, S., Gupta, R. and Mayer, B.J., (1997) Activation of PAK by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Curr. Biol.* **7**, 85-94

Lynch, E.D., Lee, M.K., Morrow, J.E., Welcsh, P.L., Leon, P.E. and King, M.C., (1997) Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science* **278**, 1315-1318.

Machide, M., Mano, H. and Todokoro, K., (1995) Interleukin 3 and erythropoietin induce association of Vav with Tec kinase through Tec homology domain. *Oncogene* **11**, 619-625

Machesky, L.M., (1998) Cytokinesis: IQGAPs find a function. *Curr. Biol.* **8**, R202-R205

Madaule, P., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Morii, N. and Narumiya, S., (1995) A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS LETT.* **377**, 243-248

Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T and Narumiya, S., (1998) Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* **394**, 491-494

Malcolm, K.C., Ross, A.H., Qiu, R.-G., Symons, M. and Exton, J.H., (1994) Activation of Rat Liver Phospholipase D by the Small GTP-binding Protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **269**, 25951-25954

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Tan, L. and Lim, L., (1993) A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42. *Nature* **363**, 364-367

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.-S. and Lim, L., (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**, 40-46

Martin, G.A., Bollag, G., McCormick, F. and Abo, A., (1995) A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *EMBO J.* **14**, 1970-1978

Maru, Y. and Witte, O.N., (1991) The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* **67**, 459-468

Matsuda, S., Nakanishi, H., Sasaki, T. and Takai, Y., (1996) A membrane-associated GDP/GTP exchange protein specific for Rho small GTP-binding protein-partial purification and characterization from rat brain. *Oncogene* **12**, 915-920

Matsui, T., Amano, M. Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K., (1996) Rho-associated kinase, a novel serine threonine/kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* **15**, 2208-2216

Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S. and Tsukita, S., (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol.* **140**, 647-657.

McCallum, S.J., Wu, W.J. and Cerione, R.A., (1996) Identification of a Putative Effector for Cdc42Hs with High Sequence Similarity to the RasGap-

related Protein IQGAP1 and a Cdc42Hs Binding Partner with Similarity to IQGAP2. *J. Biol. Chem.* **271**, 21732-21737

McGlade, J., Brunkhorst, B., Anderson, D., Mbamalu, G., Settleman, J., Dedhar, S., Rozakis-Adcock, M., Chen, L.B. and Pawson, T., (1993) The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J.* **12**, 3073-3081

Michiels, F., Habets, G.G., Stam, J.C., van der Kammen, R.A. and Collard, J.G., (1995) A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* **375**, 338-340

Miki, T., Smith, C.L., Long, J.E., Eva, A. and Fleming T.P., (1993) Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature* **362**, 462-465

Minden, A., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A. and Karin, M., (1995) Selective Activation of the JNK Signaling Cascade and c-Jun Transcriptional Activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-1157

Mizuno, T., Kaibuchi, K., Ando, S., Musha, T., Hiraoka, K., Takaishi, K., Asada, M., Nuno, H., Matsuda, I. and Takai, Y., (1992) Regulation of the superoxide-generating NADPH oxidase by a small GTP-binding protein and its stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *J Biol Chem.* **267**, 10215-10218

Moomaw, J.F. and Casey, P.J., (1992) Mammalian protein geranylgeranyltransferase. Subunit composition and metal requirements. *J. Biol. Chem.* **267**, 17438-17443

Mukai, H., Toshimori, M., Shibata, H., Kitagawa, M., Shimakawa, M., Miyahara, M., Sunakawa, H. and Ono, Y., (1996) PKN Associates and Phosphorylates the Head-Rod Domain of Neurofilament Proein. *J. Biol. Chem.* 271, 9816-9822

Mukai, H., Toshimori, M., Shibata, H., Takanaga, H., Kitagawa, M., Miyahara, M., Shimakawa, M. and Ono, Y., (1997) Interaction of PKN with α -Actinin. *J. Biol. Chem.* 272, 4740-4746

Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lütcke, A., Parton, R.G. and Zerial, M., (1996) Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* 384, 427-432

Na, S., Chuang, T.H., Cunningham, A., Turi, T.G., Hanke, J.H., Bokoch, G.M. and Danley, D.E., (1996) D4-GDI, a Substrate of CPP32, Is Proteolyzed during Fas-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 11209-11213

Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. and Narumiya, S., (1996) ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 392, 189-193

Narumiya, S., (1996) The Small GTPase Rho: Cellular Functions and Signal Transduction *J. Biochem.* 120, 215-228

Nicholson, D.W. et Thornberry, N.A., (1997) Caspases: killer proteases. *TIBS* 22, 299-306

Nimnual, A.S., Yatsula, B.A. and Bar-Sagi, D., (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* **279**, 560-563

Nobes, C.D., Hawkins, P., Stephens, L. and Hall, A., (1995) Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J. Cell. Sci.* **108**, 225-233

Nobes, C.D. and Hall, A., (1995b) Rho, Rac, and CDC42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62

Nobes, C.D., Lauritzen, I., Mattei, M.G., Paris, S., Hall, A. and Chardin, P., (1998) A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J. Cell. Biol.* **141**, 187-197

Noël, J. and Pouyssegur, J., (1995) Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Am. J. Physiol.* **268**, C283-C296

Nomanbhoy, T.K. and Cerione, R.A., (1996) Characterization of the Interaction between RhoGDI and Cdc42Hs Using Fluorescence Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **17**, 10004-10009

Olson, M.F., Ashworth, A. and Hall, A., (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**, 1270-1272

Park, H.O., Bi, E., Pringle, J.R. and Herskowitz, I., (1997) Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4463-4468

Pasteris, N.G., Cadle, A., Logie, L.J., Porteous, M.E.M., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Glover, T.W., Wilroy, R.S. and Gorski, J.L., (1994) Isolation and Characterization of the Faciogenital Dysplasia (Aarskog-Scot Syndrome) Gene: A Putative Rho/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Cell* **79**, 669-678

Pelletier, J., Desrosiers, R.R. and Béliveau, R., (1996) Age-related changes in carboxyl methylation of proteins in the kidney. *Mech. Ageing Dev.* **86**, 115-135

Peppelenbosch, M.P., Qiu, R.G., de Vries-Smits, A.M.M., Tertoolen, L.G.J., de Laat, S.W., McCormick, F., Hall, A., Symons, M.H. and Bos, J.L., (1995) Rac Mediates Growth Factor-Induced Arachidonic Acid Release. *Cell* **81**, 849-856

Perone, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Pérez, I., Bravo, R. and Lacal, J.C., (1997) Activation of the nuclear factor- κ B by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* **11**, 463-475

Platko, J.V., Leonard, D.A., Adra, C.N., Shaw, R.J., Cerione, R.A. and Lim, B., (1995) A single residue can modify target-binding affinity and activity of the functional domain of the Rho-subfamily GDP dissociation inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 2974-2978

Qiu, R.G., Abo, A., McCormick, F. and Symons, M., (1997) Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol.* **17**, 3449-3458.

Quilliam, L.A., Lambert, Q.T., Mickelson-Young, L.A., Westwick, J.K., Sparks, A.B., Kay, B.K., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. and Der, C.J., (1996) Isolation of a NCK-associated Kinase, PRK2, an SH3-Binding Protein and Potential Effector of Rho Protein Signaling. *J. Biol. Chem.* **271**, 28772-28776

Rameh, L.E., Chen, C.S. and Cantley, L.C., (1995) Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* **83**, 821-830

Rando, R.R., (1996) Chemical biology of protein isoprenylation/methylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 5-16

Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P. and Narumiya, S., (1996) Rhotekin, a New Putative Target for Rho Bearing Homology to a Serine/Threonine Kinase, PKN, and Rhoophilin in the Rho-binding Domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 13556-13560

Reinhard, J., Scheel, A.A., Diekmann, D., Hall, A., Ruppert, C. and Bähler, M., (1995a) A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *EMBO J.* **14**, 697-704

Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M. and Walter, U., (1995b) The profilin-rich focal adhesion

and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* **14**, 1583-1589

Ren, X.-D., Bokoch, G.M., Traynor-Kaplan, A., Jenkins, G.H., Anderson, R.A. and Schwartz, M.A., (1996) Physical Association of the Small GTPase Rho with a 68-kDa Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase in Swiss 3T3 Cells. *Mol. Biol. Cell* **7**, 435-442

Ridley, A.J. Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A., (1992a) The small GTP-binding Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410

Ridley, A.J. and Hall, A., (1992b) The small GTP-binding rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399

Ridley, A.J. and Hall, A., (1994) Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO J.* **13**, 2600-2610

Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S.J. and Smerdon, S.J., (1997) Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* **388**, 693-697

Rockow, S.H., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E.Y., Chen, M., Margolis, B. and Li, W., (1997) Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adaptor protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1709-1721

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. and Downward, J., (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-532

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. and Downward, J., (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* **15**, 2442-2451

Rubin, E.J., Gill, D.M., Boquet, P. and Popoff, M., (1988) Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 418-426

Sadoshima, J. and Izumo, S., (1996) The heterotrimeric Gq protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J.* **15**, 775-787

Sah, V.P., Hoshijima, M., Chien, K.R. and Brown, J.H., (1996) Rho is required for G α q and α 1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *J Biol Chem.* **271**, 31185-31190.

Sapperstein, S., Berkower, C. and Michaelis, S., (1994) Nucleotide Sequence of the Yeast *STE14* Gene, Which Encodes Farnesylcysteine Carboxyl Methyltransferase, and Demonstration of its Essential Role in α -Factor Export. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1438-1449

Saras, J., Frenzen, P., Aspenström, P., Hellman, U., Gonez, L.J. and Heldin, C.-H., (1997) A Novel GTPase-activating Protein for Rho Interacts

with a PDZ Domain of the Protein-tyrosine Phosphatase PTPL1. *J. Biol. Chem.* **272**, 24333-24338

Sasaki, T. and Takai, Y., (1998) The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun.* **245**, 641-645

Satoh, T., Kato, J., Nishida, K. and Kaziro, Y., (1996) Tyrosine phosphorylation of ACK in response to temperature shift-down, hyperosmotic shock, and epidermal growth factor stimulation. *FEBS Lett.* **386**, 230-234

Schaw, G., (1996) The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *BioEssays* **18**, 35-45

Schwiebert, L.M., Mooney, J.L., van Horne, S., Gupta, A. and Schleimer, R.P., (1997) Identification of novel inducible genes in airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **17**, 106-113

Seabra, M.C., Goldstein, J.L., Sudhof, T.C. and Brown, M.S., (1992) Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *J Biol Chem.* **267**, 14497-14503

Settleman, J., Albright, C.F., Foster, L.C. and Weinberg, R.A., (1992) Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* **359**, 153-154

Sherle, P., Behrens, T. and Staudt, L., (1993) Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7568-7572

Shou, C., Farnsworth, C.L., Neel, B.G. and Feig, L.A., (1992) Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* **358**, 351-354

Spaargaren, M. and Bischoff, J.R., (1994) Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras and Rap. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**, 12609-12613

Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F.T., Jackson, T.R., Sternweis, P.C. and Hawkins, P.T., (1994) A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell* **77**, 83-93

Stossel, T.P., (1993) On the Crawling of Animal Cells. *Science* **260**, 1086-1094

Stoyanova, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nürnberg, B., Gierschik, P., Seedorf, K., Hsuan, J.J., Waterfield, M.D. and Wetzker, R., (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* **269**, 690-693

Sylvius, J.R., and L'Heureux, F., (1994) Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. *Biochem.* **33**, 3014-3022

Symons, M., Derry, J.M.J., Karlak, B., Jiang, S., Lamahieu, V., McCormick, F., Francke, U. and Abo, A., (1996) Wiskott-Aldrich Syndrome Protein a Novel Effector for the GTPase CDC42Hs, Is Implicated in Actin Polymerization. *Cell* **84**, 723-734

Takaishi, K., Sasaki, T., Kameyama, T., Tsukita, S., Tsukita, S and Takai, Y., (1995) Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* **11**, 39-48

Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S., Tsukita, S. and Takai, Y., (1997) Direct Interaction of the Rho GDP Dissociation Inhibitor with Ezrin/Radixin/Moesin Initiates the Activation of the Rho Small G Protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 23371-23375

Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Hotta, I., Takaishi, K., Imamura, H., Nakano, K., Kodama, A. and Takai, Y., (1998) Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene* **16**, 3279-3284

Tapon, N., Nagata, K-I., Lamarche, N. and Hall, A., (1998) A new RAC target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF- κ B signalling pathways. *EMBO J.*, **17**, 1395-1404

Teramoto, H., Coso, O.A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T. and Gutkind, J.S., (1996) Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J. Biol. Chem.* **271**, 27225-27228

Toksov, D. and Williams, D.A., (1994) Novel human oncogene *lbc* detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products. *Oncogene* **9**, 621-628

Tolias, K.F., Cantley, L.C. and Carpenter, C.L., (1995) Rho Family GTPases Bind to Phosphoinositide Kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 17656-17659

Tominaga, T., Sugie, K., Hirata, M., Morii, N., Fukata, J., Uchida, A., Imura, H. and Narumiya, S., (1993) Inhibition of PMA-induced, LFA-1-dependent lymphocyte aggregation by ADP-ribosylation of the small molecular weight GTP-binding protein rho. *J. Cell Biol.* **120**, 1529-1537

Tominaga, T., Ishizali, T., Narumiya, S. and Barber, D.L., (1998a) p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J.*, **17**, 4712-4722

Tominaga, T. and Barber, D.L., (1998b) Na-H Exchange Acts Downstream of RhoA to Regulate Integrin-induced Cell Adhesion and Spreading. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2287-2303

Touré, A., Dorseuil, O., Morin, L., Timmons, P., Jégou, B., Reibel, L. and Gacon G., (1998) MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to *Drosophila rotundRacGAP* gene product, is expressed in male germ cells. *J Biol Chem.* **273**, 6019-6023

Tribioli, C., Droetto, S., Bione, S., Cesareni, G., Torrisi, M.R., Lotti, L.V., Lanfrancone, L., Toniolo, D. and Pelicci, P.G., (1996) An X chromosome-linked gene encoding a protein with characteristics of a rhoGAP predominantly expressed in hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 695-699

Tsukita, A., Yonemura, S. and Tsukita, S., (1997) ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 70-75

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. and Narumiya, S., (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-994

Van Aelst, L., Joneson, T. and Bar-Sagi, D., (1996) Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *EMBO J.* **15**, 3778-3786

Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C., (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295-2322

Van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Tourhara, K., Porfiri, E., Kakahue, K., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J., (1995) Receptor-tyrosine-kinase-and $G\beta\gamma$ -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* **376**, 781-784

Varner, J.A. and Cheresh, D.A., (1996) Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* **8**, 724-730

Vexler., Z., Symons, M. and Barber, D.L., (1996) Activation of Na-H exchange is necessary for RhoA-mediated stress fiber formation. *J. Biol. Chem.* **271**, 22281-22284

Vincent, S., Jeanteur, P. and Fort, P., (1992) Growth-Regulated Expression of *rhoG*, a New Member of the *ras* Homolog Gene Family, *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3138-3148

Vincent, S. and Settleman, J., (1997) The PRK2 Kinase Is a Potential Effector Target of both Rho and Rac GTPases and Regulates Actin Cytoskeletal Organization. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2247-2256

Visick, J.E. and Clarke, S., (1995) Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.* **16**, 835-845

Volker, C., Miller, R.A., McCleary, W.R., Rao, A., Poenie, M., Backer, J.M. and Stock, J.B., (1991) Effects of Farnesylcysteine Analogs on Protein Carboxyl Methylation and Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **266**, 21515-21522

Wan, Y., Kurosaki, T. and Huang, X.Y., (1996) Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* **380**, 541-544

Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A. and Narumiya, S., (1996) Protein Kinase N (PKN) and PKN-Related Protein Rhoophilin as Targets of Small GTPase Rho. *Science* **271**, 645-648

Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. and Narumiya, S., (1997) p140^{mDia}, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* **16**, 3044-3056

Whitehead, I.P., Kirk, H., Tognon, C., Trigo-Gonzalez, G. and Kay, R., (1995a) Expression Cloning of *lfc*, a Novel Oncogene with Structural

Similarities to Guanine Nucleotide Exchange Factors and to the Regulatory Region of Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* **270**, 18288-18395

Whitehead, I.P., Kirk, H. and Kay, R., (1995b) Retroviral transduction and oncogenic selection of a cDNA encoding Dbs, a homolog of the Dbl guanine nucleotide exchange factor. *Oncogene* **10**, 713-21

Whitehead, I.P., Khosravi-Far, R., Kirk, H., Trigo-Gonzalez, G., Der, C.J. and Kay, R., (1996) Expression Cloning of *Isc*, A Novel Oncogene with Structural Similarities to the Dbl Family of Guanine Nucleotide Exchange Factors. *J. Biol. Chem.* **271**, 18643-18650

Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J., (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal pathways. *J. Mol. Med.* **74**, 589-607

Whitmarsh, A.J., Yang, S.-S., Su, M.S.-S., Sharrocks, A.D. and Davis, R.J., (1997) Role of p38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases in the Activation of Ternary Complex Factors. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2360-2371

Yamamoto, M., Marui, N., Sakai, T., Morii, N., Kosaki, S., Ikai, K., Imamura, S. and Narumiya, S., (1993) ADP-ribosylation of the RhoA gene product by botulinum C3 Exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of cell cycle. *Oncogene* **8**, 1449-1455

Ye, Z-S. and Baltimore, D., (1994) Binding of Vav to Grb2 through dimerization of Src homology 3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12629-12633

Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honoré, N., Tavitian, A. and Olofsson, B., (1995) Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* **10**, 1935-1945

Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honoré, N., Rousseau-Merck, M.-F., Tavitian, A. and Olofsson, B., (1996) Rho-GDI-3 Is a New GDP Dissociation Inhibitor (GDI). *J. Biol. Chem.* **271**, 30366-30374

Zhang, L., Sachs, C.W., Fines, R.L. and Casey, P.J., (1994) Interaction of Prenylcysteine Methyl Esters with the Multidrug Resistance Transporter. *J. Biol. Chem.* **269**, 15973-15976

Zhang, L. and Casey, P.J., (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241-269

Zhang, R., Tsai, F.Y. and Orkin, S.H., (1994) Hematopoietic development of *vav*^{-/-} mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12755-12759

Zhao, Z.S., Leung, T., Manser, E. and Lim, L., (1995) Pheromone signalling in *saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator CDC24. *Mol. Cell. Bio.* **15**, 5246-5257

Zheng, Y., Fischer, D.J., Santos, M.F., Tigyi, G., Pasteris, N.G. Gorski, J.L. and Xu, Y., (1996) The Faciogenital Dysplasia Gene Product FGD1 Functions as a Cdc42Hs-specific Guanine-Nucleotide Exchange Factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 33169-33172

Zmuidzinas, A., Fischer, K.-D., Lira, S.A., Forrester, L., Bryant, S., Bernstein, A. and Barbacid, M., (1995) The *vav* proto-oncogene is required

early in embryogenesis but not for hematopoietic development *in vitro*. *Embo J.* **14**, 1-11

Zohn, I.M., Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L. and Der, C.J.,
(1998) Rho family proteins and ras transformation: the RHOad less traveled
gets congested. *Oncogene* **17**, 1415-1438

ANNEXE

Contribution des coauteurs

Le Dr Richard Béliveau est mon directeur de recherche. Il m'a fourni l'encadrement professionnel, intellectuel et technique nécessaire à la poursuite de mes travaux.

Le Dr Richard Desrosiers est le superviseur des projets sur les petites protéines G et la méthylation des protéines au laboratoire du Dr Richard Béliveau. Il m'a guidée par ses conseils au niveau conceptuel et technique aux cours de la dernière année de mon doctorat.

Le Dr Denis Gingras a produit la protéine de fusion GST-GDI utilisée au cours de mes travaux et a contribué à l'interprétation des résultats par des discussions amicales.

Le Dr Dominique Boivin et moi avons conjointement écrit l'article de revue sur les petites protéines G. Dominique, alors qu'il était lui-même étudiant au doctorat, m'a initiée à la recherche à mon arrivée au laboratoire.

Sylvie Lamy est une étudiante, maintenant inscrite au doctorat, qui a travaillé quelques temps sous ma supervision lors de son arrivée au laboratoire. À ce titre, elle a participé à la réalisation de quelques-unes des expériences décrites dans deux de mes articles.

