



HAL
open science

Étude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes et non érythroïdes : site de tétramérisation et domaine SH3

Gaël Nicolas

► **To cite this version:**

Gaël Nicolas. Étude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes et non érythroïdes : site de tétramérisation et domaine SH3. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 1999. Français. NNT : . tel-00284819

HAL Id: tel-00284819

<https://theses.hal.science/tel-00284819>

Submitted on 3 Jun 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS 7 - DENIS DIDEROT
UFR

Année : 1999

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS 7

Discipline : Biologie des cellules sanguines

présentée et soutenue publiquement

le 9 décembre 1999

par

Gaël NICOLAS

Titre :

**Étude fonctionnelle et structurale de certains domaines
des spectrines érythroïdes et non érythroïdes :
site de tétramérisation et domaine SH3**

Directeur de Thèse :

Dr Marie-Christine LECOMTE

JURY

Pr Bernard GRANDCHAMP, *Président*

Dr Michèle MAURICE, *Rapporteur*

Dr Yves COLIN, *Rapporteur*

Dr Nicolette FARMAN, *Examineur*

Dr Jacques CAMONIS, *Examineur*

Dr Marie-Christine LECOMTE, *Examineur*

Remerciements

Ce qui est enfin devenu une thèse n'aurait jamais été réalisé sans l'intervention d'un grand nombre de personnes qui, chacune à un moment plus ou moins important de sa conception, de sa réalisation puis de sa rédaction ont conseillé des expériences, suggéré des améliorations, prodigué un mot de soutien, une critique ou un encouragement qui ont permis son aboutissement.

Tout d'abord, je tiens à remercier spécialement les membres du jury qui me font l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

Je remercie vivement le Professeur Bernard Granchamp d'avoir accepté de présider ce jury. Je lui suis également gré de m'avoir accueilli au sein de l'unité 409 où, au cours de ces années, j'ai pu jouir d'un cadre scientifique riche et exceptionnel tant sur le plan des compétences de chacun que des moyens techniques mis à ma disposition.

Un grand merci aux Docteurs Michèle Maurice et Yves Colin pour avoir accepté la tâche exigeante de rapporteur.

Mes remerciements s'adressent également aux Docteurs Nicolette Farman et Jacques Camonis pour avoir accepté d'examiner et de discuter ce travail. Un remerciement spécial à Nicolette pour m'avoir toujours ouvert les portes de son unité.

Je suis très reconnaissant envers le Docteur Marie-Christine Lecomte pour tout le temps qu'elle m'a consacré durant ces années jusqu'à la relecture attentive et critique de ce manuscrit. Je la remercie pour son soutien toujours constant et pour sa confiance dans mes initiatives. Grâce à ses qualités scientifiques, elle m'a initié avec bonheur à la pratique de la recherche.

Je ne remercierai jamais assez Colette Galand qui, par son aide et ses conseils techniques, a très largement contribué à ce travail. Au delà de ses compétences, je voudrais également la remercier pour ses qualités humaines que j'ai toujours appréciées.

Je remercie le Docteur Marcel Blot-Chabaud de m'avoir enseigné la culture cellulaire au sein de son équipe.

Mes remerciements vont également au Docteur Didier Dhermy pour ses commentaires avisés quant à la lecture de cette thèse.

Je voudrais remercier les étudiants de l'unité que j'ai côtoyés : Laurence Malbert-Colas, Béatrice Milon, Crystophe Ferreira. Un merci particulier à Catherine Fournier : je n'oublierai pas qu'elle a apporté le système double-hybride au laboratoire et qu'elle a " essuyé les premiers plâtres " de la technique !

Je remercie Nadine Lemaire, Thérèse Richard et Yvette Fouillard pour l'efficacité avec laquelle elles ont toujours répondu à toutes mes demandes. Elles représentent une aide indispensable dans ce laboratoire !

Merci à tous les membres de l'unité pour ces inoubliables déjeuners qui m'ont apporté chaque jour ma dose de bonne humeur et de réconfort. Un temps fort restera sans aucun doute, pour moi, l'élection du " Grand Glouglouteur " !

Je remercie la Société Française d'Hématologie qui a financé une partie de ce travail.

Mille mercis à mes parents, ma sœur et Sandrine pour leur soutien et leurs encouragements précieux dans les moments de doute. Un merci spécial à mon père pour son aide dans la mise en page de ce document mais également pour ses compétences informatiques dont j'ai toujours bénéficiées.

Je voudrais avoir un dernier mot pour mon grand-père qui aurait été heureux de voir ce travail achevé.

Table des Matières

INTRODUCTION	11
LA SPECTRINE, COMPOSANT UNIVERSEL DES SQUELETTES MEMBRANAIRES	11
1. DESCRIPTION GÉNÉRALE	13
1.1. Une position clé au sein du squelette érythrocytaire	13
1.2. Une famille multigénique	13
1.2.1. Les gènes α l et β l ou gènes « érythroïdes »	15
1.2.2. Les gènes non-érythroïdes	15
1.2.3. Les spectrines dans les autres organismes	16
1.3. Localisation cellulaire	16
2. ORGANISATION STRUCTURALE DE LA SPECTRINE ET DE LA FODRINE	18
2.1. Architecture de base	18
2.2. Domaines	20
2.3. Domaines communs	22
2.3.1. Interactions spectrine-spectrine	22
Le site de nucléation : formation du dimère	22
Le site d'auto-association : formation du tétramère	22
2.3.2. Interactions de la spectrine et son intégration dans la membrane	25
Le domaine de liaison à l'actine	25
Le domaine de liaison à l'ankyrine	25
Le domaine de liaison à la protéine 4.1	25
Les domaines « <i>EF-hands</i> »	25
Les domaines d'association avec la membrane, MAD1 et MAD2	26
Le domaine SH3	26
2.4. Domaines et sites particuliers	27
2.4.1. Domaines spécifiques à la fodrine	27
Le domaine de liaison de la calmoduline	27
L'isoforme α II Σ 1	27
2.4.2. Autres sites	29

Le site de coupure par les calpaïnes	29
Le site de coupure par la caspase 3	29
La phosphorylation.....	30
La spectrine	30
La fodrine.....	30
3. FONCTIONS	31
3.1. Fonctions de la spectrine	31
3.1.1. Stabilité et propriétés dynamiques du squelette érythrocytaire.....	31
3.1.2. Invalidations des gènes de la spectrine.....	32
3.2. Fonctions de la fodrine.....	33
3.2.1. Remodelage du squelette membranaire et clivage de la fodrine	33
3.2.2. Polarité cellulaire	34
3.2.3. Adhésion cellulaire.....	34
3.2.4. Établissement de la polarité cellulaire	34
3.2.5. Maintien de la polarité cellulaire	35
3.2.6. Trafic intracellulaire des protéines.....	36
Appareil de Golgi	36
Régulation de l'exocytose	36
3.2.7. La fodrine dans les tumeurs	36
4. AXES DE RECHERCHE	38
4.1. Étude fonctionnelle du site de tétramérisation	38
Présentation du modèle.....	38
Démarche	39
4.2. Étude fonctionnelle du domaine SH3 de la fodrine.....	39
Présentation du modèle.....	39
Démarche	40

MATÉRIELS ET MÉTHODES 41

1. MÉTHODES GÉNÉRALES	41
1.1. Transcription inverse.....	41
1.2. PCR.....	41
1.3. PCR semi-quantitative	43
1.4. PCR sur colonie bactérienne	44
1.5. Digestion par les enzymes de restriction	44
1.6. Déphosphorylation	44
1.7. Ligation.....	44
1.8. Purification des ADN	44
1.9. Transformation chimique de bactéries.....	45
1.10. Séquences	45
1.11. Électrophorèse de protéines sur gel d'acrylamide	46

2. EXPRESSION DE PEPTIDES RECOMBINANTS DANS <i>E. COLI</i>	47
2.1. Constructions	47
2.1.1. Vecteurs	47
2.1.2. Définition des peptides SH3 utilisés	47
2.1.3. Amorces de PCR	48
2.1.4. Matrice de PCR	48
2.1.5. Constructions supplémentaires	48
2.2. Expression des protéines de fusion dans <i>E. coli</i>	50
2.3. Purification des peptides par chromatographie d'affinité	50
2.3.1. Chromatographie d'affinité sur colonnes de Sépharose CL-4B couplée à du glutathion ..	50
2.3.2. Chromatographie d'affinité sur des colonnes de Ni-NTA	51
2.3.3. Chromatographie d'échange d'anions	51
2.4. Interaction <i>in vitro</i> de peptides recombinants	51
2.4.1. rENaC et le domaine SH3 de la fodrine	51
2.4.2. LMPTPA et le domaine SH3 de la fodrine	52
2.4.3. Transcription et traduction <i>in vitro</i>	52
2.5. Étude de la digestion par les calpaïnes μ et m	53
3. TRANSFERT DES PROTÉINES SUR MEMBRANE ET RÉVÉLATION IMMUNOLOGIQUE	54
3.1. Transfert sur membrane	54
3.2. Révélation immunologique	54
3.3. Sérum et anticorps	54
3.4. Purification des anticorps anti-SH3 fodrine	55
4. OBTENTION D'UNE LIGNÉE STABLE EXPRIMANT LE DOMAINE SH3 DE LA FODRINE	56
4.1. Lignées cellulaires	56
4.2. Culture des cellules	56
4.3. Réalisation de la construction pour la transfection	56
4.4. Transfection transitoire des cellules COS-7	57
4.5. Transfection stable des cellules RCCD ₁	57
4.6. Congélation des cellules	57
4.7. Mesure de la résistance transépithéliale (R_T)	57
4.8. Immunoprécipitation SH3/ α rENaC	58
4.9. Immunolocalisation du peptide SH3- α 9-FLAG	58
5. LE SYSTÈME DU DOUBLE-HYBRIDE	60
5.1. Établissement des différentes constructions	60
5.1.1. Les appâts	60
5.1.2. Les ligands	60
5.1.3. Amplification des ADNc par PCR	62
5.1.4. Matrice pour la PCR	62
5.2. Culture et transformation des levures	62

5.2.1. Souches de levure.....	62
5.2.2. Milieu de culture.....	63
5.2.3. Transformation des levures.....	63
5.2.4. Préparation d'extraits protéiques de levure	64
5.3. Test d'interaction protéique par conjugaison	64
5.4. Tests β -galactosidase	66
5.4.1. Test β -galactosidase sur filtre	66
5.4.2. Test β -galactosidase sur boîte de culture	66
5.4.3. Test β -galactosidase liquide.....	67
5.5. Criblage d'une banque d'expression d'ADNc de rein de rat	67
5.5.1. Banque	67
5.5.2. Réalisation du criblage	68
5.6. Analyse des clones Leu ⁺ Trp ⁺ His ⁺ LacZ ⁺	68
5.6.1. Purification des plasmides de levure.....	68
5.6.2. Amplification des ADNc par PCR et digestion par <i>Mbol</i> et <i>AluI</i>	69
5.6.3. Séquençage des plasmides	69
5.6.4. Étude de la fréquence des clones par hybridation.....	70
Préparation des membranes	70
Marquage des sondes	70
Hybridation sur membrane	71
5.7. Vérification de la spécificité des interactions par conjugaison.....	71
5.7.1. Séparation du plasmide « appât » (pLex10:SH3Fod) des plasmides « ligand » (pGAD3S2X:ligand)	71
5.7.2. Transformation des bactéries par électroporation.....	71
5.7.3. Mutagenèse dirigée du domaine SH3 de la fodrine	72

RÉSULTATS

74

1. ÉTUDE FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DU SITE DE TÉTRAMÉRISATION DE LA SPECTRINE :	
EFFET DE MUTATIONS ASSOCIÉES À DES ELLIPTOCYTOSES HÉRÉDITAIRES	74
1.1. Reconstitution et validation du modèle de tétramérisation	74
1.1.1. Définition des peptides α et β impliqués dans le site de tétramérisation.....	74
1.1.2. Approfondissement des données biochimiques de l'interaction.....	75
1.1.3. Conséquences structurales de la tétramérisation	77
1.2. Confirmation du lien entre mutations EH et tétramérisation	77
1.2.1. Retentissement des mutations EH sur la tétramérisation	77
1.2.2. Conséquences structurales des mutations HE	78
2. ÉTUDE FONCTIONNELLE DU DOMAINE SH3 DE LA CHAÎNE α DE LA FODRINE	79
2.1. Identification et caractérisation de deux isoformes de la chaîne α de la fodrine	79
2.1.1. Caractéristiques des deux isoformes	79
2.1.2. Mécanisme de production des deux isoformes.....	79

2.1.3. Distribution tissulaire ou cellulaire des deux isoformes	81
2.1.4. Étude du clivage des peptides SH3 par les calpaïnes	81
2.1.5. Localisation intracellulaire.....	83
2.2. Remise en cause de l'interaction entre ENaC et le domaine SH3 de la fodrine.....	85
2.2.1. Fodrine et ENaC	85
2.2.2. Étude de l'interaction entre ENaC et le domaine SH3 de la fodrine.....	87
Lignée cellulaire	87
Surexpression du domaine SH3 de la fodrine	87
Transfection stable dans les cellules RCCD ₁	90
Phénotype du clone L5 surexprimant le peptide SH3- α 9-FLAG	90
Immunoprécipitation du peptide AB-SH3-C'-FLAG.....	91
Purification du peptide GST- α ENaC(Cterm).....	94
Interaction <i>in vitro</i>	94
2.3. Recherche d'autres partenaires du domaine SH3	96
2.3.1. Description du système double-hybride.....	96
Choix du système	98
Analyse du bruit de fond et de l'expression de la protéine hybride LexA-SH3 _{fod}	98
Crible d'une banque d'expression d'ADNc de rein de rat par le système du double-hybride	98
2.3.2. Analyse des clones Leu ⁺ Trp ⁺ His ⁺ LacZ ⁺	100
Amplification par PCR des ADNc et digestion par <i>Mbol</i> et <i>AluI</i>	100
Identification des clones par séquençage.....	103
Étude de la fréquence des clones par hybridation.....	103
Commentaires.....	106
Résumé.....	107
2.3.3. Nature des interactions.....	107
Élimination des clones faux-positifs et test de spécificité de l'interaction	107
Définition des groupes de spécificité	109
2.3.4. Les clones non spécifiques du domaine SH3 de la fodrine.....	115
Groupe 4	115
Groupe 5 (les clones faux-positifs)	116
2.3.5. Les clones spécifiques du domaine SH3 de la fodrine.....	116
Groupe 1	116
Groupe 2.....	116
Groupe 3.....	117
2.3.6. Affinement des spécificités des groupes 1 et 3	117
Mutation E985A	118
Mutation K1002E	118
Les problèmes de recombinaison homologue	120
2.3.7. Validation des interactions <i>in vitro</i>	123
Transcription/traduction <i>in vitro</i>	123
Groupe 1	123
Groupe 3.....	124
2.3.8. Autres résultats spécifiques de chaque ligand	125

La phosphotyrosyl protéine phosphatase de faible poids moléculaire (LMPTP)	125
Recherche d'une région de la LMPTP-A nécessaire et suffisante pour interagir avec le domaine SH3 de la fodrine	128
Interaction <i>in vitro</i> à l'aide de peptides recombinants	128
e3B1.....	130

DISCUSSION **134**

1. ÉTUDE FONCTIONNELLE DU SITE DE TÉTRAMÉRISATION DE LA SPECTRINE	134
1.1. Confirmation du modèle par des études biochimiques	134
1.2. Réalisation d'un modèle tridimensionnel du site de tétramérisation de la spectrine : compréhension du mécanisme moléculaire des EH.....	136
2. ÉTUDE FONCTIONNELLE DU DOMAINE SH3 DE LA FODRINE	139
2.1. Le domaine SH3 de la fodrine et la sous-unité α du canal à sodium.....	139
2.1.1. Remise en cause de l'interaction.....	139
2.1.2. Quels sont les facteurs pouvant expliquer les discordances entre nos résultats et ceux de Rotin <i>et coll.</i> ?	140
2.1.3. Partenaires intermédiaires pouvant être impliqués dans l'interaction entre le domaine SH3 fodrine et α rENaC.....	141
2.2. Quels sont les autres partenaires du domaine SH3 de la fodrine ?.....	142
2.2.1. Le domaine SH3 fodrine et les protéines tyrosine phosphatases	142
La phosphotyrosyl protéine phosphatase de faible poids moléculaire (LMPTP)	142
La phosphotyrosyl protéine phosphatase PTP-TD14	144
2.2.2. Le domaine SH3 fodrine et la régulation de la polymérisation de l'actine	145
N-WASP	145
RNB6	146
Fr1.....	147
2.2.3. Autres partenaires	147
e3B1.....	147
cbl-b	148
Les ESTs	148
2.3. Avantages du système double-hybride	149
2.4. Inconvénients du système double-hybride.....	149
2.5. Fréquence des ADNc.....	150
2.6. Le domaine SH3 : un appât difficile	151
2.7. Avantages et inconvénients des interactions <i>in vitro</i>	151
2.8. Isoformes de la fodrine	152
3. PERSPECTIVES GÉNÉRALES	153

BIBLIOGRAPHIE	155
INDEX DES ABRÉVIATIONS	171
TABLE DES FIGURES	173
PUBLICATIONS RELATIVES À CE TRAVAIL	175
ARTICLE 1	176
ARTICLE 2	185
ARTICLE 3	194
RÉSUMÉ	199

Introduction

La spectrine, composant universel des squelettes membranaires

Au cours de leur évolution, les organismes multicellulaires ont développé des membranes plasmiques complexes capables de séparer les différents compartiments cellulaires, leur conférant ainsi leurs fonctions spécifiques. L'organisation particulière de ces membranes est soutenue par un complexe multiprotéique appelé « squelette membranaire » localisé sous la bicouche lipidique.

Il a été initialement individualisé dans le globule rouge comme le résidu protéique insoluble obtenu après traitement des membranes plasmiques par un détergent non ionique (Yu *et coll.*, 1973). Il apparaît en microscopie électronique, comme un maillage, composé essentiellement de formes hexagonales : de longs filaments protéiques (200 nm) sont connectés par des amas protéiques formant les nœuds de ce réseau (Figure 1, page 12). Le squelette érythrocytaire est une structure à la fois robuste et déformable, largement impliquée dans la forme particulière du globule rouge ainsi que dans ses propriétés dynamiques telles que déformabilité et résistance au stress de la circulation sanguine.

La spectrine, isolée pour la première fois en 1968 (Marchesi et Steers, 1968) est un composant majeur des squelettes membranaires. Il s'avère aujourd'hui que cette protéine est une composante cellulaire ubiquiste : chez les vertébrés (les mammifères, les oiseaux, le xénope) comme les invertébrés (la drosophile, l'oursin, le nématode *Caenorhabditis elegans*, les amibes primitives) ainsi que dans les plantes (Marchesi et Steers, 1968 ; Pollard, 1984 ; Wilson *et coll.*, 1994 ; Lazarides et Nelson, 1985 ; Byers *et coll.*, 1992 ; Fishkind *et coll.*, 1990 ; Michaud *et coll.*, 1991).

Érythroïdes et non érythroïdes (dans ce cas, elles prennent le nom de fodrine), les spectrines sont des protéines liant l'actine et constituent avec la dystrophine et l' α actinine, la superfamille Spectrine. La principale caractéristique de ces protéines est leur structure linéaire formée d'une succession d'unités répétitives adoptant une conformation α -trihélicoïdale.

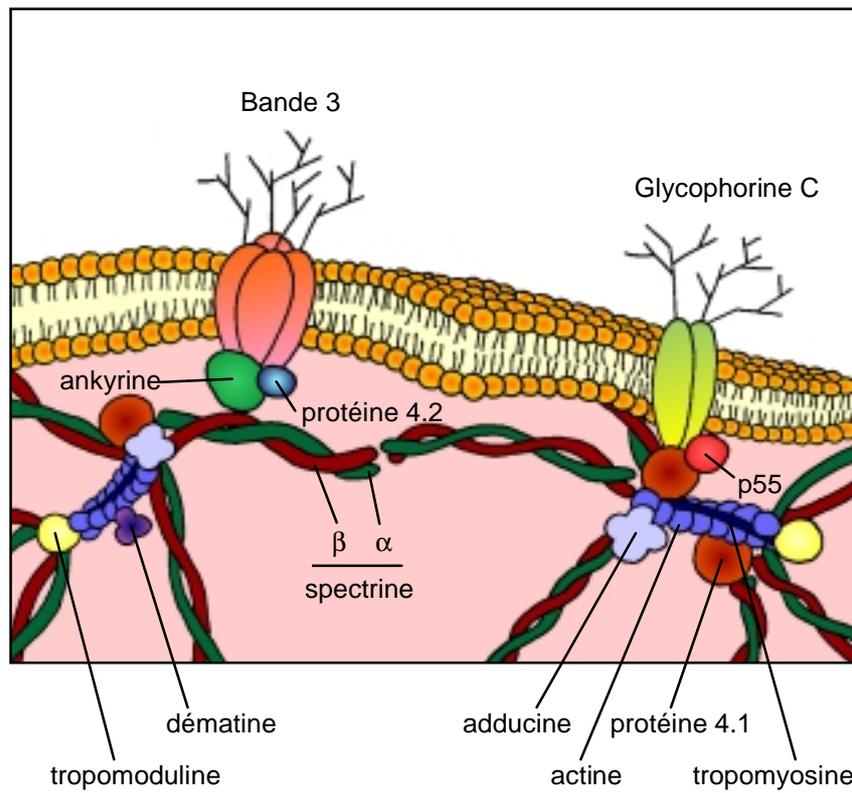


Figure 1

Représentation schématique de la membrane érythrocytaire et du squelette membranaire

1. Description générale

1.1. Une position clé au sein du squelette érythrocytaire

Le squelette membranaire, et la place qu'occupe la spectrine au sein de celui-ci, a été particulièrement étudié dans le globule rouge (squelette érythrocytaire) car il représentait un modèle simple et accessible.

Au nombre de 200 000 copies par globule rouge, la spectrine représente environ 25 % de la masse totale des protéines membranaires. Elle est composée de deux longues chaînes flexibles α et β , associées côte à côte de façon antiparallèle, pour former des hétérodimères $\alpha\beta$. Chacun d'eux est ainsi une molécule orientée avec une « tête » incluant les extrémités NH_2 et COOH des chaînes α et β respectivement et une « queue » incluant les extrémités COOH et NH_2 des chaînes α et β respectivement. Deux hétérodimères s'associent tête-à-tête, pour former des tétramères $(\alpha\beta)_2$ qui sont les filaments du maillage (Figure 1, page 12) (Shotton *et coll.*, 1979 ; Ungewickell et Gratzer, 1978 ; Liu et Palek, 1980).

L'association tête-à-tête des dimères laisse disponible chaque extrémité caudale pour des interactions avec les autres protéines du squelette membranaire qui forment les nœuds du maillage ou complexes de jonction : l'actine et d'autres protéines comme la protéine 4.1 et la dématine (protéine 4.9), l'adducine, la tropomyosine et la tropomoduline qui modulent l'interaction entre la spectrine et l'actine.

Le squelette membranaire est localisé sous la bicouche lipidique par l'intermédiaire de différentes interactions de la chaîne β de la spectrine avec des protéines transmembranaires, telles que l'échangeur anionique AE1 (ou bande 3), par l'intermédiaire d'une protéine d'ancrage appelée ankyrine, ou encore la protéine 4.1, elle-même liée à la glycophorine C sous la forme d'un complexe incluant la protéine p55 (Figure 1, page 12).

Ainsi, du fait de sa structure flexible et de ses nombreuses interactions avec d'autres protéines, la spectrine présente une position clé au sein du squelette érythrocytaire.

1.2. Une famille multigénique

Chez les mammifères, la spectrine appartient à une famille multigénique dont on connaît aujourd'hui deux gènes codant pour les chaînes α et trois gènes codant pour les chaînes β . Un quatrième gène pour la

β -spectrine est suspecté. Pour un même gène, il peut exister plusieurs isoformes, générées par épissage alternatif d'un ou plusieurs exons. En 1993, Winkelmann et Forget proposaient d'adopter la classification suivante pour les gènes de mammifères : les spectrines sont appelées selon leur gène α ou β , suivi d'un chiffre romain se référant à leur ordre chronologique de caractérisation. Les isoformes sont identifiées par le chiffre arabe après le symbole Σ , également dans l'ordre chronologique de leur description. Lorsqu'une isoforme n'est pas encore caractérisée sur le plan moléculaire, le symbole * est utilisé à la place du chiffre arabe. Le tableau ci-dessous résume l'ensemble des isoformes des spectrines identifiées chez les mammifères.

Nom	Gène	Tissus	Chromosome	Taille	Références
$\alpha I \Sigma 1$	<i>SPTA</i>	globule rouge	1	2 417 aa	Sahr <i>et coll.</i> , 1990
$\alpha I \Sigma^*$	<i>SPTA</i>	cerveau	1	?	Clark <i>et coll.</i> , 1994
$\alpha II \Sigma 1$	<i>SPTNA1</i>	cellules non érythroïdes	9	2 471 aa	Moon et McMahon, 1990
$\alpha II \Sigma 2$	<i>SPTNA1</i>	cellules non érythroïdes	9		Moon et McMahon, 1990
$\alpha II \Sigma 3$	<i>SPTNA1</i>	cellules non érythroïdes	9		Moon et McMahon, 1990
$\alpha II \Sigma 4$	<i>SPTNA1</i>	cellules non érythroïdes	9		Cianci et Morrow, 1995
$\beta I \Sigma 1$	<i>SPTB</i>	globule rouge	14	2 137 aa	Winkelmann <i>et coll.</i> , 1990a
$\beta I \Sigma 2$	<i>SPTB</i>	muscle, cœur, cerveau	14		Prchal <i>et coll.</i> , 1990 Winkelmann <i>et coll.</i> , 1990b
$\beta I \Sigma^*$	<i>SPTB</i>	appareil de Golgi	14	?	Beck <i>et coll.</i> , 1994
$\beta II \Sigma 1$	<i>SPTNB1</i>	cellules non érythroïdes	2	2 364 aa	Hu <i>et coll.</i> , 1992
$\beta II \Sigma 2$	<i>SPTNB1</i>		2		
$\beta III \Sigma 1$	<i>SPTBN2</i>	appareil de Golgi	11	2 390 aa	Stankewich <i>et coll.</i> , 1998

D'après Winkelmann *et coll.* (1993). Les isoformes non caractérisées sur le plan moléculaire sont indiquées par un astérisque.

Tableau 1

Nomenclature des différentes isoformes des chaînes α et β spectrine identifiées chez les mammifères

Chez l'homme, le gène αI localisé sur le chromosome 1, code pour la chaîne α de la spectrine érythroïde. Il possède 52 exons et une longueur de 80 kpb (Sahr *et coll.*, 1990 ; Kotula *et coll.*, 1991). Le gène βI , localisé sur le chromosome 14 a une longueur de 100 kpb, est constitué de 36 exons (Winkelmann *et coll.*, 1990a ; Amin *et coll.*, 1993). Les gènes αII et βII codant pour les spectrines non-érythroïdes (fodrines) sont situés sur les chromosomes 9 et 2 respectivement (Moon et McMahon, 1990 ; McMahon *et coll.*, 1987 ; Ma *et coll.*, 1993 ; Chang *et coll.*, 1993). Très récemment, il a été identifié un nouveau gène βIII localisé sur le chromosome 11 et codant pour une spectrine spécifiquement localisée dans

l'appareil de Golgi (Stankewich *et coll.*, 1998). Enfin, il existerait un quatrième gène β IV qui reste à caractériser. L'organisation exon-intron des gènes α II, β II, β III n'est pas encore connue.

1.2.1. Les gènes α I et β I ou gènes « érythroïdes »

Le gène α I code pour une isoforme α I Σ 1 de 2 429 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 281 kDa ; l'isoforme β I Σ 1 est un polypeptide de 2 137 acides aminés, avec une masse moléculaire calculée de 246,3 kDa. Ces isoformes α I Σ 1 et β I Σ 1 qui constituent la spectrine du globule rouge, sont parfaitement caractérisées.

De nombreux polymorphismes alléliques ont été décrits sur les gènes α I et β I. Quelques-uns sont particulièrement remarquables car ils ont une influence directe sur le recrutement de la spectrine à la membrane. Par exemple, l'allèle α^{LELY} code pour une chaîne α qui ne contient pas l'exon 46 et qui a moins d'affinité pour la chaîne β (Alloisio *et coll.*, 1991).

On a longtemps cru que les gènes α I et β I étaient exclusivement exprimés dans le globule rouge, d'où leur appellation de gènes « érythroïdes », mais des produits de ces gènes ont été retrouvés dans des cellules non-érythroïdes. Ainsi, l'isoforme β I Σ 2 possède dans sa partie C-terminale une séquence unique de 21,4 kDa contenant un domaine PH (*Pleckstrin Homology*). Elle est présente dans le cerveau et les muscles cardiaque et squelettique (Prchal *et coll.*, 1990 ; Winkelmann *et coll.*, 1990b).

1.2.2. Les gènes non-érythroïdes

Par contre, les autres gènes ne sont exprimés que dans les cellules non-érythroïdes. Le gène α II code pour plusieurs isoformes de la chaîne α de la fodrine. L'isoforme α II Σ 1 est un polypeptide de 2 472 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 284,3 kDa.

Le gène β II, comme le gène β I, code pour deux isoformes de la chaîne β de la fodrine qui se distinguent par la présence (isoforme β II Σ 1) ou l'absence (isoforme β II Σ 2) d'un domaine PH dans leur partie C-terminale. Les isoformes β II Σ 1 et β II Σ 2 sont des polypeptides de 2 364 et 2 168 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 274,6 kDa et 253,1 kDa, respectivement. Un troisième gène β , β III, est également bien caractérisé : il code pour une chaîne β de 2 391 acides aminés (271,3 kDa), localisée exclusivement dans l'appareil de Golgi.

Ainsi, dans les cellules non érythroïdes, plusieurs gènes peuvent être exprimés produisant chacun plusieurs isoformes, chacune d'entre elles avec une localisation spécifique.

1.2.3. Les spectrines dans les autres organismes

Pour les autres espèces, les gènes sont classés selon leurs homologues chez les mammifères ou avec des noms différents si leur homologue humain n'est pas clairement défini.

- Les oiseaux et les amphibiens

À l'inverse de ce que l'on observe chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens possèdent des globules rouges nucléés. Un seul gène α , homologue du gène α II, a été identifié chez ces organismes. Le produit de ce gène unique s'associe soit aux produits du gène β I dans les globules rouges, soit aux produits du gène β II dans les autres cellules.

- La drosophile

Deux chaînes β ont été identifiées chez la drosophile : l'une de 265 kDa correspond au produit du gène β II humain (55,8 % d'identité sur 2 330 acides aminés ; réalisée avec l'alignement de séquences LALIGN [<http://vega.crbm.cnrs-mop.fr/bin/lalign-guess.cgi>]) (Byers *et coll.*, 1992) ; l'autre, de 430 kDa, appelée β H (β heavy), est plus similaire à la dystrophine des vertébrés. La chaîne α présente 64 % d'identité sur 2 472 acides aminés avec le produit du gène humain α II.

- *Caenorhabditis elegans*

Deux gènes β ont été identifiés chez ce nématode : le gène *bgs-1* est similaire au gène β II et le gène *sma-1* est similaire à la dystrophine. Il a également été mis en évidence l'existence d'un gène, *imo-1*, similaire au gène α II (Wilson *et coll.*, 1994 ; McKeown *et coll.*, 1998).

Actuellement, de nombreux ADNc complets des chaînes α et β de la spectrine et (ou) de la fodrine sont connus (souris, rat, poulet, drosophile et nématode). La comparaison des séquences primaires de toutes ces espèces montre que les gènes non érythroïdes de deux espèces différentes sont plus similaires que les gènes spectrine et fodrine d'une même espèce. Par exemple, les chaînes β I Σ 1 et β II Σ 1 de l'homme possèdent 60,8 % d'identité alors que les chaînes β II Σ 1 de l'homme et du rat possèdent 95 % d'identité.

1.3. Localisation cellulaire

Dans les cellules eucaryotes nucléées, la complexité des spectrines est considérablement accrue en raison du plus grand nombre de gènes α et β exprimés et de la multitude d'isoformes que chacun d'eux peut générer. Le squelette membranaire de ces cellules est localisé sous des domaines membranaires structurellement et fonctionnellement distincts comme les membranes apicales et basolatérales des

cellules épithéliales par exemple. Nous reparlerons dans un chapitre ultérieur de la localisation de la fodrine dans les cellules épithéliales.

Dans le cerveau, différentes isoformes de spectrine sont localisées dans des régions cellulaires distinctes. Par exemple une isoforme du gène βI , sans doute $\beta I\Sigma 2$, est localisée dans les neurones au niveau du corps cellulaire, dans les dendrites mais pas dans les axones à l'inverse d'une isoforme du gène βII localisée principalement dans les axones (Riederer *et coll.*, 1986 et 1987 ; Malchiodi-Albedi *et coll.*, 1993).

Dans le muscle squelettique, une isoforme $\beta I\Sigma^*$ est localisée avec le récepteur de l'acétylcholine (Bloch et Morrow, 1989). La chaîne β de la fodrine (βII) est localisée dans les lignes Z à l'intérieur des bandes I (Vybiral *et coll.*, 1992).

Plusieurs études ont montré que les lymphocytes possèdent des agrégats cytoplasmiques de fodrine qui vont être redistribués dans la cellule selon différents stimuli (Gregorio *et coll.*, 1992, 1993 et 1994). Dans les cellules épithéliales en culture avec des contacts cellulaires faibles, la fodrine possède une distribution cytoplasmique (Nelson et Veshnock, 1986 et 1987 ; Morrow *et coll.*, 1989). La formation des contacts entre les cellules déclenche une série de processus qui aboutiront à la mise en place de la polarité cellulaire et à la translocation de la fodrine du cytoplasme vers la membrane plasmique.

Cette liste n'est bien entendu pas exhaustive et démontre l'extrême complexité d'expression des gènes spectrine et fodrine dans les cellules non érythroïdes ainsi que leur localisation spécifique.

2. Organisation structurale de la spectrine et de la fodrine

2.1. Architecture de base

Chez l'homme, les chaînes α de la spectrine (chaîne $\alpha I\Sigma 1$) et de la fodrine (chaîne $\alpha II\Sigma 1$) présentent 55 % d'identité au niveau de leur séquence protéique sur 2 476 acides aminés.

La chaîne $\beta I\Sigma 1$ présente 60,8 % et 53,8 % d'identité au niveau de sa séquence protéique avec les chaînes $\beta II\Sigma 1$ (sur un alignement de 2 116 acides aminés) et $\beta III\Sigma 1$ (sur un alignement de 2 138 acides aminés), respectivement. La chaîne $\beta II\Sigma 1$ présente 62,2 % d'identité de séquence protéique avec la chaîne $\beta III\Sigma 1$ (sur un alignement de 2 402 acides aminés).

Spectrine et fodrine sont constituées d'une succession de segments de 106 résidus plus ou moins similaires appelées unités répétitives (Speicher et Marchesi, 1984 ; Sahr *et coll.*, 1990 ; Winkelmann *et coll.*, 1990a ; Moon et McMahon, 1990 ; Ma *et coll.*, 1993). Il existe ainsi 22 segments sur la chaîne α dont 20 sont des unités répétitives ($\alpha 1$ à $\alpha 9$ et $\alpha 11$ à $\alpha 20$) et 17 sur la chaîne β ($\beta 1$ à $\beta 17$). Cette organisation particulière est retrouvée chez tous les membres de la superfamille Spectrine : la dystrophine avec 24 unités de 109 résidus et l' α -actinine avec 4 unités de 102 résidus. Chacune des unités répétitives, malgré une faible identité de séquence entre elles (environ 20 %), possède des résidus extrêmement conservés comme la leucine en position 26 et le tryptophane en position 45 (Figure 2, page 19).

L'analyse des séquences protéiques prévoyait que chaque unité répétitive serait composée principalement de trois hélices α appelées A, B et C (Parry *et coll.*, 1992 ; Speicher et Marchesi, 1982 ; Speicher *et coll.*, 1980 ; Xu *et coll.*, 1990). Ces prédictions ont été confirmées par des études de dichroïsme circulaire révélant un pourcentage d'hélices α de 60 à 70 % pour la spectrine (Ralston & Dunbar, 1979 ; Calvert *et coll.*, 1980). Enfin, la structure tridimensionnelle a été établie par diffraction aux rayons X (sur l'unité répétitive 14 de la chaîne α de la fodrine de drosophile) ou par RMN (sur l'unité répétitive 16 de la chaîne α de la fodrine de poulet) (Yan *et coll.*, 1993 ; Pascual *et coll.*, 1997b).

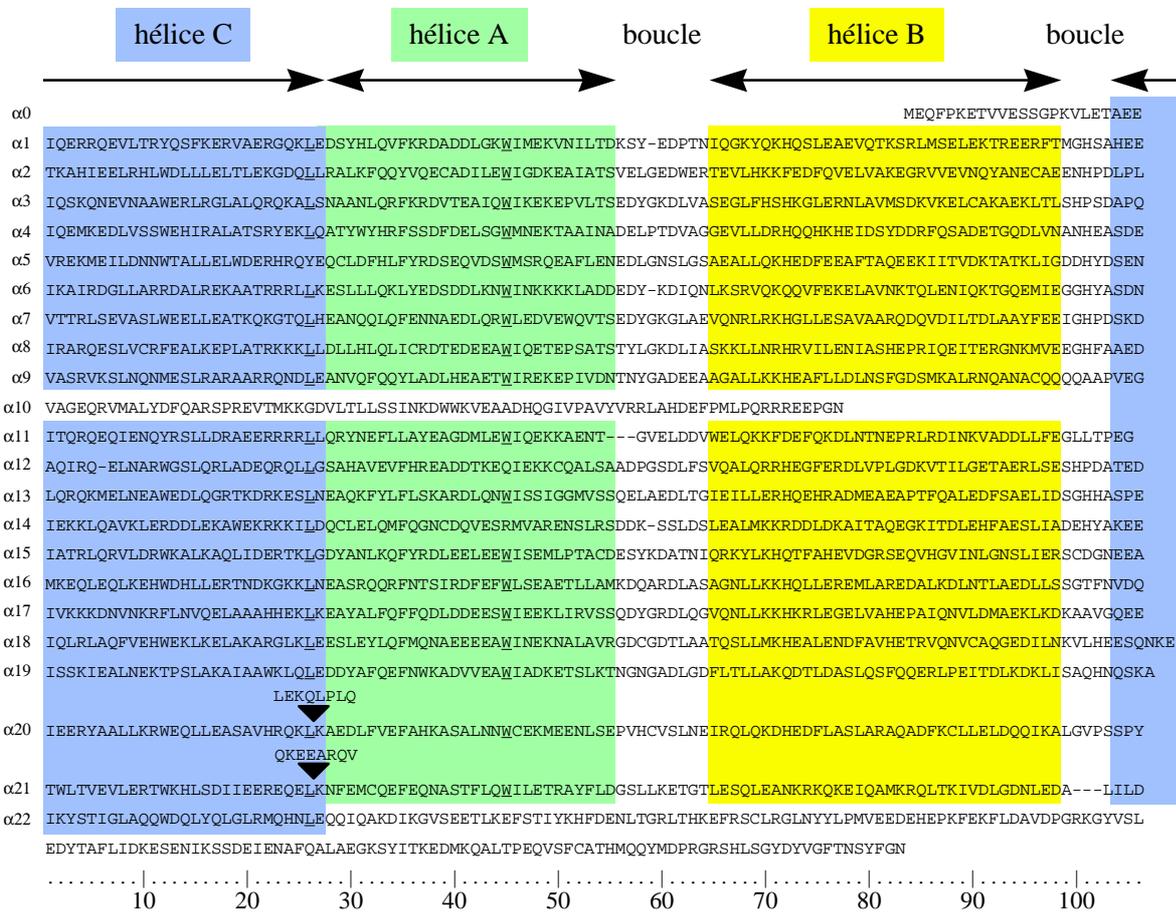


Figure 2

Séquence en acides aminés de la chaîne $\alpha 1$

La séquence complète en acides aminés est alignée en fonction des unités répétitives linéaires ($\alpha 1$ à $\alpha 9$ et $\alpha 11$ à $\alpha 21$). Les résidus leucine en position 26 et tryptophane en position 45 très conservés dans toutes les unités répétitives des membres de la superfamille Spectrine sont soulignés. Le segment $\alpha 10$, non homologue aux autres unités répétitives, constitue le domaine SH3 de la spectrine. Les trois hélices A, B et C qui forment les unités répétitives conformationnelles sont indiquées en vert, jaune et bleu, respectivement. Les flèches noires dans les unités répétitives $\alpha 20$ et $\alpha 21$ indiquent des insertions de 8 acides aminés impliquées dans la formation du dimère de spectrine α/β .

Selon les données, l'unité répétitive est bien composée de trois hélices α (A, B et C) séparées par deux courtes boucles (régions AB et BC). Les hélices A et B sont repliées l'une sur l'autre de façon antiparallèle et l'hélice C vient se loger dans le sillon formé par les deux premières hélices pour former une structure α -trihélicoïdale d'une longueur de 5 nm et d'une largeur de 2 nm ce qui est compatible avec la longueur de la molécule native (Figure 3A, page 21). Les données biophysiques n'ont pas pour le moment apporté de réponse concernant le lien entre deux unités conformationnelles successives. Le modèle actuellement admis propose que les hélices C et A forment en fait une seule hélice C-A permettant de lier les différentes unités conformationnelles les unes aux autres. Chacune d'elle est alors composée de la partie A d'une hélice C-A, de l'hélice B et de la partie C de l'hélice C-A suivante. Cette grande hélice C-A participerait donc à la structure de deux unités conformationnelles successives et constituerait le lien entre celles-ci (Figure 3B, page 21). La structure trihélicoïdale des unités répétitives serait responsable de la grande flexibilité de la spectrine. En effet, l'analyse *in situ* des dimères de spectrine montre qu'ils ont une longueur comprise entre 30 nm et 100 nm (Shotton *et coll.*, 1979 ; Ursitti *et coll.*, 1991).

Ainsi, grâce aux résultats obtenus d'abord par la biochimie, puis par la biophysique, la structure de l'unité répétitive conformationnelle caractéristique de la superfamille Spectrine est aujourd'hui bien définie. La phase de l'unité répétitive conformationnelle est décalée d'une trentaine de résidus par rapport à l'unité répétitive linéaire décrite initialement. Une unité conformationnelle entière débiterait aux résidus leucine 26 de chaque unité répétitive linéaire (Winograd *et coll.*, 1991). Pour être rigoureux, il convient aujourd'hui de parler davantage d'unité répétitive conformationnelle que d'unité répétitive linéaire. Cependant, parce qu'elle a été définie la première, la nomenclature reste basée sur les unités répétitives linéaires.

La comparaison des sous-unités répétitives entre les différents membres de la famille Spectrine a permis de proposer un schéma retraçant l'évolution de la chaîne α de la spectrine qui proviendrait d'une succession de duplications d'un gène ancestral proche de celui codant pour l' α actinine (Pascual *et coll.*, 1997a). Enfin, l'organisation exon-intron des gènes αI et βI ne correspond pas aux bornes des sous-unités répétitives (Kotula *et coll.*, 1991 ; Amin *et coll.*, 1993).

2.2. Domaines

Certaines unités répétitives possèdent de courtes insertions d'acides aminés (de 8 à 37 résidus) leur conférant certaines propriétés fonctionnelles. De plus, chacune des extrémités des deux chaînes ainsi que la partie centrale de la chaîne α présentent des séquences différentes de celles des unités répétitives. Ces régions contiennent des domaines qui, selon les cas, sont communs ou particuliers à la spectrine ou à la fodrine.

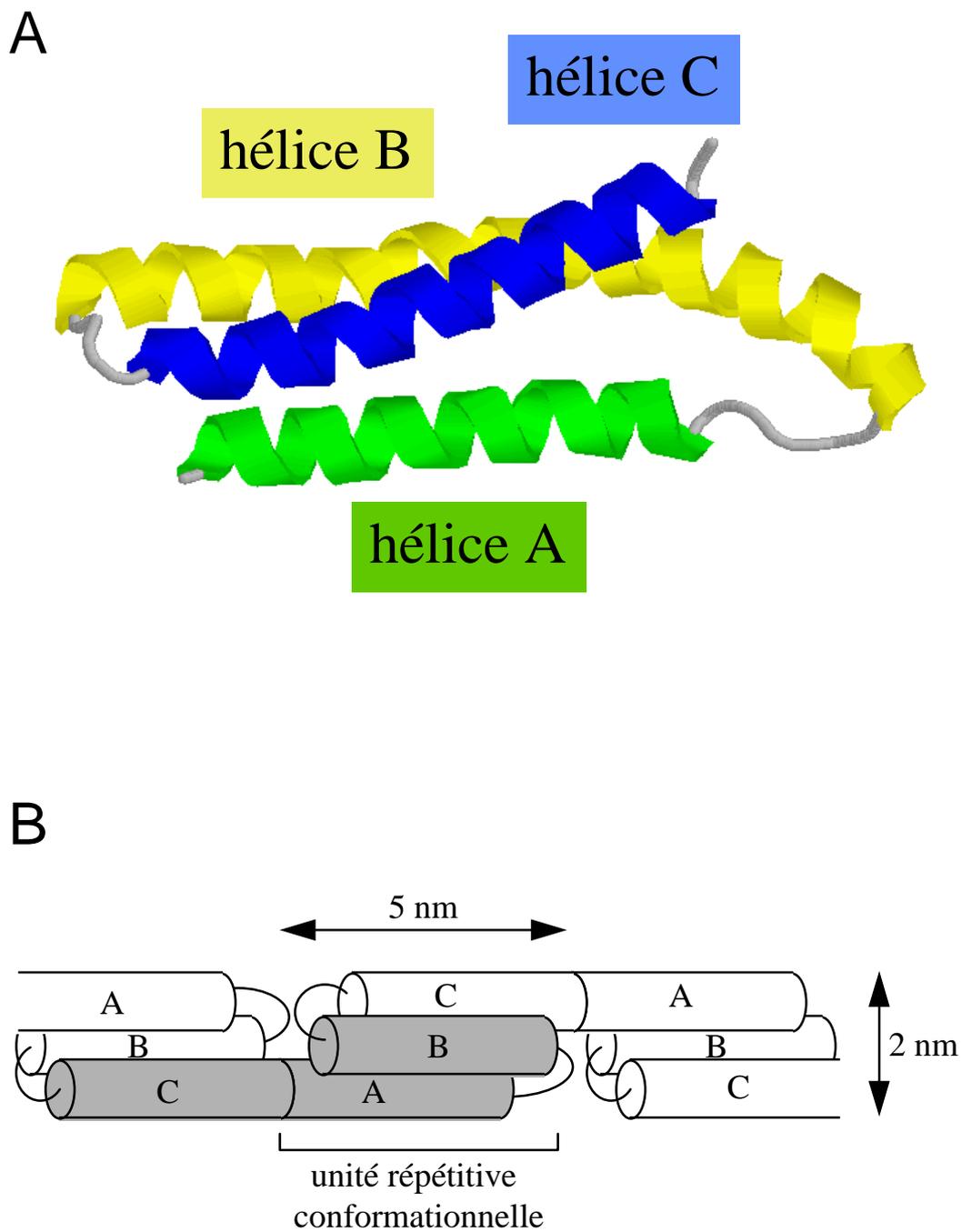


Figure 3

Structure trihélicoïdale des unités répétitives de la spectrine

A - Structure tridimensionnelle de l'unité répétitive $\alpha 16$ de la spectrine de poulet d'après Pascual et coll., 1997b ;

B - Représentation schématique de plusieurs unités conformationnelles successives.

2.3. Domaines communs

Certains des domaines communs sont directement impliqués dans l'assemblage des chaînes α et β pour former les dimères et les tétramères. D'autres participent au rôle structural fondamental de la spectrine au sein du squelette membranaire. C'est le cas des sites de liaison pour l'ankyrine, l'actine, la protéine 4.1, les domaines de liaison du calcium « *EF-hand* » et les domaines d'association à la membrane MAD1 et MAD2 (*membrane association domain*). Pour certains autres comme le domaine SH3, le rôle n'a pas encore été clairement établi. Les chaînes α et β de la spectrine ou de la fodrine sont schématisées sur les figures des pages 23 et 24.

2.3.1. Interactions spectrine-spectrine

Le site de nucléation : formation du dimère

L'assemblage des chaînes α et β de la spectrine en hétérodimère $\alpha\beta$ implique l'extrémité C-terminale de la chaîne α (segments $\alpha18$ à $\alpha21$) et l'extrémité N-terminale de la chaîne β (segments $\beta1$ à $\beta4$). Ces régions minimales définissent ce que l'on appelle le site de nucléation de la spectrine (Speicher *et coll.*, 1992 ; Ursitti *et coll.*, 1996). Quatre de ces unités ($\alpha20$ et $\alpha21$; $\beta1$ et $\beta2$) ont la particularité de posséder une insertion de huit acides aminés dans l'hélice A par rapport à la séquence canonique de 106 résidus (voir la figure de la page 19 pour les unités répétitives $\alpha20$ et $\alpha21$). La perte ou la duplication de ces octamères abolissent l'interaction entre les deux chaînes (Viel et Branton, 1994). Ces insertions pourraient conférer des propriétés conformationnelles particulières permettant la formation de l'hétérodimère $\alpha\beta$. Les études *in vitro* montrent que la présence des unités conformationnelles adjacentes augmente l'affinité entre les deux chaînes α et β (Ursitti *et coll.*, 1996). L'interaction entre les deux chaînes α et β pour former le dimère est initiée au niveau du site de nucléation puis renforcée sur toute la longueur des deux chaînes grâce à une propagation de l'interaction tout le long des deux molécules à l'image d'une fermeture éclair. Le site de nucléation de la spectrine érythroïde est le seul à avoir été étudié. Cependant, les courtes insertions dans les unités répétitives $\alpha20$, $\alpha21$, $\beta1$ et $\beta2$ sont retrouvées sur les chaînes α et β codées par les autres gènes, suggérant un mécanisme conservé.

Le site d'auto-association : formation du tétramère

Dans la membrane du globule rouge, les filaments de spectrine se trouvent sous la forme de tétramères $(\alpha\beta)_2$ formés par l'association tête-à-tête de deux hétérodimères. Cette interaction implique l'extrémité NH_2 de la chaîne α et l'extrémité COOH de la chaîne β . Le K_d de l'interaction est d'environ $1 \mu\text{M}$. Comme pour le site de nucléation, le site de tétramérisation, principalement étudié sur la spectrine érythroïde, serait conservé car les séquences impliquées sont retrouvées sur les chaînes codées par les gènes αII , βII et βIII .

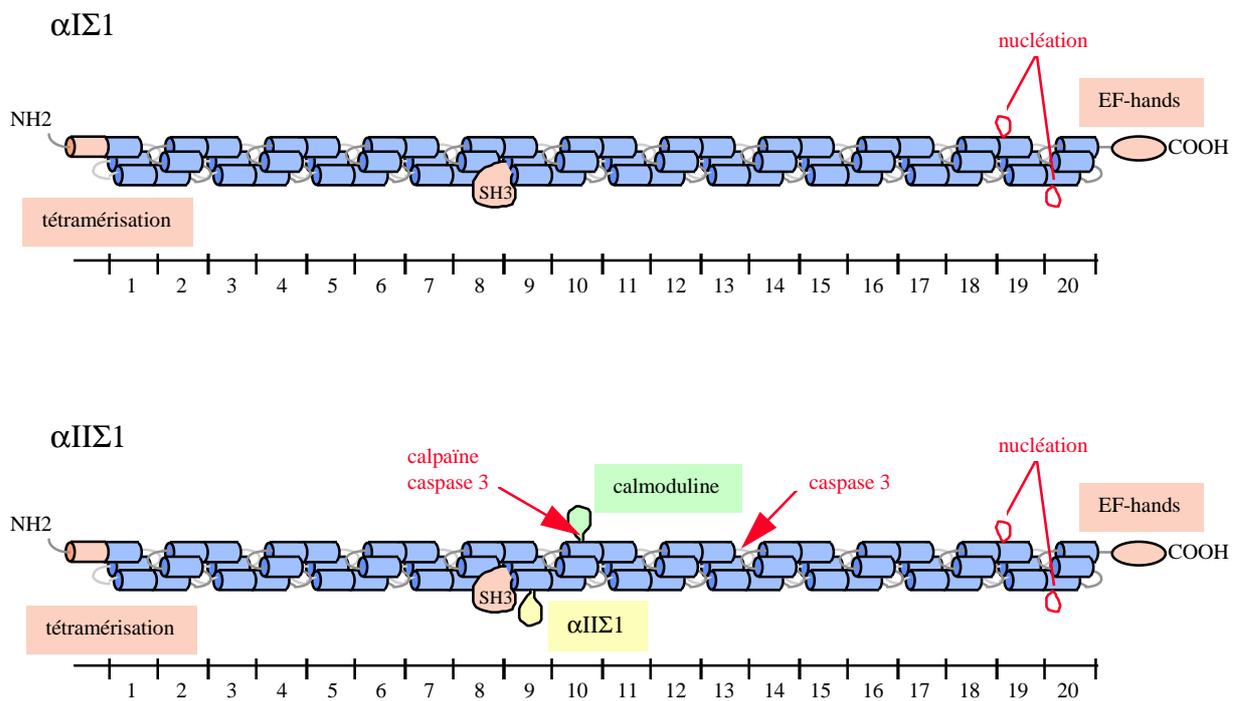


Figure 4

Représentation des différents domaines et sites présents sur les chaînes α

La région $\alpha II\Sigma 1$ caractérise une séquence spécifique de l'isoforme $\alpha II\Sigma 1$, absente dans l'isoforme $\alpha II\Sigma 2$.

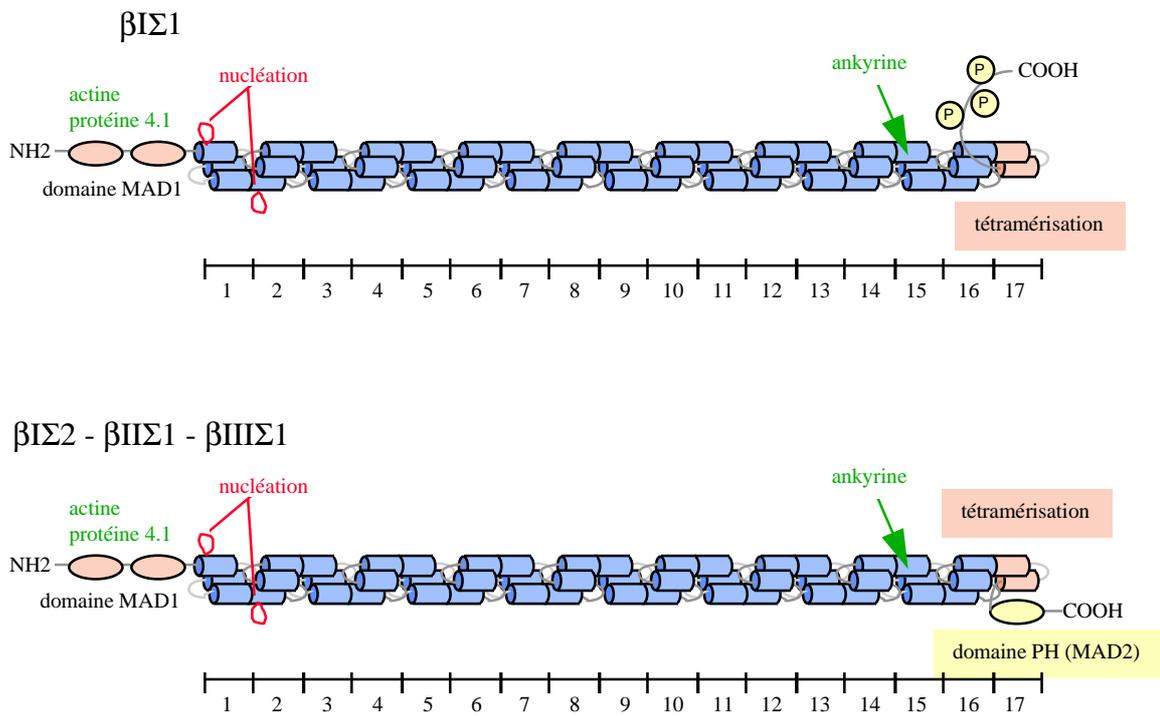


Figure 5

Représentation des différents domaines et sites présents sur les chaînes β

2.3.2. Interactions de la spectrine et son intégration dans la membrane

Le domaine de liaison à l'actine

Dans le squelette érythrocytaire, les filaments d'actine sont constitués de deux polymères s'enroulant l'un autour de l'autre, chacun d'eux étant composé de douze à quatorze molécules d'actine. Les études par microscopie électronique ont démontré que cinq à six molécules de spectrine étaient liées aux polymères d'actine pour former les structures polygonales à cinq ou six côtés. Le site de liaison de l'actine a été localisé entre les résidus Ala₄₇ et Lys₁₈₆ (Karinch *et coll.*, 1990) sur la chaîne β . La présence des deux premières unités répétitives $\beta 1$ et $\beta 2$ stabilisent l'interaction avec l'actine (Li et Bennett, 1996). L'adducine, localisée dans les jonctions actine-spectrine, jouerait un rôle important dans l'assemblage des deux molécules en augmentant l'affinité de l'actine pour la spectrine.

Le domaine de liaison à l'ankyrine

Dans le globule rouge, l'ankyrine forme un pont entre le squelette membranaire et la membrane, en connectant la spectrine à la bande 3. Le site de liaison de l'ankyrine a été localisé *in vitro* à l'aide de peptides recombinants dans l'hélice B de l'unité répétitive $\beta 15$ (Kennedy *et coll.*, 1991). La séquence protéique de cette unité montre certaines particularités comme l'absence du tryptophane invariant en position 45 et la présence de nombreux acides aminés non similaires par rapport aux autres unités répétitives. Une molécule d'ankyrine se lie à un tétramère de spectrine avec une affinité de 0,25 μ M.

Le domaine de liaison à la protéine 4.1

Le site de liaison de la protéine 4.1 est situé à l'extrémité C-terminale de la chaîne β . La protéine 4.1 sert de relais entre la spectrine et la membrane via une interaction avec la protéine p55 et la glycopherine C (Alloisio *et coll.*, 1993, Hemming *et coll.*, 1994). La protéine 4.1 permet également de renforcer l'interaction entre la spectrine et les oligomères d'actine. En outre, elle est capable de se lier à la bande 3 au même site que l'ankyrine (Lombardo *et coll.*, 1992).

Les domaines « *EF-hands* »

Le segment $\alpha 22$ situé à l'extrémité COOH terminale de la chaîne α ne possède pas de similarité de séquence avec les autres unités répétitives. Les analyses de séquence ont révélé la présence de deux domaines « *EF-hands* » (EF-1 et EF-2). Ces domaines, constitués d'une longue boucle séparant deux hélices α , sont associés par paire et fixent des ions calcium. Les études par RMN réalisées sur le segment $\alpha 22$ révèlent qu'il se produit des changements conformationnels importants en présence et en absence de calcium (Trave *et coll.*, 1995). En présence de calcium, les interactions hydrophobes à l'intérieur des hélices

de EF-1 sont redistribuées et se propagent à EF-2. L'hypothèse apportée par les auteurs est qu'un tel changement structural modifierait les contacts entre les segments $\alpha 22$ et $\beta 1$ qui, nous l'avons vu, jouent un rôle important dans les liaisons intramoléculaires ayant lieu sur les queues des dimères de spectrine au niveau du site de nucléation (Viel et Branton, 1994). Ces études réalisées à partir de peptides recombinants ont d'ailleurs démontré que les contacts intramoléculaires qui ont lieu à la queue du dimère chevauchent les sites de liaison pour le calcium, l'actine, la protéine 4.1 et la membrane plasmique. Cela explique pourquoi le calcium est capable de réguler l'interaction entre la spectrine et l'actine (Trave *et coll.*, 1995). Enfin, il a été démontré qu'une délétion du segment $\alpha 22$ emportant les domaines EF-2 à EF-4 est létale chez la drosophile confirmant l'importance de ce segment *in vivo* (Lee *et coll.*, 1993).

Les domaines d'association avec la membrane, MAD1 et MAD2

Les chaînes β sont capables de se lier directement sur des membranes traitées avec de la soude grâce à un ou deux domaines appelés MAD1 et MAD2 (*membrane association domain*) (Lombardo *et coll.*, 1994a ; Davis et Bennett, 1994).

MAD1 est localisé dans la première unité répétitive des chaînes β mais il n'a pas été caractérisé d'avantage. MAD2, localisé dans la partie C-terminale des chaînes $\beta 1\Sigma 2$, $\beta III\Sigma 1$ et $\beta III\Sigma 1$, contient un domaine PH. Ces domaines sont normalement capables de se lier sur les protéines G hétérotrimériques β/γ et l'inositole-1,4,5-triphosphate (Wang *et coll.*, 1994 ; Wang et Shaw, 1995). La structure du domaine PH de l'isoforme $\beta 1\Sigma 2$ a été résolue par diffraction aux rayons X (Yoon *et coll.*, 1994, Harlan *et coll.*, 1995 ; Macias *et coll.*, 1994 ; Nilges *et coll.*, 1997 ; Zhang *et coll.*, 1995). Enfin, il a été récemment proposé que le domaine PH du produit du gène βII pourrait interagir directement avec la fodaxine (également appelée A60), une protéine exprimée spécifiquement dans les axones (Hayes *et coll.*, 1997).

Le domaine SH3

Le segment $\alpha 10$ qui correspond à un domaine SH3 est situé entre les hélices B et C des unités répétitives linéaires 9 et 11, respectivement. Il est intégré au niveau tridimensionnel dans la neuvième unité conformationnelle dans la boucle BC (Figure 4, page 23).

Le domaine SH3 de la fodrine est extrêmement conservé au cours de l'évolution (100 % d'identité entre l'homme, le rat, le poulet, le xénope) par rapport au reste de la molécule et notamment aux unités répétitives, ce qui suggère une pression de sélection importante. Les domaines SH3 de la spectrine et de la fodrine possèdent 74 % d'identité de séquences.

Malgré une faible identité de séquences entre eux, les domaines SH3 issus de protéines différentes possèdent une structure similaire : deux feuilletts β contenant chacun trois brins β sont repliés l'un sur l'autre de façon antiparallèle. Il en résulte un sillon hydrophobe bordé par deux boucles appelées RT-*Src* et n-*Src* (Figure 6, page 28). La plupart des acides aminés impliqués dans la formation de ce sillon sont

fortement conservés. La majorité des ligands des domaines SH3 viennent se loger dans le sillon hydrophobe grâce à une séquence riche en proline PXXPXR ou RXPXXP (où X représente n'importe quel acide aminé) adoptant une conformation protéique particulière en hélice polyproline de type II : il s'agit d'une hélice avec un enroulement gauche ayant trois acides aminés par tour. La spécificité des interactions serait assurée par les contacts formés entre les ligands et les résidus variables des deux boucles variables RT-*Src* et n-*Src*. Quelques études ont cependant montré l'existence de protéines interagissant avec des domaines SH3 par l'intermédiaire de motifs sans proline (Gorina et Pavletich, 1996 ; Romero *et coll.*, 1996). Un tour d'hélice connecte deux brins β d'un des feuilletts (Figure 6, page 28). La structure du domaine SH3 de la fodrine a été établie à la fois par diffraction aux rayons X (Musacchio *et coll.*, 1992) et par RMN (Blanco *et coll.*, 1997).

2.4. Domaines et sites particuliers

2.4.1. Domaines spécifiques à la fodrine

Le domaine de liaison de la calmoduline

Les spectrines lient la calmoduline en présence de calcium. Deux sites de liaison de la calmoduline ont été définis. Le premier, situé dans l'unité répétitive $\alpha 22$, est commun aux spectrines et fodrines, et possède une faible affinité pour la calmoduline. Le deuxième est spécifique de la fodrine et possède une affinité beaucoup plus importante pour la calmoduline. Ce site de liaison est formé de 37 acides aminés insérés au milieu de l'hélice C de la dixième unité conformationnelle (Figure 4, page 23). Un modèle tridimensionnel de ce site a été réalisé (Stabach *et coll.*, 1997). L'insertion des résidus supplémentaires formerait une boucle sur laquelle viendrait se fixer la calmoduline. D'après ce modèle, la structure α -trihélicoïdale de l'unité conformationnelle serait entièrement respectée. Le site de liaison de la calmoduline est adjacent à des sites de coupure pour différentes protéases telles que les calpaïnes et la caspase 3.

L'isoforme $\alpha II\Sigma 1$

L'isoforme $\alpha II\Sigma 1$ se distingue par l'insertion de vingt acides aminés au milieu de l'hélice C de l'unité répétitive 11 (Figure 4, page 23). La fonction de ce segment n'a pas été déterminée mais sa position dans une région critique de la molécule, onze acides aminés après le domaine SH3, laisse supposer qu'il pourrait avoir un rôle important.

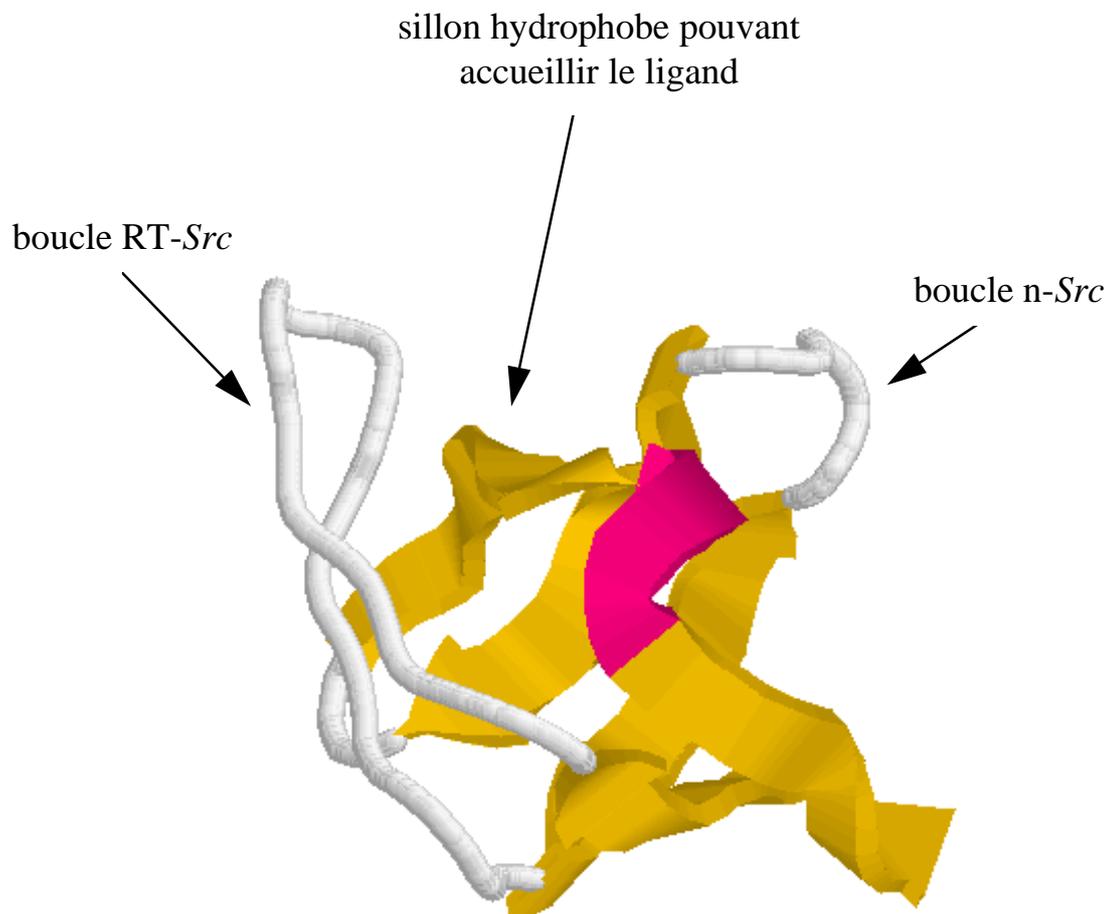


Figure 6

Structure du domaine SH3 de la chaîne α II (fodrine)

D'après Blanco et coll., 1997. Les différents éléments de la structure tertiaire sont représentés tels que les brins β (en jaune), les boucles RT-Src et n-Src (en blanc) et l'hélice α (en rouge).

2.4.2. Autres sites

Le site de coupure par les calpaïnes

In vitro, les calpaïnes μ et m coupent la fodrine au milieu de la chaîne α puis dans la partie carboxy terminale de la chaîne β (Siman *et coll.*, 1984 ; Harris et Morrow, 1988). La liaison de la calmoduline sur la chaîne α augmente considérablement la coupure de la fodrine (Seubert *et coll.*, 1987 ; Harris et Morrow, 1990). Le site de clivage sur la chaîne α , entre les résidus Tyr₁₁₇₅ et Gly₁₁₇₆, est adjacent au site de fixation de haute affinité de la calmoduline.

Le site de coupure par la caspase 3

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est une forme de mort cellulaire avec un certain nombre de caractéristiques spécifiques comme la condensation du noyau, la fragmentation de la chromatine en nucléosomes, le bourgeonnement de la membrane et la formation d'un corps apoptotique. L'apoptose intervient soit dans le développement de l'organisme (morphogénèse), dans la différenciation et la maturation d'une cellule (par exemple la sélection des lymphocytes T) mais peut également être déclenchée par un stimulus extérieur (exposition à une toxine, hypoxie, action de certaines hormones de croissance). Il a été démontré que la fodrine était protéolysée au cours de l'apoptose induite par différents stimuli cellulaires (Martin *et coll.*, 1995) par l'action de la caspase 3 également appelée CPP32 (Cryns *et coll.*, 1996 ; Nath *et coll.*, 1996 ; Vanags *et coll.*, 1996 ; Greidinger *et coll.*, 1996 ; Janicke *et coll.*, 1998). Comme pour les calpaïnes, la fodrine clivée par la caspase 3 pourrait être incapable d'interagir avec l'actine. Ce processus, en induisant un réarrangement important du squelette membranaire par une déstabilisation de ses interactions avec la fodrine, permettrait le bourgeonnement de la membrane observé sur les cellules en apoptose. La protéolyse de la fodrine est un phénomène très précoce qui intervient avant la protéolyse d'autres substrats tels que la polymérase poly-(ADP-ribose), la sous-unité de 70 kDa de la ribonucléoprotéine U1 ou encore la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (Greidinger *et coll.*, 1996).

Le clivage de la fodrine par la caspase 3 se produit sur les deux chaînes de manière séquentielle sur plusieurs sites de coupure, deux sites principaux sur α et trois sur β . Le premier site de la chaîne α est localisé entre les résidus Asp₁₁₈₅ et Ser₁₁₈₆. Sur le plan tridimensionnel, ce site est adjacent au domaine de liaison de la calmoduline, neuf acides aminés après le site de coupure par les calpaïnes (Figure 4, page 23). La caspase 3 coupe la fodrine, au niveau de ce site, ce qui conduit à la production de deux fragments de taille identique. Le deuxième site se trouve entre les résidus Asp₁₄₇₈ et Ser₁₄₇₉, sans doute dans une boucle située entre les hélices A et B de l'unité conformationnelle 13.

Le clivage sur la chaîne β est plus complexe. À la différence de ce qui se produit pour les calpaïnes, la caspase 3 coupe la chaîne β rapidement et de manière concomitante à la chaîne α . Le site de coupure initial se situe entre les résidus Asp₁₄₅₇ et Ser₁₄₅₈, à proximité du site de coupure pour les calpaïnes. Les sites de coupure suivants sont situés entre les résidus Asp₁₂₅₄-Asp₁₂₅₅ et Asp₂₁₄₆-Thr₂₁₄₇. D'autres sites de coupure existent sur la chaîne β mais ils sont sans doute très minoritaires.

Il a été proposé une action en synergie des calpaïnes et des caspases impliquées dans la protéolyse de la fodrine dans des processus tels que l'apoptose ou l'ischémie.

La phosphorylation

La spectrine

La spectrine érythroïde est phosphorylée *in situ* et *in vitro* par des protéines sérine/thréonine kinase indépendantes de l'AMP cyclique. Six molécules de phosphate sont incorporées sur des résidus sérine et thréonine de l'extrémité C terminale de la chaîne β (Pédroni *et coll.*, 1993). Cependant, la localisation des résidus phosphorylés et le rôle de cette phosphorylation ne sont pas parfaitement élucidés. La chaîne β de la spectrine phosphorylée par une caséine kinase de type I entraîne une diminution réversible de la stabilité de la membrane (Manno *et coll.*, 1995). Cependant, la phosphorylation ne semble pas affecter la formation des tétramères, ni la liaison à l'actine ou à l'ankyrine.

La fodrine

Les chaînes α et β de la fodrine sont des substrats de protéines kinase *in vivo*. Au cours de la division cellulaire, la fodrine est redistribuée de la membrane vers le cytosol et cette redistribution s'accompagne d'une phosphorylation de résidus sérine sur la chaîne β (Fowler & Adam, 1992). Des études *in vitro* ont montré que la fodrine pouvait être phosphorylée sur des résidus tyrosine : chaînes α et β par le récepteur à l'insuline (Kadowaki *et coll.*, 1985), la chaîne α par la protéine *c-Src* et la chaîne β par le récepteur à l'EGF (Akiyama *et coll.*, 1986). Récemment, il a été montré que la chaîne α de la fodrine du *Torpedo californica* était phosphorylée *in vivo* sur des résidus tyrosine (Balasubramanian et Hugarir, 1999).

3. Fonctions

Comparé aux autres cellules, le globule rouge est un système cellulaire simple et hautement spécialisé, principalement destiné au transport de l'oxygène dans l'organisme. Les différents résultats expérimentaux ainsi que les données de la pathologie ont permis de bien établir les fonctions de la spectrine dans le globule rouge. La découverte de la fodrine dans toutes les cellules eucaryotes nucléées a ouvert de nouveaux champs d'investigation. Les données suggèrent aujourd'hui que la fodrine pourrait avoir des fonctions autres que celle de simple composant structural impliqué dans la déformation ou la stabilité de la membrane. La grande diversité de la fodrine au sein des squelettes membranaires dans ces cellules d'une part, et l'absence de défaut moléculaire de fodrine d'autre part, renforce la difficulté de l'étude de ses fonctions.

3.1. Fonctions de la spectrine

3.1.1. Stabilité et propriétés dynamiques du squelette érythrocytaire

La fonction de la spectrine a été clairement définie dans le globule rouge grâce aux données fournies par l'étude de certaines anémies hémolytiques héréditaires. Les anomalies identifiées siègent le plus fréquemment sur les extrémités N et C-terminales des chaînes α et β respectivement. Ces extrémités portent, nous l'avons dit, les sites d'interaction des deux dimères pour la formation du tétramère. Ainsi, ces anomalies moléculaires des chaînes α et β , en empêchant la formation des tétramères de spectrine, sont directement responsables des conséquences physiopathologiques chez les patients porteurs de ces mutations : une instabilité membranaire conduisant à une déformation elliptocytaire permanente des globules rouges appelée elliptocytose héréditaire (EH). Chez certains patients, les érythrocytes sont particulièrement fragiles et subissent une hémolyse importante nécessitant une splénectomie (pyropoïkilocytose héréditaire). Des cas extrêmes d'anarsaques fœtoplacentaires ont été rapportées, conséquences d'hémolyse prénatale intense due à des mutations également situées dans le site de tétramérisation (Gallagher *et coll.*, 1995 et 1997). Enfin, des défauts quantitatifs de spectrine peuvent être responsables de la forme sphérique des globules rouges (sphérocytose héréditaire) par diminution de leur surface membranaire.

D'autres mutations de la spectrine, associées à un phénotype d'elliptocytose sévère à l'état homozygote, ont également été identifiées sans qu'un défaut de tétramérisation ait été mis en évidence (Alloisio *et coll.*, 1988 ; Fournier *et coll.*, 1997).

La mutation α^{LELY} provoque une délétion de six acides aminés dans l'hélice A du segment $\alpha 21$. Cette délétion diminue l'affinité des deux chaînes au site de nucléation et a pour conséquence de privilégier le recrutement à la membrane du dimère $\alpha\beta$ normal par rapport au dimère $\alpha^{\text{LELY}}/\beta$ car seuls les dimères normaux semblent être recrutés (Wilmotte *et coll.*, 1993). Chez les sujets sains comme chez les sujets homozygotes pour l'allèle α^{LELY} , il n'existe pas de déficit quantitatif de spectrine recrutée à la membrane car la chaîne α est synthétisée en large excès par rapport à la chaîne β (Randon *et coll.*, 1994). En revanche, en présence d'un allèle porteur d'une mutation spectrine, chez un sujet EH, on observera des conséquences sur le phénotype clinique. Si l'allèle α^{LELY} est associé en *trans* à un allèle muté, responsable d'une elliptocytose héréditaire, la présence de l'allèle α^{LELY} favorisera le recrutement dans la membrane du produit du gène portant la mutation EH, ce qui aura des conséquences aggravantes du phénotype clinique. Inversement, si l'allèle α^{LELY} est associé en *cis* à un allèle muté, le produit de ce gène muté sera moins recruté à la membrane, ce qui diminuera la sévérité du phénotype clinique. Ces résultats ont ainsi permis d'apporter une explication moléculaire cohérente des données cliniques hétérogènes observées chez les patients atteints d'elliptocytoses héréditaires.

3.1.2. Invalidations des gènes de la spectrine

Les invalidations des gènes αI et βI de la spectrine ont complété les données fournies par les expériences *in vitro* et la pathologie. Chez la souris, les invalidations des gènes αI ($Spna1^{sph}/Spna1^{sph}$ ou sph/sph) ou βI ($Spnb1^{ja}/Spnb1^{ja}$ ou ja/ja) conduisent à un déficit très important de la spectrine dans les globules rouges avec une anémie hémolytique sévère (Bodine *et coll.*, 1984 ; Grimber *et coll.*, 1992 ; Bloom *et coll.*, 1994 ; Birkenmeier *et coll.*, 1988). Au-delà de ce phénotype primaire attendu, un certain nombre d'observations supplémentaires ont été apportées. À partir des souris sph/sph , Dahl *et coll.* (1994) ont établi une lignée érythroleucémique présentant des formes anormales et une extrême fragilité en culture. Ils ont démontré que le coiffage des glycoprotéines par les lectines ou les anticorps se produit plus rapidement dans les cellules sph/sph que dans les cellules érythroleucémiques « normales ». Ces données confirment d'une part la fonction essentielle de la spectrine dans l'organisation des structures membranaires et d'autre part sa capacité à limiter la mobilité des protéines intégrales dans la membrane. Très récemment, Wandersee *et coll.* (1998) ont montré que les souris sph/sph adultes développaient des lésions thrombotiques et que les cellules hématopoïétiques déficitaires en spectrine étaient directement responsables de la mise en place de ces accidents thrombotiques.

3.2. Fonctions de la fodrine

Aujourd'hui, aucun défaut moléculaire de la fodrine n'a été mis en évidence chez l'homme. L'invalidation des gènes α II ou β II, létale chez la drosophile a montré que la fodrine était indispensable au développement de l'animal (Lee *et coll.*, 1993 ; Deng *et coll.*, 1995).

Les premières investigations suggèrent que les fodrines pourraient jouer un rôle dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire, dans le trafic intracellulaire des protéines ainsi que dans la régulation d'activités enzymatiques.

3.2.1. Remodelage du squelette membranaire et clivage de la fodrine

Il semblerait qu'un grand nombre de processus dynamiques impliquant la plasticité du squelette membranaire puisse mettre en jeu la fodrine. Les événements conduisant à un remodelage de ce squelette membranaire sont peu connus mais restent une étape clé de la vie cellulaire. Compte tenu du rôle fondamental que joue la fodrine pour maintenir l'organisation et l'intégrité de la membrane cellulaire, son clivage par les protéases et plus particulièrement sur sa chaîne β possédant les sites de liaison pour l'actine et l'ankyrine pourrait constituer une étape nécessaire et indispensable au déroulement de ces processus. *In vitro*, les clivages des chaînes α et β par les calpaïnes affectent la fonction de tétramérisation et entraînent la dissociation des complexes entre la fodrine et les oligomères d'actine (Harris et Morrow, 1990). De même, l'association de la fodrine à la membrane est diminuée après clivage de sa chaîne β (Hu et Bennett, 1991). Cependant, le clivage de la fodrine uniquement par la calpaïne sur sa chaîne α ne conduit pas à la mort cellulaire (Di Stasi *et coll.*, 1991). Ainsi, un clivage modéré par la calpaïne de la chaîne α de la fodrine, tel que celui qui se produit après la stimulation du récepteur NDMA (*N-methyl-D-aspartic acid*) pourrait être un processus physiologique associé à la plasticité du squelette membranaire sans être létal pour la cellule.

Malgré l'absence d'observation de défaut moléculaire de la fodrine, un certain nombre d'études suggèrent que la fodrine pourrait jouer un rôle important dans le développement de certaines pathologies. Ainsi, une étude récente a permis de mettre en évidence la présence d'auto-anticorps anti- α fodrine chez des patients atteints d'un lupus érythémateux ou du syndrome de Gougerot-Sjögren (Haneji *et coll.*, 1997, Watanabe *et coll.*, 1999). Cette dernière affection est caractérisée par le tarissement des sécrétions exocrines, spécialement lacrymale et salivaire s'accompagnant dans la plupart des cas d'un rhumatisme inflammatoire chronique. De même, une autre étude suggère que la dégradation de la fodrine et la génération d'auto-anticorps anti-fodrine pourraient être impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Fernández-Shaw *et coll.*, 1997). Ces données confirment que la protéolyse de la fodrine est sans doute un processus dynamique important dans la physiologie cellulaire et qu'un dérèglement de

celui-ci pourrait conduire à divers phénotypes cliniques. Pour le moment, les bases génétiques de ces différentes maladies impliquant la fodrine n'ont pas été définies.

La dégradation de la fodrine pourrait également être impliquée dans des processus anormaux comme l'ischémie (Doctor *et coll.*, 1993 ; Siegel *et coll.*, 1994). La protéolyse de la fodrine pourrait contribuer au changement morphologique accompagnant l'hypoxie des cellules neuronales et épithéliales et la dégénération des neurones (Seubert *et coll.*, 1990).

3.2.2. Polarité cellulaire

La fonction des cellules épithéliales en tant que barrière perméable et sélective entre les compartiments transcellulaires et le fluide interstitiel est une étape cruciale dans l'ontogénie d'une grande variété de tissus ou d'organes. Cette fonction passe par l'établissement et le maintien de la distribution polarisée et spécifique de protéines comme les transporteurs membranaires ou les canaux ioniques aux pôles apical et basolatéral de la cellule.

3.2.3. Adhésion cellulaire

La première étape de la polarité cellulaire est l'établissement des contacts cellule-cellule impliquant un complexe multiprotéique appelé complexe d'adhésion. Le squelette membranaire spectrine-actine se lie indirectement à la cadhérine-E, une protéine majeure de ce complexe d'adhésion (Nelson *et coll.*, 1990). La protéine cadhérine-E est la première à être recrutée au niveau des contacts entre cellules suivie de l'actine, de la fodrine, de l'adducine et de la protéine 4.1. Il a été proposé que l'interaction avec le squelette membranaire spectrine-actine pourrait empêcher l'internalisation et limiter la mobilité latérale de la cadhérine-E au niveau du pôle basolatéral. Alors que le domaine cytoplasmique de la cadhérine-E empêche la liaison de la chaîne β de la fodrine sur la membrane *in vitro* (Lombardo *et coll.*, 1993), aucune interaction directe entre la cadhérine-E et la fodrine n'a été démontrée. Il existe cependant un lien, *in vitro*, entre la caténine α et la fodrine (Lombardo *et coll.*, 1994b) mais la confirmation de cette interaction n'a pas été démontrée *in vivo*. L'invalidation des gènes α et β -spectrine chez la drosophile confirme son rôle dans les interactions cellule-cellule et le maintien de l'intégrité cellulaire.

3.2.4. Établissement de la polarité cellulaire

Comme nous l'avons dit, l'une des particularités de la polarité cellulaire est la distribution spécifique, à un pôle ou un autre de la cellule, de protéines telles que les transporteurs membranaires ou les canaux ioniques. Dans les cellules épithéliales rénales polarisées, la distribution de la fodrine est restreinte à la membrane plasmique basolatérale (Nelson et Veshnock, 1986 ; Kashgarian *et coll.*, 1988 ; Piepenhagen

et coll., 1995). La fodrine se lie à l'ankyrine qui se lie à son tour à la pompe à ions (Na⁺,K⁺)ATPase (Nelson et Veshnock, 1987 ; Morrow *et coll.*, 1989 ; Nelson et Hammerton, 1989 ; Davis et Bennett, 1990 ; Gundersen *et coll.*, 1991 ; Devarajan *et coll.*, 1994). Dans l'épithélium rétinale pigmentaire, la localisation de la pompe ionique se fait à la membrane apicale plutôt qu'à la membrane basolatérale (Alper *et coll.*, 1994 ; Rizzolo et Zhou, 1995). La fodrine permettrait donc d'adresser la (Na⁺,K⁺)ATPase à un pôle ou un autre selon le type cellulaire. Rotin *et coll.* (1994) ont également proposé que la fodrine pouvait adresser vers la membrane apicale de cellules épithéliales alvéolaires de poumon la sous-unité α du canal à sodium sensible à l'amiloride. Le récepteur NMDA peut également se lier à la fodrine. Cette interaction pourrait être importante dans les changements morphologiques qui se produisent dans les dendrites des neurones parallèlement à l'activité et la plasticité synaptique (Wechsler et Teichberg, 1998). Enfin, signalons que des interactions entre la fodrine et les protéines intégrales de la membrane telles que CD45 (Iada *et coll.*, 1994) et N-CAM180 (Pollerberg *et coll.*, 1987) ont été identifiées. Ainsi, la distribution de la fodrine pourrait permettre de transloquer spécifiquement des protéines qui lui sont associées vers ces différents compartiments cellulaires.

3.2.5. Maintien de la polarité cellulaire

Le maintien de la polarité cellulaire dépend principalement de la délimitation nette entre les membranes apicales et basolatérales de la cellule qui est assurée par des complexes protéiques : l'un d'entre eux appelé jonction serrée, est localisé près de la surface apicale des cellules épithéliales et assure cette fonction de barrière imperméable entre les deux compartiments. L'interaction entre les jonctions serrées et les protéines du squelette membranaire comme la fodrine et l'ankyrine est un processus dynamique impliqué dans la morphologie des cellules épithéliales (Bennett, 1990 ; Beck et Nelson, 1996). Plus précisément, la fodrine est incluse dans un complexe avec ZO-1 (*Zonula Occludens 1*), une protéine localisée spécifiquement dans les jonctions serrées cellulaires (Itoh *et coll.*, 1991 et 1993). La nature de cette interaction, directe ou indirecte, reste incertaine. Après déplétion en ATP intracellulaire provoquant l'ischémie de la cellule, la fraction de fodrine localisée dans les jonctions serrées avec ZO-1 augmente. Cette association entre les protéines des jonctions serrées et la fodrine pourrait être régulée par le calcium ou la phosphorylation des protéines (Tsukamoto et Nigam, 1997).

Dans les cellules non épithéliales, telles que les myocytes cardiaques, ZO-1 est capable de lier la connexine-43 à la fodrine (Toyofuku *et coll.*, 1998). Cette interaction, dont la nature directe ou indirecte reste à déterminer, permettrait de transloquer la connexine-43 dans les disques intercalaires et générer ainsi les jonctions interstitielles des myocytes cardiaques.

Au cours du processus ischémique, les jonctions serrées des cellules épithéliales rénales sont peu à peu détruites et la distribution basolatérale de la fodrine dans ces cellules est modifiée. Ces modifications sont réversibles et le retour à une morphologie cellulaire normale coïncide avec la distribution polarisée

des protéines membranaires intégrales (Tsukamoto et Nigam, 1997). Les cellules épithéliales de colon CaCo-2 surexprimant le domaine de liaison de l'actine ou le domaine de liaison à l'ankyrine de la fodrine perdent leur morphologie épithéliale et deviennent multinucléées. La chaîne β de la fodrine n'est plus capable de s'associer à la membrane et la localisation de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ est modifiée. Ces changements morphologiques importants entraînent la mort rapide de la cellule au bout de 10 à 14 jours de culture (Hu *et coll.*, 1995). La fodrine semble donc impliquée non seulement dans la mise en place de cette polarité cellulaire mais également dans son maintien.

3.2.6. Trafic intracellulaire des protéines

Appareil de Golgi

Il apparaît de plus en plus que les compartiments cellulaires très spécialisés pourraient posséder chacun leur propre squelette membranaire. Ainsi, Beck *et coll.* (1994) ont identifié une isoforme du gène βI localisée dans l'appareil de Golgi. Le produit du gène βIII , cloné récemment, est exclusivement confiné dans l'appareil de Golgi comme l'ont montré les études d'immunolocalisation. Des isoformes d'autres protéines du squelette membranaire comme l'ankyrine sont également spécifiques de l'appareil de Golgi.

Régulation de l'exocytose

La stimulation de la sécrétion dans les cellules chromaffines adrénales s'accompagne d'une redistribution de la fodrine qui vient former des plaques sous la membrane plasmique, constituant une barrière entre la membrane et les vésicules d'exocytose (Perrin et Aunis, 1985). En empêchant la fusion des vésicules à la membrane, la fodrine pourrait participer à un mécanisme de régulation de l'exocytose (Fujimoto *et coll.*, 1991). Le traitement des cellules perméabilisées avec un anticorps anti-fodrine inhibe la réponse sécrétoire (Perrin *et coll.*, 1987). Par ailleurs, la fodrine permettrait de faire la connexion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique neuronale présynaptique (Goodman *et coll.*, 1995). La fodrine pourrait ainsi jouer un rôle majeur dans la libération des neurotransmetteurs dans l'espace synaptique.

3.2.7. La fodrine dans les tumeurs

La mise en place des nombreux mécanismes qui conduisent une cellule normale à devenir tumorale pourrait impliquer directement la fodrine. Nous avons vu que la protéine joue un rôle important dans la mise en place de la morphologie normale de la cellule et dans son maintien en monocouche en culture. Dans certains adénocarcinomes, la fodrine perd sa localisation membranaire pour devenir cytoplasmique (Sormunen *et coll.*, 1994 et 1997 ; Tuominen *et coll.*, 1996). D'après les auteurs, la proportion de fodrine cytoplasmique semble être directement corrélée à la perte de différenciation des cellules. La délocali-

sation de la fodrine dans ces cellules tumorales pourrait leur permettre de perdre leur adhésion cellulaire et d'acquérir ainsi une mobilité indispensable à la formation des métastases.

Il a également été démontré que le domaine de liaison de l'ankyrine de la fodrine était capable de lier la schwannomine, le produit d'un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la formation des neurofibromatoses de type 2 (Scoles *et coll.*, 1998). La schwannomine, est une protéine capable de lier la membrane plasmique mais également l'actine, sans doute par l'intermédiaire de la fodrine comme le propose les auteurs. Ils suggèrent que l'altération du complexe schwannomine/fodrine/actine pourrait être une étape précoce dans la mise en place des tumeurs.

4. Axes de recherche

La spectrine et la fodrine sont des protéines essentielles pour plusieurs propriétés ou fonctions cellulaires comme la stabilité des membranes, la polarité ou le trafic intracellulaires. Cependant, la compréhension de leurs rôles précis est encore incomplète. L'objectif de mon travail était de procéder à une étude fonctionnelle et structurale aussi approfondie que possible de deux domaines de ces protéines. En ce qui concerne la spectrine, il s'agissait de conforter la validation du modèle du site de tétramérisation. Dans le cas de la fodrine, pour laquelle les données étaient moins avancées, mon but était d'identifier la fonction de son domaine SH3.

4.1. Étude fonctionnelle du site de tétramérisation

Présentation du modèle

Le modèle du site de tétramérisation a d'abord été établi :

- sur les données fournies par la pathologie de la spectrine associée aux EH. Les expériences indiquaient que certaines mutations de la chaîne β de la spectrine modifiaient le profil de la protéolyse ménagée de la chaîne α par la trypsine. Cela suggérait qu'un défaut d'interaction entre les deux chaînes, due à la mutation sur la chaîne β , pouvait expliquer la susceptibilité de protéolyse de la chaîne α (Tse *et coll.*, 1990) ;
- les analyses par alignement de séquence des ADNc suggéraient que l'extrémité N-terminale de la chaîne α commençait par une hélice C isolée (unité incomplète $\alpha 0$) et que l'extrémité C-terminale de la chaîne β se terminait par deux hélices A et B (unité incomplète $\beta 17$).

À partir de ces différentes données, un modèle du site de tétramérisation a été proposé : les hélices A et B de la chaîne β se replient l'une sur l'autre de façon antiparallèle et forment un sillon qui pourrait accueillir l'hélice C isolée de la chaîne α et constituer ainsi une unité conformationnelle semblable à celles que l'on retrouve tout le long de la protéine native (Tse *et coll.*, 1990). Cette fonction de tétramérisation entre les hétérodimères de spectrine est absolument fondamentale pour la stabilité du squelette membranaire. Ce modèle a ensuite été conforté par le fait qu'il existe une relation directe entre la localisation des mutations et la sévérité du défaut d'interaction des deux chaînes α et β (Lecomte *et coll.*, 1993). Les mutations situées sur les trois hélices présumées impliquées dans le site de tétramérisation de la spectrine ont un retentissement sévère sur l'interaction ce qui se manifeste, chez le patient, par des pourcentages élevés de spectrine dimérique. Chez des sujets homozygotes pour une telle mutation, on observe jusqu'à 90 % de dimère de spectrine dans la membrane (Tse *et coll.*, 1990). En

revanche, les mutations localisées en dehors de ces trois hélices affectent moins l'interaction dimère-dimère. Chez certains sujets homozygotes pour une mutation localisée loin des premières hélices, on observe encore la présence de tétramères dans la membrane, entre 40 et 70 %.

Démarche

Peu d'études biochimiques et structurales avaient été, à ce jour, rapportées pour conforter le modèle du site de tétramérisation. Il s'agissait donc d'accréditer, à partir de peptides recombinants obtenus dans *E. coli*, le modèle proposé en définissant sur les chaînes α et β , les structures nécessaires et suffisantes impliquées dans le site de tétramérisation puis d'approfondir les données biochimiques de cette interaction. J'ai ensuite étudié le retentissement de mutations localisées sur les hélices A et B de l'unité répétitive β 17 et associées à des EH afin de vérifier qu'elles sont bien responsables du défaut d'interaction et qu'il ne s'agissait pas, pour l'une d'entre elles, d'un polymorphisme. En effet, les mutations observées au laboratoire et décrites dans la littérature ont été le plus souvent localisées sur une hélice C de la chaîne α et tout particulièrement sur la première hélice C.

4.2. Étude fonctionnelle du domaine SH3 de la fodrine

Présentation du modèle

Les domaines SH3 sont des modules protéiques d'une cinquantaine d'acides aminés impliqués dans des interactions protéine-protéine. On les trouve dans une grande variété de protéines comme des enzymes (c-src, PLC γ), des adaptateurs moléculaires (Crk, Grb2) et des protéines du squelette membranaire ou du cytosquelette (spectrine érythroïde et non érythroïde, p55, la protéine de levure ABP-1 liant l'actine). Les domaines SH3 sont impliqués dans des interactions protéine-protéine transitoires telles que celles nécessaires pour la transduction des signaux, la régulation d'une activité enzymatique ou encore l'adressage d'une protéine vers la membrane ou d'une enzyme à proximité de son substrat. Ces interactions sont relativement faibles mais spécifiques, ce qui est idéal pour ces processus cellulaires transitoires.

Ziennicka-Kotula *et coll.* (1998) ont montré que le domaine SH3 de la spectrine est capable de se lier à e3B1, une protéine déjà identifiée pour sa liaison au domaine SH3 de la protéine tyrosine kinase eps8. Les auteurs ont proposé un mécanisme général d'interaction entre les protéines à activité tyrosine kinase et le squelette membranaire.

La première étude de la fonction du domaine SH3 de la fodrine a démontré qu'une protéine de fusion GST-SH3, injectée dans des fibroblastes en mouvement, est localisée au niveau de la face cytoplasmique de la membrane des lamellipodes conductrices et des lobes pseudopodiaux (Merilainen *et coll.*, 1993). Alors que la protéine de fusion GST-SH3 est colocalisée avec l'actine, abondante dans ces compartiments cellulaires, les auteurs ont démontré que les filaments d'actine n'étaient pas nécessaires

pour la localisation de la protéine GST-SH3 dans les lamellipodes. Puis, en 1991, Smith *et coll.* ont publié des résultats qui démontraient que le canal à sodium épithélial sensible à l'amiloride (ENaC) interagissait avec la fodrine et l'ankyrine. L'hypothèse formulée par les auteurs était que ces interactions maintiendraient la distribution polarisée de ENaC dans la membrane apicale des cellules épithéliales, la fodrine et l'ankyrine étant là pour stabiliser la mobilité latérale du canal dans la membrane apicale. Sur la base de ces travaux, Rotin *et coll.* (1994) ont décrit la sous-unité α de ENaC du rat comme étant un ligand direct du domaine SH3 de la fodrine. L'interaction serait assurée par une région riche en proline PPLALTAPPPA. L'originalité de cette séquence protéique, qui ne contient pas de motif consensus PXXP jusqu'alors décrite comme impliquée dans la liaison avec les domaines SH3, a conduit Rotin *et coll.* à la présenter comme une nouvelle classe de ligand.

Démarche

Mon travail a été d'étudier, sur un modèle de cellules épithéliales, le rôle précis de l'interaction entre le domaine SH3 et ENaC. De plus, l'environnement scientifique de notre unité, au sein de l'Institut de Recherche Fédératif « Biologie des Cellules Épithéliales » de la faculté de médecine Xavier Bichat, nous permettait l'accès à de nombreuses compétences tant humaines que techniques (obtention de lignées cellulaires, microscopie confocale). J'ai pu en particulier bénéficier de la collaboration des membres de l'unité INSERM U-478 (dirigée par Nicolette Farman) dont l'une des thématiques principales est l'étude de ENaC. La possibilité d'une interaction entre le domaine SH3 de la fodrine et le canal à sodium ouvrait plusieurs questions : le domaine SH3 intervient-il pour adresser le canal vers la membrane apicale ? A-t-il un rôle de stabilisation du canal dans la membrane ? Ou bien, régule-t-il l'activité de transport du canal par un mécanisme encore inconnu ? Enfin, comment la fodrine qui, nous l'avons vu, a été principalement localisée au pôle basolatérale des cellules épithéliales rénales peut-elle adresser le canal qui, quant à lui, est spécifiquement localisé à la membrane apicale ?

Pour répondre à ces questions, j'ai entrepris de reproduire le modèle à l'aide de plusieurs méthodologies :

1. interaction des différents partenaires obtenus sous forme de peptides recombinants ;
2. établissement de lignées stables, dites « dominant négatif », dans lesquelles les ligands du domaine SH3 de la fodrine sont titrés grâce à une surexpression de celui-ci.

Ces travaux m'ont amené à identifier et caractériser deux isoformes de la chaîne α de la fodrine mais aussi à remettre en cause la réalité de cette interaction. Je me suis donc orienté vers la recherche de nouveaux partenaires du domaine SH3 par la technique du double hybride. La grande variété des partenaires identifiés m'a conduit à utiliser d'autres techniques, pour approfondir les données et identifier le ou les partenaires du domaine SH3 de la fodrine.

Matériels et Méthodes

1. Méthodes générales

1.1. Transcription inverse

La réaction est réalisée sur 2 µg d'ARN totaux dans un volume de 20 µl en présence de Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DL-dithiothreitol (DTT) 10 mM, hexanucléotides 10 ng/µl, 0,5 mM de chaque dNTP (Gibco), SAB 0,1 mg/ml, 0,25 unités de « *RNase Inhibitor* » (Gibco) et 10 unités de transcriptase inverse *SuperScript*[™] (Gibco). Les réactions sont effectuées dans un appareil *Hybaid Thermal Reactor* (Cera Labo) avec le programme suivant :

1. dénaturation des boucles des ARN à 85°C pendant 30 secondes ;
2. hybridation de 10 minutes à 70°C ;
3. élongation des ADNc à 42°C pendant 60 minutes ;
4. le programme se termine par une étape de 6 minutes à 96°C et une étape d'une minute à 30°C.

Après ajout de 80 µl d'une solution de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), les ADNc sont congelés à -20°C. Les amplifications par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont réalisées sur 5 µl d'ADNc pour un volume réactionnel total de 50 µl.

1.2. PCR

Les amorces proviennent de chez Gibco, Genset ou Génomic.

Les réactions avec la polymérase *Taq* sont effectuées dans un volume final de 50 µl avec 0,2 unité de polymérase *Taq* (Gibco) dans la solution suivante : Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, W-1 0,05 %, 0,2 mM de chaque dNTP et 0,2 µM de chaque amorce.

Amorce	Séquence (5'→3')	Site de restriction	Position sur l'ADNc ^a
αFO SH3 S	<u>C</u> AAG GAT TGG TGG AAA GTG GAA	aucun	3105 ^b
αFO C30 UR11 AS	<u>I</u> GCA ACT CTT CTC CAA CAT GCC TTT	aucun	3376 ^c
αFO EX22' R13 S	<u>I</u> G CGT ATG AAG CAG GTG GAA GAA CTA	aucun	3293 ^b
αFO UR11 E66 AS	<u>I</u> C AAC CTG CTC CAA GTC TGC TCC	aucun	3482 ^c
αFO EX22' G28 AS	<u>C</u> C GGC CTC CTT AGT TAT GCG TG	aucun	3281 ^c
αFO UR9 D25 S	GGG <u>CC ATG</u> GAC CTG GAG GAC TCT CTG CAG	<i>NcoI</i>	2754 ^b
αFO UR9 D25 S bis	G GGG GGA TCC <u>G</u> AC CTG GAG GAC TCT CTG CAG	<i>BamHI</i>	2755 ^b
αFO UR11 K28 R	G GGG GAA TTC TCA <u>C</u> TT CTC CAA CAT GCC TTT ACG	<i>EcoRI</i>	3369 ^c
αFO UR12 S28 AS	GGG GGA TCC CAA GAG CTG GCT CCG TTC	<i>BamHI</i>	3791 ^c
SH3 kozak-5'	CCC GGA TCC ACC <u>A</u> TG GAC CTG GAG GAC TCT CTG CAG GC	<i>BamHI</i>	2754 ^b
SH3 flag-3'	C CCG AAT TCA TTT GTC ATC GTC ATC TTT GTA GTC <u>C</u> TT CTT GCA ACT CTT CTC CAA CAT GCC	<i>EcoRI</i>	3381 ^c
Fod-exΣ1-5'	A ATT CTA <u>A</u> AT CAG ACA CGC ATA ACT AAG GAG GCC GGC AGT GTA TCT CTG CGT ATG AAG CAG GTG GAA GAA CTA TAT CAT TAA C	½ <i>EcoRI</i>	3253 ^b
Fod-exΣ1-3'	CA TGG TTA <u>A</u> ATG ATA TAG TTC TTC CAC CTG CTT CAT ACG CAG AGA TAC ACT GCC GGC CTC CTT AGT TAT GCG TGT CTG ATT TAG	½ <i>NcoI</i>	3325 ^c
αrENaC 1846 S	CCC GAA TTC GGA GCC GGT ACT GGT CTC C	<i>EcoRI</i>	1846 ^b
αrENaC 2097 AS	CCC CCT CGA GTC AGA GCG CCG CCA GGG CAC	<i>XhoI</i>	2097 ^c
hLMPTP M1 <i>EcoRI</i>	G GGG GGA ATT CAG <u>A</u> TG GCG GAA CAG GCT ACC	<i>EcoRI</i>	-1 ^b
hLMPTP H158 <i>XhoI</i>	G GGG GCT CGA GCC TCA GTG GGC CTT CTC CAA G	<i>XhoI</i>	480 ^c

^a La position sur l'ADNc correspond à la première base 5' de l'amorce qui hybride cet ADNc. Cette base est soulignée pour chaque amorce et ne correspond pas forcément à la première base de l'amorce lorsque celle-ci contient un site de restriction ou n'importe quelle autre séquence supplémentaire. La numérotation sur les ADNc provient de Moon et McMahon (1990) pour la chaîne α de la fodrine humaine (la première base du codon initiateur est la base 103), de Canessa *et coll.* (1993) pour αrENaC (la première base du codon initiateur est la base 1) et de Bryson *et coll.* (1995) pour la LMPTP humaine (la première base du codon initiateur est la base 1). Les sites de restriction utilisés sont indiqués en rouge.

^b Sens

^c Antisens

Tableau 2
Liste des amorces utilisées

Les réactions avec la polymérase *Pfu* sont effectuées dans un volume final de 50 µl avec 0,4 unité de polymérase *Pfu* (Stratagene/Ozyme) dans la solution suivante : Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 0,1 %, SAB 100 µg/ml, 0,2 mM de chaque dNTP et 0,5 µM chaque amorce.

Le programme pour la réaction PCR est le suivant :

1. dénaturation à 94°C pendant 2 minutes ;
2. 28 à 40 cycles selon la taille du fragment à amplifier, l'efficacité de la réaction et la nature de la polymérase comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 à 30 secondes, une étape d'hybridation dont la température dépend du couple d'amorces (20 à 30 secondes) et une étape d'élongation à 72°C avec un temps de 2 minutes par kpb pour la *Pfu*, et un temps de 0,5 à 1 minute par kpb pour la *Taq*
3. le programme se termine par une étape de 7 à 10 minutes à 72°C suivie d'une étape d'une minute à 30°C.

Les thermocycleurs utilisés sont de type *Hybaid Thermal Reactor* (Cera Labo), *UNO II* (Biometra[®]) ou *TRIO-Thermoblock* (Biometra[®]).

Après électrophorèse sur un gel d'agarose (0,8 à 3 % selon la taille du fragment amplifié) contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium, les produits d'amplification sont visualisés sous rayons ultraviolets (environ 300 nm).

1.3. PCR semi-quantitative

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume de 25 µl contenant 2,5 µl d'ADNc, 5 pmoles de chaque amorce (α FO SH3 S et α FO C30 UR11 AS), 0,2 mM de chaque dNTP, 0,1 unité de *Taq* (Appligene oncor ou Gibco) et 0,5-1,5 µCi de [α -³²P]dCTP (Amersham), dans le tampon fourni avec l'enzyme. Les réactions sont réalisées dans un thermocycleur Hybaid avec 24 cycles (chaque cycle contient une étape de dénaturation de 20 secondes à 95°C, une étape d'hybridation à 61°C et une étape d'élongation de 20 secondes à 70°C pour la *Taq* Appligene ou 72°C pour la *Taq* Gibco) avec une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 2 minutes et une étape finale d'élongation de 7 minutes à 70°C ou 72°C. 2 µl de produit PCR sont mélangés avec 8 µl du tampon (EDTA 10 mM (pH 8,0), de bleu de xylène cyanol 0,1 % et bleu de bromophénol 0,1 % dans de la formamide). Après dénaturation à 100°C pendant 3 minutes, 5 µl sont chargés sur un gel dénaturant (urée 7 M, Tris 120 mM, acide borique 108 mM, EDTA 1,2 mM) d'acrylamide 6 % (Long Ranger Bioprobe). Après électrophorèse à 50 W pendant 3 heures, les produits PCR marqués sont quantifiés avec un appareil Instant Imager (Packard). Dans le calcul final du pourcentage des deux isoformes, nous avons tenu compte du fait que la quantité de [α -³²P]dCTP incorporée était différente dans chacun des deux produits PCR en raison du nombre de paires de base G+C différent.

1.4. PCR sur colonie bactérienne

Chaque colonie est prélevée à partir de la boîte d'agar à l'aide d'une pointe stérile, resuspendue dans 30 µl d'eau stérile et bouillie pendant 10 minutes. Chaque tube est ensuite placé 5 minutes dans la glace et centrifugé 5 minutes à 14 000 rpm. L'amplification par PCR est réalisée dans les conditions classiques avec 3 µl du surnageant clair.

1.5. Digestion par les enzymes de restriction

Chaque digestion enzymatique est réalisée en respectant les conditions suivantes : un maximum de 1 µg d'ADN est digéré dans un volume final de 20 µl avec un maximum de 10 unités d'enzymes. Le tampon de digestion est toujours celui fourni avec l'enzyme. Le temps de digestion (de 2 heures à une nuit) varie en fonction de l'enzyme utilisé.

1.6. Déphosphorylation

Les fragments d'ADN sont déphosphorylés par la phosphatase alcaline de crevette (USB/Amersham) dans les conditions préconisées par le fabricant.

1.7. Ligation

La ligation est réalisée avec l'enzyme T4 DNA ligase (Gibco ou Promega) dans les conditions préconisées par le fabricant.

1.8. Purification des ADN

La purification des ADN est réalisée sur des résines fixant spécifiquement l'ADN (kits commerciaux).

Les plasmides sont purifiés à partir de culture de nuit à l'aide du kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega) pour un maximum de 20 µg de plasmide, du kit Plasmid midi (Qiagen) pour un maximum de 100 µg de plasmide et du kit Plasmid maxi (Qiagen) pour un maximum de 500 µg de plasmide.

Le kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen) est utilisé pour purifier un fragment d'ADN après une PCR, une digestion par une enzyme de restriction, une déphosphorylation ou une ligation ;

Le kit *QIAEXII gel extraction* (Qiagen) est utilisé pour purifier un produit PCR ou un plasmide après électrophorèse sur gel d'agarose.

1.9. Transformation chimique de bactéries

Les souches bactériennes utilisées sont :

- DH5 α [™] (Gibco) dont le génotype est : F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* ;
- JM109 (Promega) dont le génotype est : e14⁻(McrA⁻), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *supE44*, *relA1*, Δ (lac-proAB) [F⁺ *traD36 proAB lacI^qZ Δ M15*] ;
- BMH 71-18 *mutS* (Clontech) dont le génotype est : *supE*, *thi-1*, Δ (lac-proAB), F⁺[*proAB*⁺, *lacI^qZ Δ M15*], *mutS::Tn10* ;
- *ompT*⁻ est une souche déficiente dans le gène *ompT* codant pour une protéase membranaire (aimablement fournie par Jean-Marie Clément, Institut Pasteur, Paris).

La souche *ompT*⁻ est rendue compétente par traitement au CaCl₂ selon le protocole décrit par Sambrook *et coll.* (1989). La transformation de 100 μ l de bactéries *ompT*⁻ compétentes est réalisée avec 2 μ l (1/10) du produit de ligation. Les transformations des autres souches sont réalisées selon les conditions préconisées par les fabricants, généralement 50-100 μ l de bactéries compétentes avec 2 μ l (1/10) du produit de ligation. Le mélange plasmide/bactéries est laissé pendant 30 minutes dans la glace puis le choc thermique est réalisé à 42°C pendant 90 secondes. Après ajout du SOC (qsp 1ml ; bacto-tryptone 2 %, *bacto yeast extract* 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, D-glucose 20 mM), les bactéries sont mises en culture à 37°C pendant une heure sous agitation (225 rpm). Après centrifugation pendant 5 minutes à 3 000 rpm, les bactéries sont déposées sur une boîte d'agar contenant le milieu de sélection approprié qui dépend de la nature du plasmide utilisé et de la souche bactérienne.

1.10. Séquences

Le séquençage de l'ADN a été réalisé à l'aide soit d'un séquenceur *Automated Laser Fluorescent ALF*[™] (Pharmacia Biotech), soit d'un séquenceur ABI PRISM (Perkin Elmer Applied Biosystems) ou par une société extérieure (Genome Express).

Les inserts clonés dans les vecteurs sont amplifiés par PCR en utilisant une amorce biotinylée et une amorce contenant une séquence M13 en 5' (GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA ou TTCACACA GGAAACAGCTATGACCA). Après immobilisation sur des billes magnétiques *Dynabeads M280-streptavidin* (Dyna) couplées à la streptavidine, les produits d'amplification sont dénaturés à la soude 0,1 M, puis lavés successivement dans de la soude 0,1 M, du Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 2 M et une solution Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM (pH 8,0) avant remise en suspension dans 10 μ l d'eau. Les réactions de séquence sont ensuite réalisées à l'aide du kit *AutoRead*[™] *Sequencing*

(Pharmacia Biotech) en utilisant l'amorce universelle M13 correspondante, marquée à son extrémité 5' par de la fluorescéine, dans les conditions préconisées par le fabricant.

L'appareil ABI PRISM réalise un séquençage par capillaire. L'ADN à séquencer est amplifié à l'aide d'une amorce non modifiée et du kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* (Perkin Elmer Applied Biosystems) contenant une polymérase thermostable et les quatre dideoxynucléotides, chacun étant marqué avec un chromophore différent. La séquence est effectuée directement à partir du produit amplifié précipité par une solution d'acétate de sodium 3 M et d'éthanol 95 %, lavé à l'éthanol 70 % puis repris dans une solution de séquençage.

1.11. Électrophorèse de protéines sur gel d'acrylamide

Les électrophorèses sont réalisées sur gel d'acrylamide soit en présence de SDS selon la technique décrite par Laemmli (1970), soit en présence de SDS ou en condition non dénaturante à l'aide du *Phast-System* (Pharmacia).

2. Expression de peptides recombinants dans *E. coli*

2.1. Constructions

2.1.1. Vecteurs

Les constructions réalisées permettent d'exprimer des peptides couplés soit à la Glutathion S-Transférase (GST) dans leur partie N-terminale, soit à un peptide hexahistidine (His)₆, dans leur partie C-terminale. Les peptides sont purifiés par chromatographie d'affinité sur une colonne de sépharose CL-4B/glutathion (Pharmacia) pour les peptides de fusion GST ou sur une colonne sépharose CL-6B/nickel-acide nitrilotriacétique (Ni-NTA, Qiagen) pour les peptides de fusion (His)₆.

Les plasmides utilisés pour l'expression des protéines de fusion GST sont pGEX-2T (Pharmacia) et pGEX-KG (Guan et Dixon, 1991), le second dérivant du premier. L'ADNc d'intérêt est cloné en 3' de l'ADNc de la GST. Entre les deux ADNc se trouve une séquence courte codant pour un site de clivage de la thrombine permettant de libérer la GST. Afin de faciliter le clivage de la protéine de fusion, une séquence riche en glycine a été introduite dans le plasmide pGEX-KG en 3' du site de coupure par la thrombine (Guan et Dixon, 1991).

Le vecteur utilisé pour l'expression des protéines de fusion (His)₆ est pQE-60 (Qiagen).

Ces trois vecteurs d'expression possèdent une origine de répllication bactérienne, le gène *bla* conférant la résistance à l'ampicilline et un promoteur inductible par l'iso-propyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) permettant ainsi le contrôle de l'expression des peptides de fusion.

2.1.2. Définition des peptides SH3 utilisés

Des peptides SH3 fodrine de différentes longueurs ont été exprimés et purifiés dans *E. Coli*. La Figure 7 de la page 49 représente ces différents peptides pour la fodrine. Certains peptides équivalents ont été réalisés sur la spectrine. Trois types de peptides ont été utilisés : le peptide SH3 correspondant au domaine SH3 seul (Glu₉₇₀ à Pro₁₀₂₆) ; le peptide SH3-α9 correspondant au domaine SH3 suivi de l'unité conformationnelle α9 (Asp₈₈₅ à Lys₁₀₈₉) ; le peptide SH3-α9-α10 correspondant au domaine SH3 suivi des deux unités conformationnelles α9 et α10 (Asp₈₈₅ à Ser₁₂₃₁). Les peptides reproduisant l'isoforme αIIΣ1, appelés SH3-α9(i) et SH3-α9(i)-α10 (« i » pour « insertion »), correspondent aux peptides décrits

ci-dessus avec le domaine « α II Σ 1 ». Les peptides reproduisant l'isoforme α II Σ 2, appelés SH3- α 9 et SH3- α 9- α 10, correspondent aux mêmes peptides sans l'insertion de 20 acides aminés.

2.1.3. Amorces de PCR

Peptide(s)	Amorces de PCR ^a	Vecteur
SH3- α 9(i)- α 10-(His) ₆ et SH3- α 9- α 10-(His) ₆	α FO UR9 D25 S α FO UR12 S28 AS	pQE-60
GST-SH3(i)- α 9 et GST-SH3- α 9	α FO UR9 D25 S bis α FO UR11 K28 R	pGEX-2T
GST- α rEnaC(Cterm)	α rEnaC 1846 S α rEnaC 2097 AS	pGEX-KG
GST-LMPTPA et GST-LMPTPB	hLMPTP M1 <i>EcoRI</i> hLMPTP H158 <i>XhoI</i>	pGEX-KG

^a Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 2, page 42.

Tableau 3

Couples d'amorces utilisés pour réaliser les peptides de fusion GST ou (His)₆

2.1.4. Matrice de PCR

Des ADNc totaux de granulocytes humains (aimablement fournis par Gilles HETET) ont été utilisées pour amplifier les ADNc SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ et SH3- α 9- α 10-(His)₆ (acides aminés Asp₈₈₅ à Ser₁₂₃₁). Ces constructions ont ensuite été utilisées comme matrice de PCR pour réaliser les constructions GST-SH3- α 9(i) et GST-SH3- α 9, respectivement (acides aminés Asp₈₈₅ à Lys₁₀₈₉). Pour la construction GST- α rEnaC(Cterm) contenant les 83 derniers acides aminés de α rEnaC (acides aminés Arg₆₁₆ jusqu'au codon de terminaison), des ADNc totaux de cellules de tubule collecteur de rein de rat, RCDD₁ ont été utilisés (Blot-Chaubaud *et coll.*, 1996). Pour les constructions GST-LMPTPA et GST-LMPTPB (séquence codante complète des deux isoformes de la LMPTP), une banque d'ADNc de lymphocytes T humains a été utilisée comme matrice.

2.1.5. Constructions supplémentaires

Le plasmide pGEX-2T:SH3_{fod} permet d'exprimer le peptide GST-SH3_{fod} (acides aminés Glu₉₇₀ à Pro₁₀₂₆). De même, les plasmides pGEX-2T:SH3_{spec} et pGEX-KG:SH3_{spec}- α 9 permettent d'exprimer les peptides GST-SH3_{spec} (acides aminés Glu₉₇₀ à Pro₁₀₂₆) ou GST-SH3_{spec}- α 9 (acides aminés Asp₈₉₄-Arg₁₀₈₁) fusionnés à la GST. Ces trois constructions ont été réalisées par Catherine Fournier (1998).

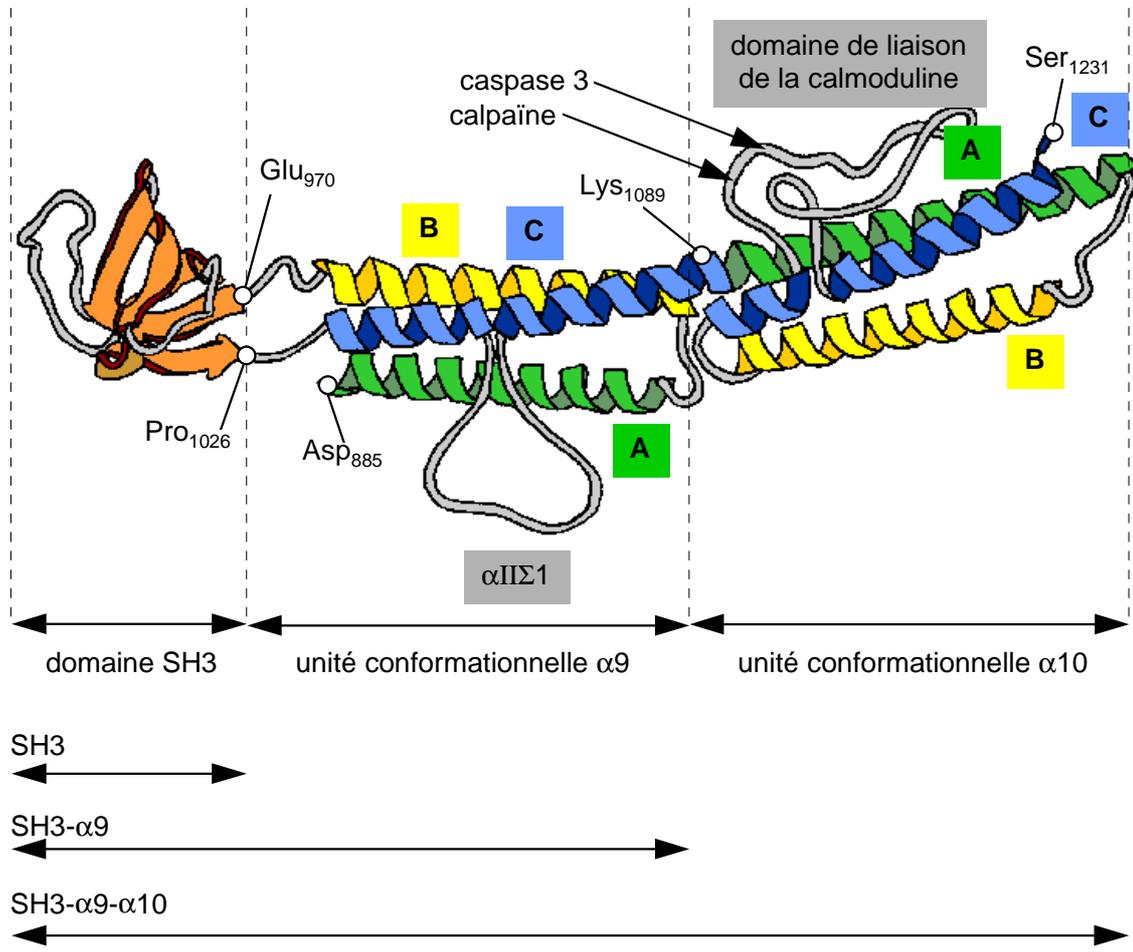


Figure 7

Nomenclature des peptides SH3 utilisés

Le schéma représente les unités conformationnelles complètes $\alpha 9$ et $\alpha 10$ avec le domaine SH3 inséré entre les hélices B et C de l'unité $\alpha 9$, le domaine de 20 acides aminés, qui caractérise l'isoforme $\alpha II\Sigma 1$, inséré dans l'hélice C de l'unité $\alpha 9$ et le domaine de liaison de la calmoduline inséré dans l'hélice C de l'unité $\alpha 10$. Les sites de coupure pour les calpaïnes et la caspase 3 situés juste en amont du domaine de liaison de la calmoduline sont indiqués par des flèches dans le schéma. Les flèches situées sous le schéma indiquent la longueur des peptides SH3 fodrine utilisés pour ce travail.

Le plasmide pGEX-KG: α II Σ 1 a été réalisé en hybridant la paire d'amorces Fod-ex Σ 1-5' et Fod-ex Σ 1-3' (5 minutes à 65°C puis 30 minutes à 30°C), ce qui permet de créer deux extrémités cohésives *Eco*RI et *Nco*I. Le produit d'hybridation a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pGEX-KG linéarisé par *Eco*RI et *Nco*I. La construction finale permet l'expression d'un peptide spécifique de l'isoforme α II Σ 1 de la fodrine humaine (acides aminés Asn₁₀₅₁ à Ser₁₀₇₅) fusionné à la GST.

2.2. Expression des protéines de fusion dans *E. coli*

Les bactéries contenant les plasmides recombinants sont conservées dans 20 % de glycérol à -40°C. La culture bactérienne obtenue après une nuit à 37°C en milieu *Terrific Broth* (pour un litre : bacto-tryptone 12 g, extrait de bacto-levure 24 g, glycérol 0,4 %, KH₂PO₄ 0,17 M et K₂HPO₄ 0,72 M) contenant 0,1 mg/ml d'ampicilline, est diluée dans le même milieu afin d'obtenir une densité optique (DO) à 600 nm de 0,2 puis remise à pousser à 37°C sous agitation. Lorsque la culture bactérienne a atteint une DO à 600 nm de 0,6-0,8, l'expression des protéines de fusion est immédiatement induite avec 0,5 à 1 mM d'IPTG et poursuivie pendant 90 minutes à 3 heures (à 30 ou 37°C) selon la nature du peptide d'intérêt. Les culots bactériens obtenus après centrifugation pendant 15 minutes à 3 800 rpm (centrifugeuse Jouan CR422) à 4°C sont conservés à -40°C.

2.3. Purification des peptides par chromatographie d'affinité

2.3.1. Chromatographie d'affinité sur colonnes de Sépharose CL-4B couplée à du glutathion

Ce protocole permet de purifier les protéines de fusion couplées à la GST. Le culot bactérien correspondant à 1 litre de culture est repris dans 50 ml de tampon de lyse PBS-Triton : phosphate 20 mM (pH 7,3), NaCl 150 mM, Triton X-100 0,5 %, β ME 1 mM, aprotinine 1 μ g/ml, leupeptine 2 μ g/ml, pepstatine 2 μ g/ml, EDTA 1 mM et phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) 0,5 mM. Après 90 secondes de sonication (SONIFIER 250 BRANSON), le lysat cellulaire est centrifugé pendant 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C (rotor JA-14, Beckman). Le surnageant contenant la protéine de fusion soluble est centrifugé une deuxième fois dans les mêmes conditions. Le deuxième surnageant est déposé à 4°C sur une colonne d'affinité Sepharose CL-4B couplée à du glutathion (Pharmacia) préalablement équilibrée avec du PBS-Triton. Après dépôt de l'échantillon, la colonne est lavée avec du PBS-Triton puis avec le tampon de digestion de la thrombine (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, CaCl₂ 2,5 mM). La digestion de la protéine est effectuée directement sur la colonne à 4°C en recyclant 50 unités de thrombine (Sigma, référence T4265) pendant 2 h 30. Le peptide clivé est élué avec une solution de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). La GST accrochée sur la colonne est ensuite éluée par une solution de glutathion

10 mM dans du Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Les protéines de fusion complètes peuvent être purifiées en les décrochant de la colonne avec la même solution de glutathion, sans faire de digestion par la thrombine.

2.3.2. Chromatographie d'affinité sur des colonnes de Ni-NTA

Ce protocole permet de purifier les protéines de fusion (His)₆. Le culot bactérien correspondant à une culture de 4 litres est soniqué dans 50 ml de tampon de lyse (PO₄ 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, Triton X-100 1 %, βME 10 mM et imidazole 10 mM) contenant des anti-protéases (leupeptine 0,5 µg/ml, pepstatine 2 µg/ml, AEBSF 0,5 µg/ml et aprotinine 1,2 µg/ml) pendant 90 secondes (SONIFIER 250 BRANSON - puissance 9 - 80 %). Après centrifugation comme précédemment, le surnageant de sonication, ajusté à pH 8,0, est chargé sur 12,5 ml de résine Ni-NTA agarose. La colonne est ensuite lavée avec le tampon de lyse puis avec une solution de 30 mM d'imidazole (PO₄ 50 mM (pH 7,3), NaCl 300 mM et βME 10 mM) afin d'éliminer les interactions non spécifiques. Le peptide d'intérêt est élué avec une solution d'imidazole 200 mM (PO₄ 50 mM (pH 7,3), NaCl 300 mM et βME 10 mM).

2.3.3. Chromatographie d'échange d'anions

Les peptides obtenus par chromatographie d'affinité sont filtrés (Dynagard 0,2 µm) et dilués afin de ramener la concentration en NaCl à 50 mM. Ils sont ensuite déposés sur une colonne échangeuse d'anions de type Resource Q (Pharmacia) préalablement équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 50 mM, βME 1 mM et EDTA 1 mM. Chaque peptide est élué de la colonne par un gradient linéaire de NaCl avec un débit de 3 ml/min.

2.4. Interaction *in vitro* de peptides recombinants

2.4.1. αENaC et le domaine SH3 de la fodrine

En raison d'une protéolyse très prononcée (Rotin *et coll.*, 1994), l'expression de la protéine de fusion GST-αEnaC(Cterm) a été réalisée dans une souche bactérienne déficiente dans le gène *ompT* codant pour une protéase membranaire, à 32°C, avec 0,5 mM d'IPTG. Après expression de la protéine de fusion GST-αEnaC(Cterm), le lysat a été préparé (à partir d'un culot correspondant à une culture de 1,1 litres) par sonication comme cela a été indiqué précédemment. La purification a été réalisée en présence de 10 µg/ml d'aprotinine, 25 µg/ml de pepstatine, 15 µg/ml d'aprotinine, 50 mM EDTA, 10 µg/ml d'inhibiteur de trypsine, 250 µg/ml AEBSF et 1 mM βME.

L'interaction a été réalisée en incubant 450 µl de billes CL-4B/glutathion sur lesquelles ont été préalablement fixées la GST seule ou la protéine de fusion GST-αEnaC(Cterm) et 180 µg de peptide

SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ ou SH3- α 9- α 10-(His)₆. L'interaction a été réalisée à 4°C pendant 2 heures dans des conditions peu stringentes : Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 230 mM. Après six lavages en Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) et NaCl 150 mM, les protéines retenues ont été analysées par SDS-PAGE.

2.4.2. LMPTPA et le domaine SH3 de la fodrine

L'interaction entre les peptides recombinants GST, GST-LMPTPA, SH3- α 9- α 10-(His)₆ ou SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ (concentration finales de 5 μ M) a été réalisée dans un tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,3) et NaCl 150 mM dans un volume finale de 50 μ l, à 4°C pendant une nuit. 20 μ l d'une suspension contenant 75 % de billes CL-4B/glutathion préalablement lavées dans le tampon d'interaction ont été ajoutés. Après interaction à 4°C pendant 30 minutes, les billes ont été collectées par centrifugation à 1 000 rpm et lavées trois fois dans le tampon d'interaction. Les protéines retenues ont été analysées par SDS-PAGE.

2.4.3. Transcription et traduction *in vitro*

Elle a été réalisée à partir d'un produit PCR et à l'aide du kit *TNT[®] quick coupled transcription/translation systems* (Promega). Les ADNc spécifiques ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces pGAD-TIV-S et pGAD-TIV-AS. L'amorce pGAD-TIV-S contient la séquence du promoteur T7 immédiatement suivie d'une séquence consensus de Kozak (Kozak, 1987). Dix bases supplémentaires ont été ajoutées en amont du promoteur T7 afin d'augmenter l'efficacité de la transcription. Les produits PCR ont été purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose avec le kit *QIAEXII gel extraction kit* (Qiagen). Les produits PCR obtenus (0,1-1 μ g) ont été transcrits et traduits avec le lysat de réticulocyte contenant l'ARN polymérase T7 livré avec le kit, en présence de [³⁵S]méthionine (32 μ Ci soit 32 nmol-Amersham) dans un volume final de 80 μ l. La protéine GST (10 μ g) ou les protéines de fusion (10 μ g) ont été préalablement mises en contact avec 50 μ l d'une suspension contenant 50 % de billes de Sépharose CL-4B couplées à du glutathion, pendant 30 minutes à température ambiante, puis lavées deux fois avec 250 μ l d'un tampon HEPES 20 mM (pH 7,9), KCl 100 mM, nonidet NP40 (0,01 % ou 0,5 %), aprotinine 10 μ g/ml, leupeptine 10 μ g/ml, pepstatine 10 μ g/ml et PMSF 1 mM et incubées avec 25 μ l du produit de traduction pendant une nuit à 4°C. Les billes ont été ensuite lavées cinq fois avec 1 ml du tampon précédant puis mises à bouillir pendant 3 minutes en présence de 2 % de SDS et 5 % de β ME. Les protéines ont été séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide 12,5 % dénaturant. Après coloration au bleu de Coomassie et décoloration à l'acide acétique 10 %, le gel a été incubé dans une solution *Entensify* permettant d'augmenter le signal radioactif (NEN[™] Life Science Products, Belgique), séché sur un papier Whatman et révélé par autoradiographie.

2.5. Étude de la digestion par les calpaïnes μ et m

Les peptides SH3- α 9- α 10-(His)₆ et SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ (2 μ M) ont été incubés en présence de 10 μ M calmoduline de cerveau de bœuf (Upstate biotechnology - référence 14-108) dans un tampon Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM (volume final de 100 μ l) en présence de 0,5 μ M ou 0,5 mM de CaCl₂ pour l'étude du clivage par la calpaïne μ (Chemicon international inc., référence AG762) ou par la calpaïne m (Chemicon international inc., référence AG764), respectivement. Après incubation à 4°C pendant une heure, l'enzyme a été ajoutée à différents rapports enzyme/substrat (de 1/50 à 1/1000). La digestion a été réalisée à 37°C pendant 30 minutes puis stoppée en ajoutant 50 μ l d'une solution contenant 5 % de SDS, 20 % de β ME et 4 mM d'EDTA et en plaçant les tubes à ébullition pendant 3 minutes. Pour la cinétique, la digestion a été réalisée à 30°C. Les différentes espèces protéiques ont été quantifiées par densitométrie avec un appareil « Ultrosan XL Enhanced Laser Densitometer » (LKB Bromma) et les données traitées avec le logiciel GelScan XL (Pharmacia).

3. Transfert des protéines sur membrane et révélation immunologique

3.1. Transfert sur membrane

Le transfert électrophorétique des protéines préalablement séparées sur gel de polyacrylamide est effectué sur membrane de polyvinylidène fluorure (Immobilon-P de chez Millipore, diamètre des pores de 0,45 µm) en utilisant un système « semi-sec ». Le transfert est réalisé avec une intensité constante de 0,8 mA/cm² de membrane pendant trois heures à température ambiante, avec un tampon anodique Tris 25 mM (pH 8,3), glycine 192 mM contenant 20 % de méthanol et un tampon cathodique Tris-glycine (pH 8,3) contenant 0,1 % de SDS.

3.2. Révélation immunologique

Après transfert, les sites libres de la membrane sont bloqués avec un tampon PBS contenant 5 % de lait écrémé et 3 % de Tween-20 pendant 1 heure à 37°C. Après trois lavages de 10 minutes avec du PBS contenant 0,05 % de Tween-20, les membranes sont incubées pendant une nuit à 4°C sous une agitation douce avec l'antisérum ou les IgG purifiées dilués dans du PBS-0,05 % Tween contenant 5 % de lait écrémé. La membrane est encore lavée trois fois avec du PBS-0,05 % Tween pendant 10 minutes et incubée pendant une heure à température ambiante, à l'obscurité et avec une légère agitation, avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase dilués (anticorps de chèvre anti-lapin au 1/20 000 et ou anticorps de lapin anti-souris au 1/10 000) dans du PBS-0,05 % Tween contenant 5 % de lait écrémé. Après six derniers lavages de 10 minutes en PBS-0,05 % Tween, les anticorps fixés sont révélés par chimioluminescence (ECL) en utilisant le *SuperSignal[®] Substrate* (Pierce).

3.3. Sérum et anticorps

Les anticorps utilisés sont les suivants :

- le sérum (lapin) anti-fodrine (aimablement fourni par Blandine Geny, INSERM U-332, ICGM, Paris) a été utilisé au 1/10 000 ;

- les anticorps (lapin) anti-SH3 fodrine (Eurogentec, Ougrée, Belgique) reconnaissent la protéine de fusion GST-SH3_{fod} précédemment décrite. Ces anticorps ont été purifiés sur colonne d'affinité comme cela est indiqué plus loin. Les anticorps purifiés ont d'abord été dilués au 1/100 en raison du titre très élevé, puis utilisés au 1/10 000 -1/50 000 ;
- le sérum (lapin) anti- α ENaC (aimablement fourni par Nicolette Farman, INSERM U-426, Paris) reconnaît les 76 premiers acides aminés de la sous-unité α du canal à sodium du rat sensible à l'amiloride. Il a été utilisé au 1/5 000 ;
- les anticorps monoclonaux anti-lexA (Clontech/Ozyme) ont été utilisés au 1/2 000 (0,1 μ g/ml) ;
- l'anticorps monoclonal (souris) M2 anti-FLAG[®] (Integra Bioscience/Kodak) a été utilisé au 1/290 (10 μ g/ml).

3.4. Purification des anticorps anti-SH3 fodrine

Un total de 4 mg de peptide SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ purifié par chromatographie d'affinité puis par chromatographie échangeuse d'anions est couplé sur une colonne d'affinité HiTrap[®] (Pharmacia) selon le protocole préconisé par le fournisseur. Un total de 20 ml du sérum de lapin immunisé avec la protéine de fusion GST-SH3_{fod} est passé trois fois sur la colonne avec un débit d'une goutte par seconde. Les anticorps retenus spécifiquement sont élués avec une solution de glycine 50 mM (pH 2,5), NaCl 150 mM. Chaque fraction élue est immédiatement mélangée dans une solution de Tris-HCl 1 M (pH 9,0) afin de ne pas maintenir les anticorps trop longtemps à pH acide. Finalement, les anticorps sont congelés à -20°C avec 1 % de SAB après dilution au 1/100. Les anticorps anti-SH3 fodrine purifiés par cette technique ont un titre très élevé.

4. Obtention d'une lignée stable exprimant le domaine SH3 de la fodrine

4.1. Lignées cellulaires

COS-7 est une lignée de fibroblaste de singe vert d'Afrique transformée avec un virus SV40 incapable de se répliquer mais exprimant toujours l'antigène grand T.

RCCD₁ est une lignée de canal collecteur de rein de rat immortalisée avec le virus SV40 sauvage (Blot-Chabaud *et coll.*, 1996).

4.2. Culture des cellules

Les flasques et les boîtes de culture pour les cellules RCCD₁ ont été recouvertes avec une solution de 40-60 µg/ml de collagène de type I (Institut Jacques Boy) dans 60 % d'éthanol puis gardées ouvertes stérilement jusqu'à évaporation complète de la solution. Les cellules RCCD₁ ont été cultivées dans le milieu défini (MD) suivant : mélange nutritif Ham F12 (Gibco) :milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Gibco) 1 :1, NaHCO₃ 14 mM, glutamine 2 mM, transferrine 5 µg/ml (Sigma), insuline 5 µg/ml (Sigma), EGF 10 µg/ml (Sigma), triiodothyronine 5x10⁻⁸ M (Sigma), pénicilline-streptomycine 10 unités/ml, HEPES 20 mM (pH 7,4) et du sérum de veau foetal (SVF) 2 % (Gibco). Le milieu de culture est changé tous les deux ou trois jours. Chaque semaine, les cellules sont détachées de la boîte par digestion ménagée à la trypsine (Gibco) pendant 1 heure à 37°C, filtrées (filtre en nylon avec des pores de 40 µm, Polylabo) etensemencées dans une nouvelle boîte à environ 100 000 cellules/ml.

Les cellules COS-7 sont cultivées dans le milieu Dulbecco modifié selon Eagle supplémenté avec 10 % de SVF.

4.3. Réalisation de la construction pour la transfection

Nous avons utilisé le vecteur pcDNA3 (Invitrogen). Il contient le gène *amp* conférant la résistance à l'ampicilline, des sites multiple de clonages, une origine de répllication bactérienne, une origine de répllication SV40 et le gène *neo* conférant la résistance au G418. L'ADNc est cloné en aval du promoteur du

gène précoce du cytomégalo virus (CMV) humain, ce qui permet l'expression constitutive de la protéine d'intérêt dans les cellules COS-7 ou RCCD₁.

L'ADNc codant pour l'unité conformationnelle complète $\alpha 9$ de la fodrine incluant son domaine SH3 (Figure 7, page 49, peptide SH3- $\alpha 9$) a été amplifié par PCR avec les amorces SH3 kozak-5' et SH3 flag-3' (Tableau 2, page 42). L'amorce SH3 kozak-5' contient une séquence consensus de Kozak (1987) indispensable pour permettre la traduction de la protéine. L'amorce SH3 flag-3' contient un épitope FLAG[®] (DYKDDDDK). La matrice de PCR utilisée est le plasmide pQE60:SH3- $\alpha 9$ - $\alpha 10$ -(His)₆ précédemment décrit. Le produit PCR a été cloné dans le plasmide pcDNA3 aux sites *Bam*HI et *Eco*RI. Le plasmide résultant est pcDNA3:SH3- $\alpha 9$ -FLAG.

4.4. Transfection transitoire des cellules COS-7

La transfection a été réalisée sur des cellules confluentes à 70-80 % avec la Lipofectamine[™] (Gibco) et 6 μ g de plasmide pcDNA3:SH3- $\alpha 9$ -FLAG selon le protocole préconisé par le fournisseur.

4.5. Transfection stable des cellules RCCD₁

Les cellules RCCD₁ ont été transfectées avec 6 μ g de plasmide pcDNA3:SH3- $\alpha 9$ -FLAG linéarisé par *Dra*III selon le même protocole que celui utilisé pour la transfection transitoire des cellules COS-7. Après 5 heures d'incubation dans le milieu de transfection, les cellules ont été placées dans du MD contenant 2 % de SVF. 24 heures plus tard, les cellules transfectées ont été sélectionnées avec 0,2 mg/ml de G418 (Gibco) pendant 4 jours puis 0,4 mg/ml de G418. Après 4 jours supplémentaires de culture, les cellules ont été trypsinées etensemencées dans de nouvelles boîtes de manière à pouvoir isoler des clones indépendants. Au total, 26 clones ont été isolés à l'aide d'anneaux de verre stériles et de vaseline. Au bout de deux semaines de culture, la concentration de G418 a été diminuée à 0,2 mg/ml.

4.6. Congélation des cellules

Les différents clones isolés ont été congelés lentement à -80°C dans une solution de (MD, SVF 2 %) 50 %, DMSO 10 % et SVF 40 % puis conservées dans l'azote liquide.

4.7. Mesure de la résistance transépithéliale (R_T)

Les cellules (0,7 ml) ont étéensemencées à une concentration de 2×10^6 /ml sur un filtre (pore de 0,4 μ m) Transwell (Costar) recouvert de collagène comme précédemment indiqué. Les cellules ont été cultivées

dans un milieu MD contenant 2 % de SVF avec (cellules L5) ou sans (cellules RCCD1) G418 0,2 mg/ml. La R_T a été mesurée à l'aide d'un appareil *WPI epithelial volt-ohm meter* (World Precision Instruments, New Haven, CT, USA) connecté à deux électrodes stérilisées à l'éthanol.

4.8. Immunoprécipitation SH3/ α rENaC

Une à deux boîtes de diamètre 100 mm de cellules RCCD₁ non transfectées ou surexprimant le domaine SH3 de la fodrine (clone L5) ont été lysées dans le tampon précédemment décrit par Rotin *et coll.* (1994). Ce tampon contient : HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, glycérol 10 %, Triton X-100 1 %, aprotinine 10 µg/ml, leupeptine 10 µg/ml, pepstatine 10 µg/ml, inhibiteur de trypsine 10 µg/ml et PMSF 1 mM. La lyse a été réalisée en ajoutant 150 µl de tampon pour chaque culot de cellules correspondant à une boîte de culture (5-10 x 10⁶ de cellules), en agitant vigoureusement pendant une minute. Le lysat a été conservé dans la glace pendant 20-30 minutes puis centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 minutes (4°C) deux fois. Une fraction du lysat de départ (1/3) a été incubée dans le tampon d'électrophorèse et bouilli pendant 3 minutes. Le culot insoluble collecté après la première centrifugation du lysat a été repris dans une solution Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), MgCl₂ 100 mM, SDS 4 %, glycérol 10 %, β ME 5 %, bleu de bromophénol 0,01 % afin de solubiliser une partie des protéines, puis incubé à 100°C pendant 3 minutes. La solution d'anticorps anti-FLAG couplés aux billes de sépharose (Kodak) a été ajoutée dans les 2/3 restants du lysat clair (60 µg d'anticorps pour 100 µl de lysat). Le mélange a été incubé à 4°C pendant 4 heures et mélangé par rotation. Les billes de sépharose/anticorps ont été collectées par centrifugation légère (4°C) et lavées trois fois avec le tampon de lyse. Le culot de billes a été ensuite mélangé au tampon d'électrophorèse et bouilli pendant 3 minutes. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (gel acrylamide 5-15 %). La révélation de la fodrine et du peptide SH3 surexprimé a été réalisé par immunotransfert avec des anticorps anti-SH3 fodrine purifiés (1/1 000 000) comme précédemment décrit. La membrane a été ensuite traitée en Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, SDS 2 % et β ME 100 mM à 60°C pendant 30-40 minutes pour décrocher les anticorps anti-SH3 fodrine puis la protéine α rENaC a été révélée par immunotransfert avec un sérum de lapin anti- α rENaC précédemment décrit (1/5 000).

4.9. Immunolocalisation du peptide SH3- α 9-FLAG

Les cellules RCCD₁ ont été cultivées sur des lamelles en verre préalablement stérilisées. Après lavage dans une solution de Dulbecco tamponnée au phosphate (PBS, Gibco), les cellules ont été fixées dans du PBS (pH 7,4) contenant 2 % de paraformaldéhyde pendant 15 minutes. Après deux nouveaux lavages dans du PBS (pH 7,4) pendant 5 minutes, les lamelles ont été incubées dans une solution de PBS (pH

7,4) contenant 50 mM de NH_4Cl . Les lamelles ont été lavées deux fois dans du PBS (pH 7,4) pendant 5 minutes puis les cellules ont été perméabilisées avec une solution de PBS (pH 7,4) contenant 0,075 % de saponine (PBS/saponine) pendant 30 minutes. Afin de diminuer le signal non spécifique, les lamelles ont été incubées pendant 10 minutes dans du PBS/saponine contenant 2 % de SAB. Après incubation avec l'anticorps primaire anti-FLAG (1/250) pendant 30 minutes, les lamelles ont été lavées deux fois avec du PBS/saponine contenant 2 % de SAB puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris FITC (1/250) pendant 30 minutes, lavées deux fois dans du PBS/saponine/SAB 2 % et incubées dans du PBS contenant 100 mg/ml de 1,4-diazotricyclo-(2,2,2)octane pendant 5 minutes. Après un dernier lavage en PBS (pH 7,4), les lamelles ont été montées sur lame dans une mince goutte de glycerol. Après polymérisation du glycerol à 4°C pendant quelques minutes, les lames ont été observées à l'aide d'un microscope confocal (488 nm).

5. Le système du double-hybride

5.1. Établissement des différentes constructions

5.1.1. Les appâts

Nous avons utilisé le vecteur pLex10. Celui-ci contient :

1. le marqueur de sélection *TRP1*, un gène codant pour une enzyme du métabolisme du tryptophane, conférant la prototrophie au tryptophane ;
2. la séquence codante pour la protéine bactérienne complète LexA capable de lier l'ADN au niveau des opérateurs *lexA* (Brent et Ptashne, 1981) sous le contrôle d'un promoteur constitutif faible. L'ADNc appât est cloné en aval de cette séquence, ce qui permet l'expression d'une protéine hybride LexA-appât.

5.1.2. Les ligands

Nous avons utilisé le vecteur pGAD3S2X. Il contient :

1. le marqueur de sélection *LEU2*, un gène codant pour une enzyme du métabolisme de la leucine, conférant la prototrophie à la leucine ;
2. la séquence codante pour le domaine de transactivation de la protéine de levure GAL4 (GAL4DA) sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort. L'ADNc ligand est cloné en aval de cette séquence, ce qui permet l'expression d'une protéine hybride GAL4DA-ligand.

En outre, les vecteurs pLex10 et pGAD3S2X contiennent :

1. les sites de clonage ;
2. des séquences permettant la réplication du plasmide dans la bactérie ou dans la levure ;
3. le gène *amp* conférant la résistance à l'ampicilline.

Les ADNc codant pour le domaine SH3 de la fodrine (acides aminés Glu₉₇₀ à Pro₁₀₂₆) ou de la spectrine (acides aminés Gln₉₈₀ à His₁₀₃₆) ont été clonés en fusion avec LexA dans le plasmide pLex10 (Fournier, 1998). Les ADNc codant pour la protéine complète POP101 « *plenty-of-prolines-101* » (Vayssiere et Camonis, 1998, résultats non publiés - numéro d'accèsion GenBank : 3153821) et la protéine de levure Scd2 ont été clonés en fusion avec GAL4DA dans le plasmide pGAD3S2X.

Les vecteurs pLex10, pLex10:Scd2, pGAD3S2X et pGAD3S2X:POP101 nous ont été gracieusement fournis par Jacques Camonis (INSERM U-248, Institut Curie, Paris).

Le système double-hybride étant basé exclusivement sur la reconstitution d'un facteur de transcription, le test d'activation transcriptionnelle des deux gènes rapporteurs *HIS3* et *lacZ* nécessite une localisation nucléaire des deux protéines hybrides.

Amorce	Séquence (5'→3')	Site de restriction	Position sur l'ADNc ^a
rLMPTP-M1-S	<u>C</u> ATG GCA GAG GTT GGG TCC	aucun	-1 ^b
rLMPTP-H158-R	<u>G</u> TG AGT CTT CTC CAG GAA GGC C	aucun	474 ^c
hLMPTP-Q33-S	GGG GGA ATT CAA AAC ATC TCA GAG AAT TGG AG	<i>EcoRI</i>	99 ^b
hLMPTPA-T78-R	G GGG CTC GAG TCA <u>G</u> GT AAT CTG CCG GGC AAC	<i>XhoI</i>	237 ^c
hLMPTP-M1 <i>EcoRI</i>	G GGG GGA ATT <u>C</u> AG ATG GCG GAA CAG GCT ACC	<i>EcoRI</i>	-2 ^b
hLMPTP-H158 <i>XhoI</i>	G GGG GCT CGA <u>G</u> CC TCA GTG GGC CTT CTC CAA G	<i>XhoI</i>	480 ^c
re3B1-818S	<u>A</u> C AGT GGG AGC AGC AGC ATT G	aucun	737 ^b
re3B1-1189R	<u>C</u> ATC TGG TGG AGG AGG TGG TG	aucun	1111 ^c
re3B1-1474R	<u>I</u> CC CAG GGA AGA GTC CAG TTA CT	aucun	1397 ^c
pGAD793-S	CGA TGA TGA AGA TAC CCC ACC	aucun	plasmide ^b
pGAD793-M13S	T TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA CGA TGA TG A AGA TAC CCC ACC	aucun	plasmide ^b
promT7-AS	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA	aucun	plasmide ^c
pGAD-TIV-S	CC GGA TCC CCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG A CC ACC ATG GGG ATG CCA AAA AAA GAG ATC CTA G AA CTA GTC G	aucun	plasmide ^b
pGAD-TIV-AS	G GGA CCG GGC CTC TAG ACA CTA	aucun	plasmide ^c

^a La position sur l'ADNc correspond à la première base 5' de l'amorce qui hybride cet ADNc. Cette base est soulignée pour chaque amorce et ne correspond pas forcément à la première base de l'amorce lorsque celle-ci contient un site de restriction ou n'importe quelle autre séquence supplémentaire. Dans tous les cas, la base n°1 correspond à la première base du codon d'initiation. La séquence de l'ADNc de la LMPTP humaine (numéro d'accès GenBank M83653) provient de Bryson et coll. (1995). Les séquences des ADNc codants pour les protéines LMPTP (GenBank AF171072) ou e3B1 (isoforme 2) proviennent des séquences réalisées au laboratoire. Les sites de restriction utilisés sont indiqués en rouge.

^b Sens

^c Antisens

Tableau 4

Description des amorces utilisées.

5.1.3. Amplification des ADNc par PCR

Peptides	Amorces de PCR ^a	Vecteur
GAL4DA-hLMPTPA ₁₋₁₅₇ et GAL4DA-hLMPTPB ₁₋₁₅₇	hLMPTP-M1 <i>EcoRI</i> hLMPTP-H158 <i>XhoI</i>	pGAD3S2X
GAL4DA-hLMPTPA ₁₋₇₈	pGAD793-S hLMPTPA-T78-R	pGAD3S2X
GAL4DA-hLMPTPA ₃₃₋₇₈	hLMPTP-Q33-S hLMPTPA-T78-R	pGAD3S2X
GAL4DA-hLMPTPA ₃₃₋₁₅₇	hLMPTP-Q33-S promT7-AS	pGAD3S2X

^a Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 4, page 61.

Tableau 5

Couples d'amorces utilisés pour les constructions LMPTP dans le vecteur pGAD3S2X

5.1.4. Matrice pour la PCR

Pour les constructions pGAD3S2X:hLMPTPA₁₋₁₅₇ et pGAD3S2X:hLMPTPB₁₋₁₅₇, nous avons utilisé une banque d'expression d'ADNc de lymphocyte T humain (Jurkat) clonée dans le vecteur pGAD3S2X (gracieusement fournie par Jacques Camonis, INSERM U-248, Institut Curie, Paris). Pour les trois autres constructions, nous avons utilisé un plasmide pGAD3S2X contenant la séquence codante complète de la LMPTPA humaine (Fournier, 1998).

5.2. Culture et transformation des levures

5.2.1. Souches de levure

Les deux souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisées présentent les génotypes suivants :

- L40 : *MATa his3-Δ200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 lys2-801am LYS2::(lexAop)₄-HIS3 URA3::(lexAop)₈-lacZ GAL4* (Vojtek *et coll*, 1993) ;
- AMR70 : *MATα his3 trp1 leu2 ade2 lys2 ura3::(URA3, lexAop-lacZ) gal80* (R. Sternglanz, Stony Brook).

Ces deux souches sont auxotrophes pour l'histidine, le tryptophane, la leucine, l'uracile et l'adénine, et n'expriment pas l'enzyme β-galactosidase. La souche AMR70 est également auxotrophe pour la lysine.

Dans ces deux souches, les opérateurs *lexA* (*lexAop*) d'origine bactérienne, sont intégrés en amont du promoteur minimal contrôlant l'expression des gènes rapporteurs :

1. *HIS3*, codant pour une enzyme du métabolisme de l'histidine et conférant la prototrophie à l'histidine ;
2. *lacZ*, codant pour la β-galactosidase.

5.2.2. Milieu de culture

Deux types de milieu ont été utilisés :

1. l'un est un milieu complet (YPDA) et permet la croissance de n'importe quelle souche de levure sans aucune sélection. Il est composé de bacto-levure 1 % (Gibco), bacto-peptone 2 % (Gibco), D-glucose 2 % (Difco) et adénine sulfate 0,004 % (Sigma) ;
2. l'autre est un milieu sélectif dont la composition en acides aminés varie en fonction de la pression de sélection à exercer. Le milieu de base est composé de base azotée de bacto-levure sans acide aminé 0,67 % (Difco), de D-glucose 2 % (Difco) et du mélange *drop-out* (DO) 0,2 %.

Le mélange *drop-out* correspond à la combinaison des éléments suivants moins le ou les acides aminés appropriés pour la pression de sélection : alanine, arginine, asparagine, acide aspartique, cystéine, glutamine, acide glutamique, glycine, histidine, inositol, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine, uracile et valine à 76 mg/l (concentration finale) ; l'adénine à 19 mg/l ; l'acide *para*-aminobenzoïque à 7,6 mg/l et la leucine à 380 mg/l. Tous ces nutriments proviennent de chez Sigma. Par la suite, on appellera DO-W : un milieu sans tryptophane ; DO-L : un milieu sans leucine ; DO-WL : un milieu sans tryptophane ni leucine ; DO-WLH : un milieu sans tryptophane, leucine, ni histidine.

La culture des levures en milieu solide s'effectue sur ces différents milieux en présence de bacto-agar 2 % (Difco). Afin d'éviter les contaminations bactériennes, chaque milieu contient de l'ampicilline 100 µg/ml et de la tétracycline 20 µg/ml.

5.2.3. Transformation des levures

Les levures sont mises en culture dans 10 ml de YPDA pendant une nuit, sous agitation vigoureuse (250 rpm), à 30°C. Après comptage sur cellule de Malassez (Poly Labo, Paul Block et Cie), la culture de nuit est diluée (environ 1/10) de manière à avoir 5×10^6 cellules/ml dans 100 ml de YPDA et laissée sous agitation à 30°C jusqu'à ce que le nombre de cellules soit compris entre 2 et 6×10^7 cellules/ml (environ 3 heures). Les levures sont centrifugées pendant 5 minutes à 3 500 rpm, lavées dans 50 ml d'eau distillée, centrifugées pendant 5 minutes à 3 500 rpm et lavées dans 50 ml de la solution Li/TE (acétate de lithium 0,1 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM). Après centrifugation pendant 5 minutes à 3 500 rpm, les levures sont rendues compétentes par incubation dans 2 ml de Li/TE, pendant 30 minutes à 30°C sous agitation (250 rpm).

Les levures compétentes (150 µl) sont transformées avec 1 à 2 µg de plasmide (volume maximum de 15 µl). 500 µl de PEG₃₃₅₀ à 50 % dans une solution de Li/TE sont ajoutés au mélange de plasmide et de levure, incubés sans agitation à 30°C pendant 30 minutes puis à 42°C pendant 30 minutes. Après deux lavages par 1 ml de YPDA, les levures sont remises en suspension dans 100 µl de YPDA et étalées sur le milieu de sélection. Les colonies apparaissent au bout de 48 à 72 heures d'incubation à 30°C.

5.2.4. Préparation d'extraits protéiques de levure

Le culot correspondant à $1-2 \times 10^8$ levures est lavé dans 1 ml d'eau stérile, congelé à sec dans l'azote liquide puis repris dans 300 μ l de tampon d'échantillon (Tris-HCl 120 mM (pH 6,8), SDS 4 %, DTT 200 mM, glycérol 20 %, bleu de bromophénol 0,002 %). Après décongélation du culot, environ 400 μ l de billes de verre de 0,45-0,5 mm de diamètre (Eppler) sont ajoutés au mélange qui est ensuite mélangé très vigoureusement pendant 30 secondes et bouilli pendant 3 minutes pour casser la paroi. Ces deux dernières étapes sont répétées 4 fois. Après centrifugation à 14 000 rpm pendant 15 minutes, les protéines correspondant à 15 μ l du surnageant sont séparées par SDS-PAGE. Le reste du surnageant est conservé à -80°C.

5.3. Test d'interaction protéique par conjugaison

La conjugaison entre deux souches de levure nécessite qu'elles soient de type sexuel (*mating type* ou *MAT*) différent (a ou α). Pour cela, nous utilisons les souches L40 (*MAT_a*) et AMR70 (*MAT α*). La souche AMR70 est transformée avec les plasmides pLex10 exprimant les différents appâts et étalée sur des boîtes DO-W (Figure 8a, page 65). La souche L40 est transformée avec les plasmides pGAD3S2X exprimant les différents ligands et étalée sur des boîtes DO-L (Figure 8a). Après 72 heures d'incubation à 30°C, les colonies sont étalées, à l'aide d'une pointe, sous la forme de lignes sur de nouvelles boîtes DO-W (A1, A2 et A3 - Figure 8b) pour la souche AMR70 ou DO-L (L1, L2 et L3 - Figure 8b) pour la souche L40, et remises à croître 72 heures à 30°C. Une boîte de chaque souche est répliquée sous la forme d'un quadrillage sur une seule et même boîte de milieu riche YPDA. L'absence de pression de sélection favorise la formation des diploïdes à l'endroit où les lignes se croisent, c'est-à-dire là où peuvent se rencontrer les levures de type sexuel opposé (Figure 8c). Après 8 heures à 30°C, les colonies sont répliquées à l'aide d'un velours sur trois boîtes : la première boîte (DO-WL) contenant un papier Whatman 40 sur lequel sera mesurée l'activité β -galactosidase pour la sélection des diploïdes positifs pour l'expression du gène rapporteur *lacZ*. La deuxième boîte (DO-WLH) permet de détecter les clones positifs pour l'expression du gène rapporteur *HIS3*, et la dernière boîte (DO-WL) permet de s'assurer que l'absence de colonies sur boîtes DO-WLH n'est pas due à un problème dans la réplique des boîtes (Figure 8d).

Le test de conjugaison peut également être réalisé en introduisant les plasmides pLex10:appât dans la souche L40 et les plasmides pGAD3S2X:ligand dans la souche AMR70.

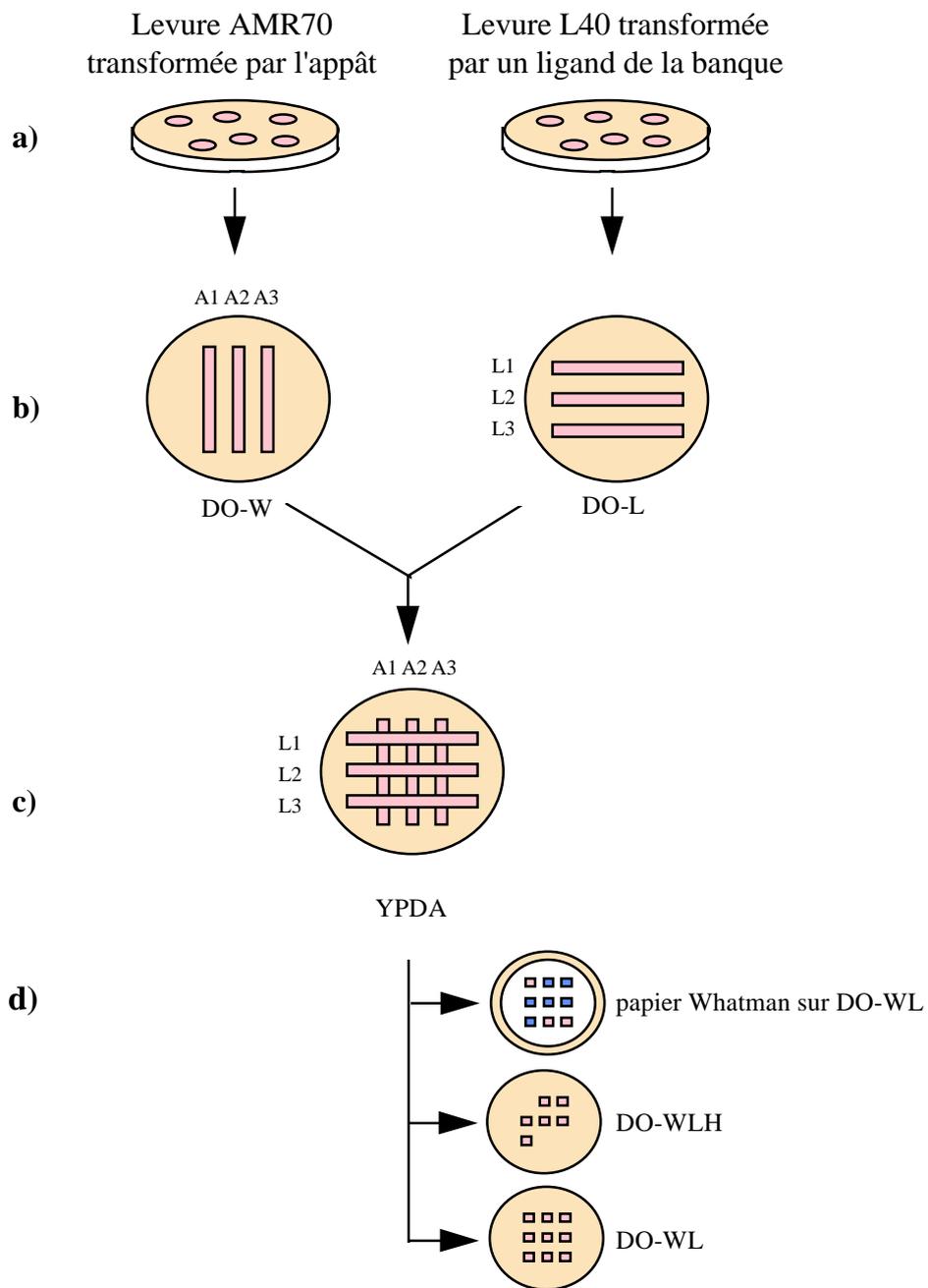


Figure 8

Test d'interaction par conjugaison

Deux souches de levure de type sexuel opposé ont été utilisées : L40 et AMR70. La souche L40 a été transformée par différents ligands et étalée sur boîtes DO-L tandis que la souche AMR70 a été transformée par différents appâts et étalée sur boîtes DO-L. Les différentes étapes du test d'interaction par conjugaison sont résumées dans le texte.

5.4. Tests β -galactosidase

L'activité β -galactosidase a été mesurée selon trois méthodes. La première est réalisée sur filtre, la deuxième directement sur les boîtes de culture. Elles permettent d'apprécier de manière qualitative l'expression du gène *lacZ*, en présence de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal). La troisième est réalisée sur une culture liquide en présence de l'ortho-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG), ce qui permet de quantifier l'expression du gène *lacZ*. La sensibilité des trois tests β -galactosidase est la suivante (du moins sensible au plus sensible) :

Test sur boîte de culture (X-gal) < Test liquide (ONPG) < Test sur filtre (X-gal)

5.4.1. Test β -galactosidase sur filtre

Les colonies étalées sur milieu sélectif et incubées à 30°C pendant 72 heures sont répliquées par velours sur un disque de papier Whatman 40 posé sur une boîte de milieu sélectif. Après 72 heures, le disque est retiré de la boîte de Pétri et immergé dans l'azote liquide pendant 15 secondes, les colonies de levure étant situées sur la face supérieure du disque. Il est ensuite placé sur un autre disque (Whatman 3), préalablement imbibé avec le tampon Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM (pH 7,0), KCl 10 mM et MgSO_4 1 mM), contenant du β ME 50 mM et du X-gal 0,2 mg/ml (Boehringer), les levures étant toujours situées sur la face supérieure du disque. Les colonies exprimant la β -galactosidase développent une coloration bleue après 2 à 16 heures d'incubation à 30°C. La réaction est stoppée par addition de 1 ml de NaCO_3 1M. Ce test, dépendant à la fois du nombre de cellules transférées sur le filtre et de leur lyse dans l'azote liquide, est difficilement reproductible. Afin d'apprécier la reproductibilité du test, nous avons systématiquement utilisé le même contrôle positif dans nos expériences, à savoir l'interaction entre les protéines hybrides LexA-SH3_{spec} et GAL4DA-POP101.

5.4.2. Test β -galactosidase sur boîte de culture

Ce protocole est dérivé de celui décrit par Duttweiler (1996). Les colonies de levures s'étant développées pendant trois jours à 30°C sur une boîte de DO-WL ou DO-WLH (14 cm de diamètre) sont immergées pendant 5 minutes dans du chloroforme afin de perméabiliser la paroi des levures. Après élimination du surnageant et un lavage au chloroforme, les colonies perméabilisées sont mises à sécher sous une hotte pendant 5 minutes, en retournant les boîtes. 30 ml d'une solution de tampon Z contenant 1 % d'agarose NuSieve® GTG® (Tebu/FMC) sont chauffés à 65°C de manière à faire fondre l'agarose. Après refroidissement de la température à environ 42°C, le X-gal est ajouté à une concentration finale de 0,2 mg/ml. La solution est ensuite coulée sur

la boîte de manière à recouvrir toutes les levures et les boîtes sont incubées à 30°C, à l'envers pendant 24 heures. Ce test est plus reproductible que le test β -galactosidase sur filtre.

5.4.3. Test β -galactosidase liquide

Ce test permet de quantifier l'expression du gène rapporteur *lacZ*. Les levures diploïdes contenant les vecteurs pLex10:appât et pGAD3S2X:ligand sont isolées à partir des boîtes DO-WL sans uracile (DO-WLU) à l'aide d'une pointe et mis en préculture dans 1 ml de milieu DO-WLU liquide, à 30°C pendant une nuit sous agitation vigoureuse (250 rpm). 40 μ l de la préculture sont remis en culture dans 4 ml de milieu DO-WLU à 30°C pendant une seconde nuit. 1 ml de cette culture est centrifugé pendant 10 minutes à 4 000 rpm (20°C). Le culot obtenu est remis en suspension dans 500 μ l de tampon Z contenant 50 mM de β ME. Après ajout de 25 μ l de chloroforme, la suspension est mélangée vigoureusement pendant 15 secondes et incubée pendant 10 minutes à 30°C. L'activité β -galactosidase est révélée par hydrolyse du substrat ONPG produisant un produit coloré jaune, l'ortho-nitrophénol. La solution d'ONPG est préparée extemporanément : 4 mg du substrat sont dissous dans 1 ml d'eau distillée. 100 μ l de cette solution sont ajoutés sur le lysat de levure. La réaction est effectuée à 30°C jusqu'à l'apparition de la coloration jaune (entre quelques secondes et plusieurs minutes). La réaction est arrêtée en ajoutant 250 μ l de carbonate de sodium 1M et en plaçant les tubes à 4°C. Après centrifugation pendant 10 minutes à 10 000 rpm et à 4°C, la DO du surnageant est lue à 420 nm en réglant le zéro avec un tube contenant tous les réactifs sauf le lysat de levure. La quantité de levures utilisée pour faire le test est évaluée en lisant la DO à 600 nm de la culture de nuit diluée au 1/5. Pour chaque échantillon, le nombre d'unités β -galactosidase est rapportée à un nombre constant de levures (correspondant à 1 ml de culture dans un milieu DO-WLU dont la mesure de la DO à 600 nm est égale à 1) et à 1 minute. Une unité de β -galactosidase est définie arbitrairement comme la quantité d'enzyme hydrolysant 1 μ mole d'ONPG en une minute à 30°C. Le calcul du nombre d'unités β -galactosidase est réalisé d'après Miller (1972) : $[DO_{420nm} \times 1\ 000] / [durée \text{ (en min)} \times DO_{600nm}]$. Notons que ce calcul ne tient pas compte du coefficient d'absorption de l'ortho-nitrophénol ($\epsilon = 21\ 300\ M^{-1}\ cm^{-1}$).

5.5. Criblage d'une banque d'expression d'ADNc de rein de rat

5.5.1. Banque

Elle a été réalisée, au laboratoire, par Laurence Malbert-Colas dans le cadre de son DEA. Elle est composée de $2,7 \times 10^6$ clones bactériens indépendants avec une taille moyenne pour chaque ADNc d'environ 1250 pb. Les ADNc ont été sous-clonés dans le vecteur pGAD3S2X aux sites de restriction *EcoRI* et *XhoI*.

5.5.2. Réalisation du criblage

La souche de levure L40 préalablement transformée avec le plasmide pLex10:SH3_{fod} est mise en culture dans 25 ml de DO-W liquide, pendant une nuit, à 30°C sous agitation vigoureuse (250 rpm). Les cellules sont ensuite diluées dans 250 ml de milieu DO-W de manière à obtenir 5×10^6 cellules/ml, puis incubées pendant 3 heures à 30°C jusqu'à obtention d'une concentration de $7,7 \times 10^7$ cellules/ml. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 4 000 rpm, à température ambiante et lavées dans 100 ml d'eau distillée, puis dans 50 ml de Li/TE. Le culot de levures est repris dans 10 ml de Li/TE et incubé sous agitation pendant une heure à 30°C. Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans 2 ml de Li/TE et incubées en présence de 100 µg de plasmides pGAD3S2X contenant les ADNc de la banque de rein de rat et 20 ml de PEG₃₃₅₀ 40 % dans du Li/TE pendant une heure à 30°C, sous agitation vigoureuse. La suspension est ensuite chauffée à 42°C pendant 30 minutes, centrifugée pendant 5 minutes à 3 000 rpm et lavée deux fois dans 20 ml de YPDA. Finalement, le culot de cellules est resuspendu dans 2 ml d'un mélange YPDA:DO-WL (1:1). Plusieurs dilutions de cette suspension sont étalées sur des boîtes de DO-WL afin de déterminer l'efficacité de la transformation en comptant le nombre de levures Leu⁺ Trp⁺. Le reste de la suspension est étalé sur 22 boîtes (diamètre 14 cm) de DO-WLH afin de sélectionner les levures Leu⁺ Trp⁺ His⁺. Tous les clones Leu⁺ Trp⁺ His⁺ ont été isolés et repiqués sur de nouvelles boîtes DO-WLH. L'expression du deuxième gène rapporteur *lacZ* a été réalisée à l'aide d'un test β-galactosidase sur filtre comme décrit précédemment.

5.6. Analyse des clones Leu⁺ Trp⁺ His⁺ LacZ⁺

5.6.1. Purification des plasmides de levure

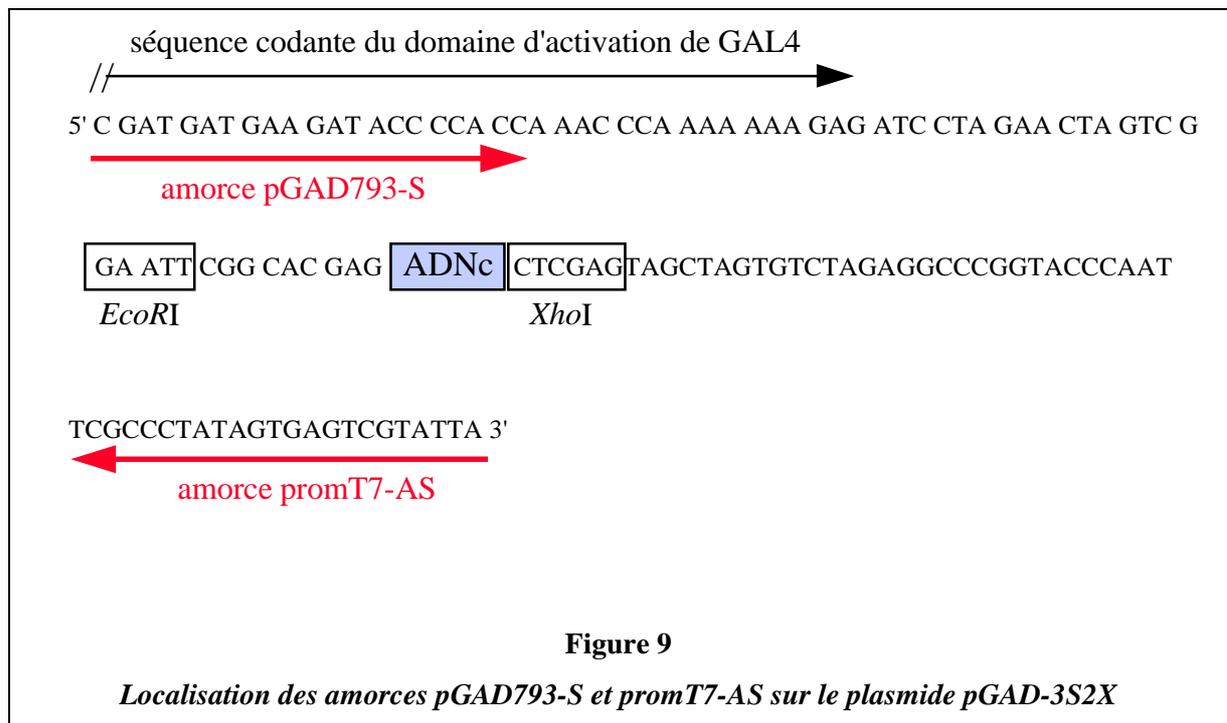
Contrairement à ce que l'on observe chez les bactéries, les levures ne possèdent pas de phénomène d'exclusion des plasmides, c'est-à-dire que plusieurs plasmides différents possédant une origine de répllication 2µ seront maintenus dans la même cellule, ce qui est le cas des plasmides pLex10 et pGAD3S2X.

Une colonie isolée est repiquée sur une boîte de milieu sélectif de manière à former un tapis de quelques cm² après 3 jours d'incubation à 30°C. Le tapis de levure prélevé à l'aide d'une pointe stérile est remis en suspension dans 50 µl de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), sorbitol 1,2 M, EDTA 10 mM et βME 10 mM (ajouté extemporanément). Le mélange est agité vigoureusement au vortex. La paroi cellulaire de la levure est détruite par hydrolyse du poly(β-1,3-glucose) avec 6,7 µl de lyticase à 30 unités/µl (Sigma, référence L2524) à 37°C pendant une nuit sans agitation. Les levures sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 4 000 rpm. La purification des plasmides est réalisée sur le culot de levures avec le kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega) en respectant le protocole préconisé par le fabricant. Les

préparations d'ADN réalisées de cette manière contiennent le plasmide pLex10:SH3_{fold} et tous les plasmide pGAD3S2X:ADNc.

5.6.2. Amplification des ADNc par PCR et digestion par *MboI* et *AluI*

L'ADN plasmidique des clones de levure Leu⁺ Trp⁺ His⁺ LacZ⁺ est amplifié par PCR avec les amorces pGAD793-S et promT7-AS (Figure 9). Les produits d'amplification sont ensuite digérés par les enzymes de restriction *MboI* et *AluI*.



5.6.3. Séquençage des plasmides

Un membre de chaque famille a été séquencé, ainsi que tous les clones isolés selon les techniques de séquençage précédemment décrites. Pour les clones possédant plusieurs ADNc, nous avons d'abord cherché à identifier l'ADNc responsable du phénotype Trp⁺ LacZ⁺ avant de le séquencer. Le séquençage de l'ADN est réalisé à l'aide de l'*Automated Laser Fluorescent ALF™ DNA Sequencer* (Pharmacia Biotech). Les inserts clonés dans les vecteurs pGAD3S2X sont amplifiés par PCR en utilisant le couple d'amorces pGAD793-M13S et promT7-AS biotinylée. Après immobilisation sur des billes magnétiques *Dynabeads M280-streptavidin* (Dynal) couplées à la streptavidine, les produits d'amplification sont dénaturés à la soude 0,1 M, puis lavés successivement par de la soude 0,1 M, du Tris-HCl 10 mM

(pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 2 M et du TE avant remise en suspension dans 10 µl d'eau. Les réactions de séquence sont ensuite réalisées à l'aide du kit *AutoRead™ Sequencing* (Pharmacia Biotech) en utilisant l'amorce universelle M13 (5'-TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC A-3'), marquée à son extrémité 5' par de la fluorescéine, dans les conditions préconisées par le fabricant.

Les séquences ont également été réalisées en utilisant le kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* (Perkin Elmer Biosystems) avec l'amorce pGAD793-S.

Une fois les premières séquences connues, nous avons choisi d'identifier rapidement les différents clones redondants par hybridation en utilisant une sonde marquée au [α -³²P]dCTP et correspondant à l'ADNc séquencé.

5.6.4. Étude de la fréquence des clones par hybridation

Préparation des membranes

Après réplique sur membrane de nylon Hybond™ N+ (Amersham) posée sur une boîte de milieu DO-L, les colonies sont mises en culture pendant 48 heures à 30°C. Les membranes sont ensuite retirées de l'agar, séchées à l'air puis déposées sur un disque de papier Whatman 3MM préalablement saturé dans une solution de sorbitol 1,2 M, EDTA 0,1 M, BME 1 %, contenant 3 mg/ml de lyticase. L'ensemble est incubé pendant 2 heures à 37°C dans une boîte de Pétri puis la membrane est dénaturée sur papier Whatman 3MM saturé avec une solution de NaOH 0,5 M et NaCl 1,5 M pendant 20 minutes à température ambiante. Les membranes sont séchées à l'air pendant une nuit puis neutralisées par une solution de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 1,5 M, 5 minutes à température ambiante, lavées dans du Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM puis incubées dans une solution de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM contenant 250 µg/ml de protéinase K, pendant une heure à 37°C. Les membranes sont ensuite lavées pendant 5 minutes, sous agitation douce, dans du Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, puis du Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). Après séchage sur du papier Whatman 3MM, les membranes sont incubées dans de la soude 0,4 M, pendant 15 minutes sous agitation douce, rincées dans un tampon phosphate (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 0,5 M pH 7,3) puis séchées sur du papier Whatman 3MM. Les membranes sont conservées à 4°C jusqu'à hybridation.

Marquage des sondes

Après PCR à l'aide des amorces pGAD793-S et promT7-AS, les produits d'amplification sont digérés par les enzymes *EcoRI* et *XhoI*, puis purifiés par le kit *QIAEXII gel extraction kit* (Qiagen), afin d'éliminer les séquences d'origine plasmidique bordant l'insert qui pourraient augmenter le bruit de fond. L'ADN est dénaturé 3 min à 95 °C puis refroidi brusquement à 4°C. Le marquage est réalisé avec le kit *Ready-To-Go Labelling DNA-beads* (Pharmacia Biotech) en présence de 100 ng d'ADN dénaturé et 5 µl de [α -³²P]dCTP (3 000 Ci/mmol) dans un volume final de 50 µl, pendant 30 minutes à 37°C. La

sonde est ensuite purifiée sur microcolonne *ProbeQuant G-50* de Sephadex (Pharmacia Biotech) dans les conditions préconisées par le fabricant.

Hybridation sur membrane

Les membranes sont saturées par incubation dans 25 ml d'une solution de préhybridation composée de SSPE 5× (PO₄ 0,05 M (pH 7,4), NaCl 0,75 M, EDTA 0,005 M), d'une solution de Denhardt 5× (mélange de polymères de hauts poids moléculaires saturant les sites de liaison non spécifiques et augmentant artificiellement la concentration de la sonde) et de SDS 0,5 %, pendant une heure à 65°C, sous agitation. 22,7 µl d'une sonde marquée au [α -³²P]dCTP (10⁶ cpm/ml) et dénaturée pendant 5 minutes à 100°C sont ensuite ajoutés à la solution de préhybridation et incubés à 65°C, sur la nuit. Après deux lavages de 10 minutes, à température ambiante, dans du SSPE 2X contenant du SDS 0,1 %, les membranes sont lavées une fois dans du SSPE 1X, SDS 0,1 % à 65°C, pendant 15 minutes puis trois fois dans du SSPE 0,1X, SDS 0,1 % à 65°C pendant 10 minutes, avant autoradiographie.

Les membranes peuvent être déshybridées par incubation dans une solution de NaOH 0,4 M, 30 minutes à 45°C, et transfert dans une solution de Tris-HCl 0,2 M (pH 7,5), SSC 0,1X (citrate de sodium 0,0015 M (pH 7,0) ; NaCl 0,015 M), SDS 0,1 %, pendant 15 minutes. Avant hybridation, l'absence de sonde sur les membranes est vérifiée par autoradiographie.

5.7. Vérification de la spécificité des interactions par conjugaison

5.7.1. Séparation du plasmide « appât » (pLex10:SH3_{F_{od}}) des plasmides « ligand » (pGAD3S2X:ligand)

Les préparations d'ADN réalisées à partir des clones de levures Trp⁺ Leu⁺ His⁺ LacZ⁺ contiennent le plasmide pLex10:SH3_{F_{od}} et tous les plasmides pGAD3S2X:ligand. Pour sélectionner spécifiquement les plasmides pGAD3S2X:ligand, il faut transformer une souche *E. coli* portant une mutation *leuB* qui la rend auxotrophe pour la leucine. Grâce au gène *LEU2* porté par ce plasmide, les clones recombinants pourront se développer sur un milieu carencé en leucine. L'ADN plasmidique des clones bactériens est ensuite préparé et introduit de nouveau dans une souche de levure dont le type sexuel est complémentaire à celle de la souche contenant les différents appâts, ce qui permet de réaliser des conjugaisons (Figure 8, page 65).

5.7.2. Transformation des bactéries par électroporation

Les plasmides pGAD3S2X:ADNc purifiés à partir des levures sont obtenus en faible quantité. Afin de les amplifier, il est nécessaire de réaliser une transformation par électroporation dans la souche *E. coli* HB101 (Bio-rad), auxotrophe pour la leucine et de génotype : F⁻ *mcrB mrr hsdS20* (r_B⁻, m_B⁻) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Sm^r) *xyl-5 λ- leuB6 mtl-1*. La transformation est effectuée

avec 1,5 µl de la préparation de plasmide de levures et l'électroporateur « *E. coli* Pulser™ » (Bio-rad) en respectant les conditions préconisées par le fabricant. Après transformation, les bactéries sont mises en culture dans 1 ml de SOC (Bacto-tryptone 2 %, bacto yeast extract 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, D-glucose 20 mM) pendant 1 heure à 37°C, sous agitation (225 rpm). Après centrifugation pendant 5 minutes à 3 000 rpm, le culot est resuspendu dans 3 ml de milieu minimum liquide M9 (NaHPO₄ 48 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 8,6 mM, NH₄Cl 18,6 mM, D-glucose 4 %) complété de tous les acides aminés excepté la leucine, et en présence de 100 µg/ml d'ampicilline. Après une nuit à 37°C sous agitation (225 rpm), les plasmides recombinants sont purifiés à l'aide du kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega).

5.7.3. Mutagenèse dirigée du domaine SH3 de la fodrine

La mutagenèse dirigée a été réalisée essentiellement selon le protocole décrit par Ray et Nickoloff (1992) et modifiée selon Nicolas *et coll.* (1997), article présenté à la fin de ce manuscrit.

La matrice utilisée est le plasmide pLex10:SH3_{fod} précédemment décrit. L'amorce en 3' contient la mutation d'intérêt et l'amorce en 5' contient deux mutations qui modifient le site de restriction unique *Bam*HI en un nouveau site unique *Kpn*I permettant ainsi la sélection et l'identification rapide des clones mutés. Le tableau ci-dessous présente les amorces utilisées pour réaliser les trois mutations E985A, K1002E et P1017L.

Amorce	Séquence (5' → 3')
pLex10 <i>Bam</i> HI→ <i>Kpn</i> I	C GAC TGG CTG GAA TTC GGT ACC GAG CTG GTC TTG GCT
SH3fod-E985A	GAG AAG AGT CCC CGA GCG GTC ACC ATG AAG AAG
SH3fod-K1002E	A CTC AAC AGC ACC AAC GAG GAT TGG TGG AAA GT
SH3fod-P1017L	CGT CAG GGT TTT GTG CTG GCT GCG TAC GTG AAG

Les bases en rouge correspondent aux mutations. Toutes les amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée sont phosphorylées à leur extrémité 5'.

Tableau 6

Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

Le plasmide pLex10:SH3_{fod} (50 ng) est mélangé avec 25 pmoles de chaque amorce (pLex10 *Bam*HI→*Kpn*I et l'amorce contenant la mutation d'intérêt) dans un volume final de 20 µl de Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM et NaCl 50 mM. Le mélange est d'abord chauffé à 100°C pendant 3 minutes afin de dénaturer le plasmide puis refroidi rapidement à 4°C pendant 5 minutes. L'hybridation est réalisée à température ambiante pendant 30 minutes. La synthèse du second brin et la ligation du plasmide néo-synthétisé sont effectuées simultanément en ajoutant 3 unités de polymérase T4 (Biolabs), 1 000 unités de ligase T4 (Biolabs)(2 000 unités/µl), 3 µl d'une solution (Tris-HCl 100 mM (pH 7,5),

ATP 10 mM, DTT 20 mM et chaque dNTP 5 mM) en amenant le volume final à 30 µl avec de l'eau. Les réactions sont effectuées à 37°C pendant 2 heures et arrêtées par une étape de 5 minutes à 65°C après avoir ajouté 3 µl d'une solution de SDS 0,25 % et EDTA 5 mM (pH 8,0). Les plasmides sont transformés dans 20 µl de bactéries compétentes *E. coli* BMH71-18 *mutS* (Clontech) par électroporation avec 1 µl de la réaction de mutagenèse préalablement diluée 5 fois avec de l'eau distillée. Après électroporation, les bactéries sont incubées dans 1 ml de SOC pendant 1 heure à 37°C sous agitation vigoureuse (225 rpm). Cinq ml de LB contenant de l'ampicilline 100 µg/ml et de la tétracycline 50 µg/ml sont ajoutés à la culture qui est poursuivie pendant une nuit dans les mêmes conditions. L'ADN plasmidique est préparé avec le kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega). Un total de 2,5 µg de plasmide purifié est digéré par *Bam*HI selon les conditions préconisées par le fournisseur (Gibco) dans un volume final de 50 µl ce qui linéarise le plasmide parental non muté. Ce plasmide linéaire est ensuite éliminé en ajoutant 1,25 µl d'exonucléase III (Gibco - 65 unités/µl) et en incubant le mélange à 37°C pendant 15 minutes. La réaction est arrêtée par une étape de 10 minutes à 65°C. La deuxième transformation dans *E. coli* DH5α est réalisée avec 10 µl du mélange plasmidique et 100 µl de bactéries selon les conditions déjà décrites. Les clones obtenus sont testés pour la présence :

1. de la mutation *Bam*HI→*Kpn*I par digestion avec *Bam*HI ou *Kpn*I ;
2. de la mutation d'intérêt par digestion avec une enzyme dont le site a été créé ou détruit par cette mutation d'intérêt.

La séquence complète du domaine SH3 de chaque clone mutant a ensuite été totalement vérifiée. L'expression de chaque mutant a également été vérifiée par immunotransfert avec les anticorps anti-LexA.

Résultats

1. Étude fonctionnelle et structurale du site de tétramérisation de la spectrine : effet de mutations associées à des elliptocytoses héréditaires

Dans cette première partie, je résumerai les résultats concernant l'étude fonctionnelle et structurale du site de tétramérisation de la spectrine, ce travail ayant fait l'objet de deux publications reproduites en annexe de ce mémoire (pages 176 et 185).

1.1. Reconstitution et validation du modèle de tétramérisation

1.1.1. Définition des peptides α et β impliqués dans le site de tétramérisation

L'auto-association de la spectrine est une fonction particulièrement importante pour la stabilité du squelette membranaire comme l'ont montré les défauts fonctionnels associés à des mutations présentes dans les elliptocytoses héréditaires. Rappelons que le modèle proposé pour le site d'auto-association de la spectrine implique la première hélice C isolée de la chaîne α pourrait s'associer aux deux dernières hélices A et B de la chaîne β pour reconstituer une unité conformationnelle trihélicoïdale semblable à celles observées le long de la molécule. Les mutations localisées dans les trois hélices probablement impliquées dans le site d'auto-association de la spectrine sont associées à un défaut d'interaction important, à l'inverse des autres mutations localisées en dehors du site présumé (Figure 10, page 76).

Dans la première partie de mon travail, j'ai d'abord cherché à définir, sur les chaînes α et β de la spectrine érythroïde humaine, les régions nécessaires et suffisantes pour l'interaction entre les deux chaînes. Ce travail a été réalisé à l'aide de peptides recombinants (protéines de fusion couplées à la GST purifiées après expression dans *E. coli*). Quatre peptides recombinants de l'extrémité COOH de la chaîne α et quatre de la chaîne β ont été exprimés (Article 1, Figure 1). Les peptides obtenus en qualité et en quantité suffisante ont été testés pour leur capacité à se lier à leurs partenaires respectifs. Des études précédentes avaient montré que la réassociation entre l'extrémité NH₂ de la chaîne α (obtenue après

clivage modéré par la trypsine) et la chaîne β isolée de la spectrine était 32 fois plus forte à 0°C qu'à 37°C en présence de 150 mM de NaCl (DeSilva *et coll.*, 1992). Nous avons donc choisi de réaliser toutes les étapes de réassociation à 0-4°C en présence de 150 mM de NaCl pendant au moins 24 heures.

Les peptides β ont d'abord été utilisés sous la forme de protéines de fusion, c'est-à-dire couplées à la GST, alors que les peptides α ont été débarrassés de la GST, après clivage par la thrombine. Après interaction, les peptides α réassociés ou non aux protéines de fusion GST- β fixées à des billes de sépharose CL-4B-glutathion ont été séparés par électrophorèse dénaturante. Nous avons ainsi démontré que les peptides correspondant aux deux dernières hélices A et B de la chaîne β ou aux 50 premiers résidus de la chaîne α (hélice C) ne peuvent se réassocier que s'ils sont assemblés à l'unité conformationnelle trihélicoïdale adjacente (Article 1, Figure 3).

1.1.2. Approfondissement des données biochimiques de l'interaction

Nous avons ensuite travaillé avec des peptides α et β débarrassés de la GST, après clivage par la thrombine. Les études par dichroïsme circulaire (réalisées par Constantin Craescu, INSERM U-350, Paris) ont montré que les peptides obtenus possédaient une structure fortement hélicoïdale (75-80 %) similaire à celle de la spectrine native (Article 1, Figure 2). Après réassociation, les différentes espèces ont été séparées par électrophorèse non dénaturante rapide à 4°C (système PhastSystem de Pharmacia). Les peptides utilisés étaient pleinement fonctionnels car capables de se lier :

1. à leur partenaire recombinant respectif (Article 1, Figure 4) ;
2. à la spectrine native à 30°C et d'inhiber la formation du tétramère (Article 1, Figure 5).

Les interactions réalisées après marquage des peptides α avec ^{125}I ont permis d'établir précisément la constante de dissociation de l'interaction (K_D). Celle-ci est identique à celle observée dans la molécule native (1 μM , Article 1, Figure 6). L'extrémité COOH non homologue de la chaîne β n'est pas nécessaire pour l'interaction avec le partenaire α . Cependant, les courbes de Scatchard, démontrant la présence de deux populations de complexe α/β , suggèrent que cette région pourrait stabiliser soit les hélices A et B de la chaîne β , soit le complexe α/β (Article 1, Figure 6).

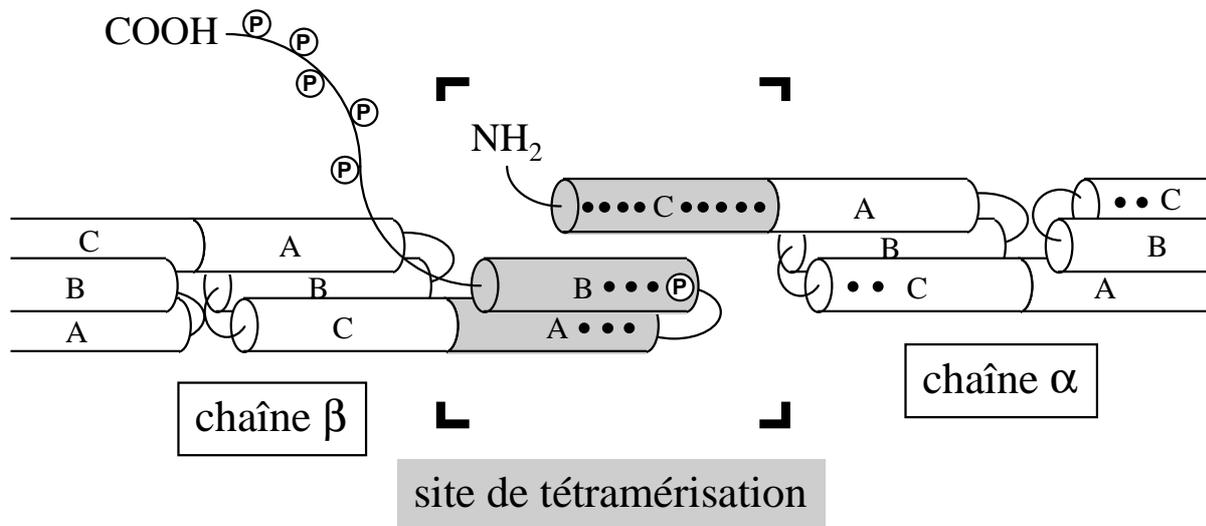


Figure 10

Schéma du site de tétramérisation de la spectrine

L'hélice C de la chaîne α et les hélices A et B de la chaîne β impliquées dans l'auto-association de la spectrine sont indiquées en gris. Les mutations associées à une élliptocytose héréditaire sont indiquées par un point noir et sont le plus fréquemment localisées dans l'une des trois hélices du site de tétramérisation. Les sites de phosphorylation présumés sur l'extrémité C-terminale de la chaîne β sont indiqués par un P

1.1.3. Conséquences structurales de la tétramérisation

Nous avons complété ce travail en étudiant la stabilité structurale des peptides recombinants α et β réassociés en collaboration avec l'équipe de Walter Gratzer (Medical Research Council Muscle and Cell Motility Unit, Randall Institute, King's College, Londres). Les peptides recombinants utilisés sont α 1-50 (dénommé α_S dans l'article 2), α 1-154 (dénommé α_L), β 16-17 (dénommé β_S) et le peptide β 16-17C (dénommé β_L). L'analyse structurale des peptides par dichroïsme circulaire couplées aux profils de dénaturation thermique ont démontré que l'unité répétitive conformationnelle complète présente dans les peptides α et β étudiés possédait un repliement tertiaire stable, confirmant ainsi nos premières données de dichroïsme circulaire. L'étude du peptide α 1-50 a montré qu'il était particulièrement instable à cause d'une structure en feuillet β , ce qui engendrait une agrégation importante. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi α 1-50 ne se réassociait pas avec les partenaires β . En ce qui concerne les autres peptides, tous présentaient un pourcentage d'hélices α équivalent à celui que l'on observe dans la spectrine native. De plus, les études d'équilibre de sédimentation réalisées sur ces peptides ont montré qu'ils étaient principalement monomériques en solution et ne formaient pas d'homodimère comme cela a été observé lorsque les peptides sont très concentrés, par exemple pour les études de RMN et de diffraction des rayons X (Yan *et coll.*, 1993 ; Ralston *et coll.*, 1996). Cependant une proportion des peptides, particulièrement pour le peptide β 16-17C, formait des agrégats de hauts poids moléculaires (17 % du matériel total).

La constante d'association mesurée, $1-2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, était compatible à la fois avec celle de la spectrine native et avec celle que nous avons mesurée par établissement des courbes de Scatchard (Article 1, Figure 6). L'association n'était pas affectée par l'extrémité C-terminale non homologue de la chaîne β de la spectrine.

Les études d'équilibre de sédimentation ont démontré que des mélanges équimolaires de peptides α et β formaient des complexes 1/1. Les courbes de mélange, observées par dichroïsme circulaire ont montré que l'association des peptides α et β s'accompagnait d'une augmentation du pourcentage d'hélice α (Article 2, Figure 7) de 12 à 15 %, ce qui correspond à un nombre d'acides aminés acquérant une structure hélicoïdale compris entre 14 et 18 (à titre de comparaison, les hélices A, B et C sont composées de 29 à 32 acides aminés).

1.2. Confirmation du lien entre mutations EH et tétramérisation

1.2.1. Retentissement des mutations EH sur la tétramérisation

Le modèle étant bien établi, nous avons reproduit, par mutagenèse dirigée, trois mutations localisées dans ce site et associées à des elliptocytoses héréditaires. La technique que nous avons utilisée pour la mutagenèse dirigée a fait l'objet d'une publication (Article 3). Ces mutations sont situées sur la chaîne β de la spectrine bien que la majorité soit située dans la première hélice C de la chaîne α . L'une d'elle (W2024R) touche le tryptophane invariant présent dans toutes les unités répétitives des chaînes α et β de la spectrine mais également dans l' α -actinine et la dystrophine. Une autre mutation (W2061R) affectait un résidu qui, par

comparaison avec les structures biophysiques établies (RMN et cristallographie aux rayons X), semblait localisé dans le cœur hydrophobe formé par les trois hélices α . Enfin, la dernière mutation étudiée (A2023V) est à la fois conservative et semble située en dehors des zones présumées d'interaction. Nous souhaitons donc vérifier soit que cette mutation A2023V était bien associée au défaut d'auto-association observée ou soit qu'elle pouvait être considérée comme un polymorphisme. Pour les trois mutations, nous avons pu établir que :

1. ces mutations étaient bien responsables du défaut d'auto-association de la spectrine ;
2. l'intensité de ce défaut fonctionnel (estimé par la mesure des K_D) dépend de la nature et de la localisation de chaque mutation au sein du site, comme cela est observé dans la molécule native chez les patients.

Ainsi les mutations W2024R et W2061R affectent très fortement l'auto-association. Nous avons estimé que les K_D étaient de 240 μ M et 130 μ M, respectivement. En ce qui concerne la mutation A2023V, nous avons montré que sa présence affectait peu l'auto-association avec le partenaire α . Cependant, la mesure du K_D indiquait une valeur de 8 μ M, ce qui confirmait que la mutation était bien responsable d'un défaut d'auto-association modéré (Article 1, Figure 8).

1.2.2. Conséquences structurales des mutations HE

Enfin, nous avons poursuivi ce travail en étudiant le retentissement structural des trois mutations décrites précédemment, également en collaboration avec l'équipe de Walter Gratzer.

Les peptides β portant les mutations étudiées présentaient un pourcentage d'hélice α peu différent du peptide sans mutation (Article 2, Table 1). De manière inattendue, la stabilité structurale de l'unité conformationnelle complète adjacente était fortement affectée par la présence de l'une des trois mutations EH situées à la limite de la partie C-terminale de la protéine. La déstabilisation était particulièrement importante pour le peptide portant la mutation W2024R (Article 2, Figure 4).

La réassociation des peptides α et β a été étudiée par dichroïsme circulaire comme précédemment. L'interaction entre le peptide β A2023V et le peptide α a démontré qu'il se produit également une augmentation du pourcentage d'hélice α mais que celle-ci est diminuée de 40 % comparé à celle générée par le peptide β sans mutation. En ce qui concerne les peptides W2024R et W2061R, aucune augmentation du pourcentage d'hélice α n'a été observée, ce qui démontre, une fois de plus, qu'ils sont incapables de s'associer au partenaire α .

Nous avons ainsi démontré, par des techniques biochimiques et biophysiques, les relations existantes entre les caractéristiques des mutations, l'intensité du défaut fonctionnel d'auto-association de la spectrine et la sévérité clinique observées chez les malades. Nous avons confirmé que chacune d'entre elles est bien responsable du défaut de tétramérisation et qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme protéique qui aurait pu être associé à un autre défaut moléculaire non identifié. De plus, nous avons démontré l'importance du résidu tryptophane très conservé dans les structures répétées trihélicoïdales des membres de la superfamille Spectrine.

2. Étude fonctionnelle du domaine SH3 de la chaîne α de la fodrine

2.1. Identification et caractérisation de deux isoformes de la chaîne α de la fodrine

En réalisant les différentes constructions nécessaires à l'étude du domaine SH3 (ce travail sera détaillé dans les chapitres suivants), nous avons mis en évidence, par RT-PCR, la présence de deux transcrits de la chaîne α de la fodrine. Le séquençage de ces deux bandes a démontré qu'il s'agissait de deux isoformes du gène α II.

2.1.1. Caractéristiques des deux isoformes

Nous avons retrouvé la présence de ces deux isoformes chez l'homme, le rat et la souris. Les deux isoformes se différencient l'une de l'autre par la présence d'une séquence supplémentaire de 60 nucléotides conservant la phase de lecture de la protéine et codant pour 20 acides aminés supplémentaires. Ces deux isoformes avaient déjà été décrites par Moon et McMahon (1990). Nous appellerons α II Σ 1 l'isoforme possédant cette séquence supplémentaire et α II Σ 2, l'isoforme dans laquelle la séquence est absente.

Cette séquence supplémentaire est située dans une région fonctionnelle importante : elle est localisée au milieu de l'hélice C de l'unité conformationnelle α 10, onze résidus en aval du domaine SH3, à proximité du site de fixation pour la calmoduline et du site de clivage par les calpaïnes, tous les deux situés dans l'unité conformationnelle suivante (Figure 7, page 49).

2.1.2. Mécanisme de production des deux isoformes

L'organisation intron-exon de la fodrine n'étant pas connue, nous souhaitons définir l'organisation de la région portant cette délétion. Après amplification par PCR d'ADN génomique humain avec les couples d'amorces α FO SH3 S/ α FO EX22' G28 AS et α FO EX22' R13 S/ α FO UR11 E66 AS puis séquençage des produits obtenus, nous avons pu montrer que la délétion créant l'isoforme α II Σ 2 correspondait à l'épissage alternatif en phase d'un exon (Figure 11, page 80).

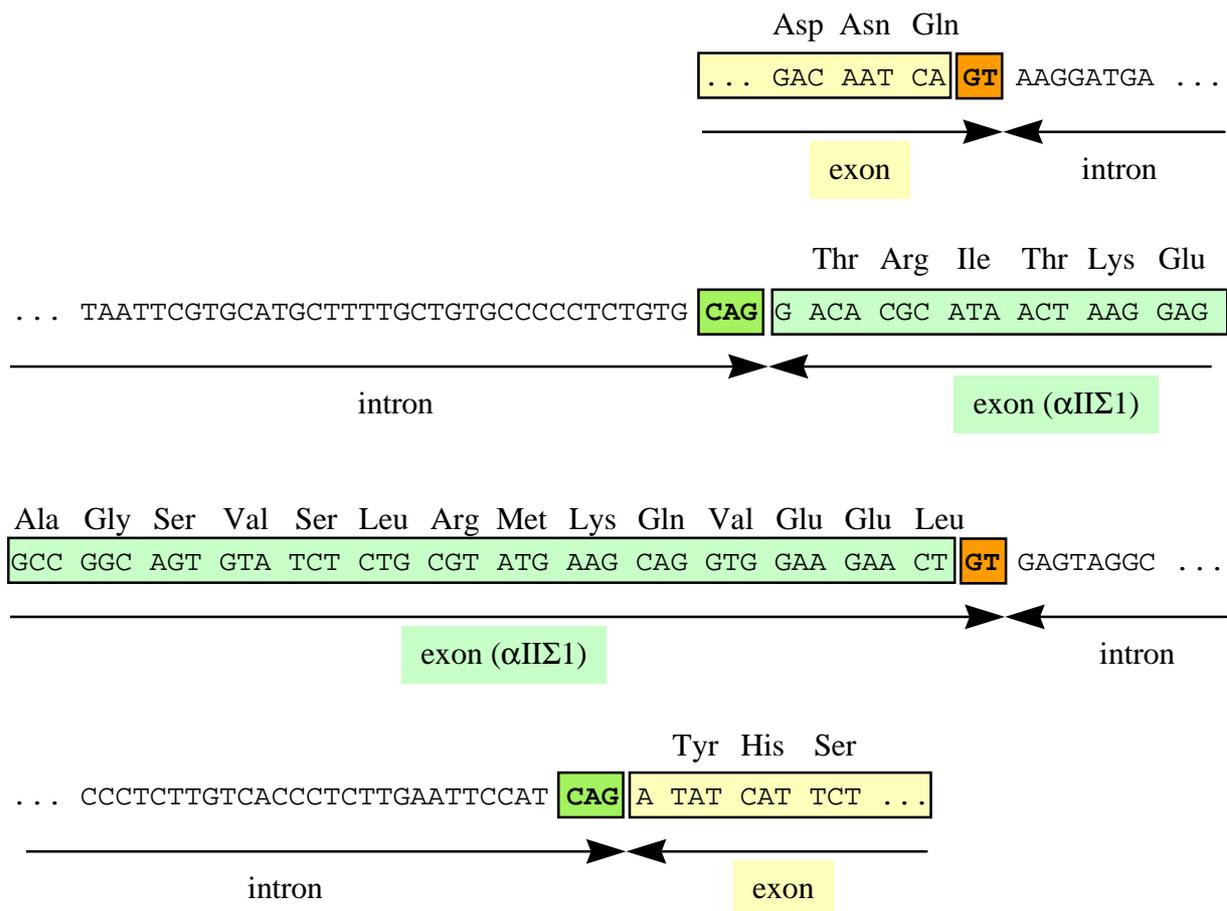


Figure 11

Séquence intron-exon de la région caractéristique des isoformes α II Σ 1 et α II Σ 2

L'exon spécifique de l'isoforme α II Σ 1 est indiqué en vert clair. Les sites introniques donneur d'épissage (GT) et accepteur d'épissage (CAG) sont indiqués en orange et vert, respectivement.

2.1.3. Distribution tissulaire ou cellulaire des deux isoformes

Nous avons choisi d'étudier la distribution de ces deux transcrits par RT-PCR semi-quantitative en présence de [α 32 P]dCTP en utilisant les amorces α FO SH3 S et α FO C30 UR11 AS pour l'amplification. Il était important de réaliser la PCR avec un nombre de cycles permettant d'amplifier les deux isoformes de manière identique. Il existe en effet deux phases distinctes dans une PCR : une première avec une croissance exponentielle de chaque produit amplifié puis une deuxième phase, où l'efficacité de la PCR diminue. Un plateau est atteint et peut être différent pour les deux produits PCR amplifiés. Il faut donc vérifier que ce plateau n'est jamais atteint afin que le rapport des deux produits obtenus reflète le rapport des transcrits de départ. Ceci a été testé sur un ADNc témoin permettant d'amplifier chaque isoforme dans des proportions à peu près égales, avec un nombre de cycles croissant et en mesurant le rapport des deux isoformes après quantification de chaque produit (Instant Imager, Packard). Ce rapport reste stable lorsque la PCR est en phase exponentielle, jusqu'au 24^{ème} cycle. Ainsi, toutes les réactions PCR ont ensuite été réalisées avec 24 cycles.

La technique a été utilisée pour estimer la proportion de chaque isoforme dans différents organes de rat ou dans différents types cellulaires humains (Figure 12, page 82). Les deux isoformes sont exprimées en quantité équivalente dans la rate, et les organes à forte prédominance épithéliale (rein, poumon et foie). L'isoforme α II Σ 2 est exprimée majoritairement dans le cœur et l'aorte (entre 75 et 78 %) alors que l'isoforme α II Σ 1 est très prédominante (>85 %) dans le cerveau de rat et les plaquettes, lymphocytes et granulocytes de l'homme.

2.1.4. Étude du clivage des peptides SH3 par les calpaïnes

Comme précédemment décrit, la séquence supplémentaire qui caractérise l'isoforme α II Σ 1, est située dans une région particulièrement intéressante regroupant plusieurs domaines fonctionnels (Figure 7, page 49). Afin d'analyser l'effet de cette séquence sur les fonctions environnantes, nous avons produit des peptides recombinants fusionnés à un épitope (His)₆, recouvrant cette région (acides aminés Asp₈₈₅ à Ser₁₂₀₉ ; la numérotation tenant compte des vingt acides aminés supplémentaires) et contenant ou non la séquence spécifique de α II Σ 1 : ces peptides contiennent l'unité conformationnelle complète α 9 avec le domaine SH3 situé entre les hélices B et C de α 9, ainsi que l'unité conformationnelle complète α 10 avec le domaine de liaison à la calmoduline inséré au milieu de l'hélice C de α 10 (Figure 7, page 49). Les deux peptides produits après expression dans *E. coli* ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne couplée à du nickel. Après une seconde purification par chromatographie échangeuse d'anions, les peptides obtenus, appelés SH3- α 9- α 10-(His)₆ et SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆, étaient purs et stables.

Distribution tissulaire ou cellulaire des isoformes α fodrine

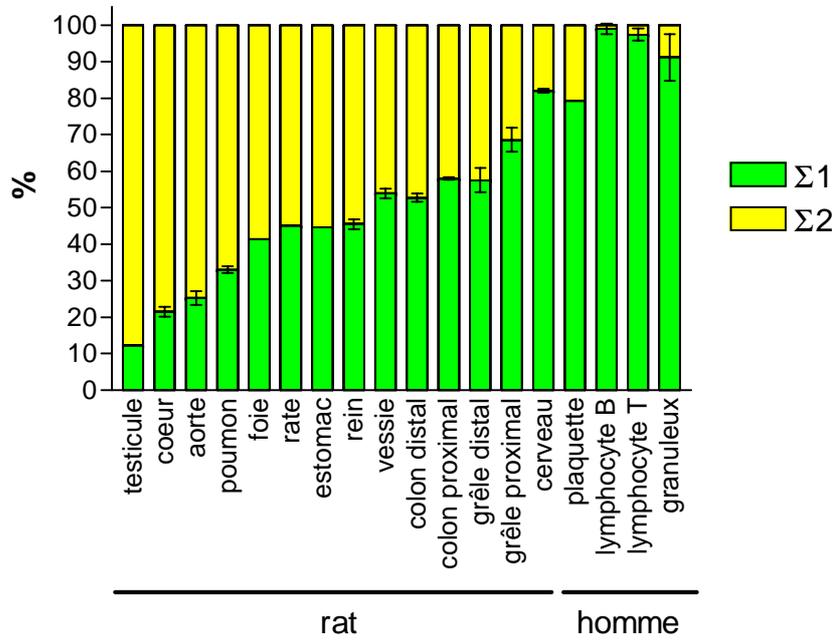


Figure 12

Distribution tissulaire ou cellulaire des isoformes $\alpha I \Sigma 1$ et $\alpha I \Sigma 2$.

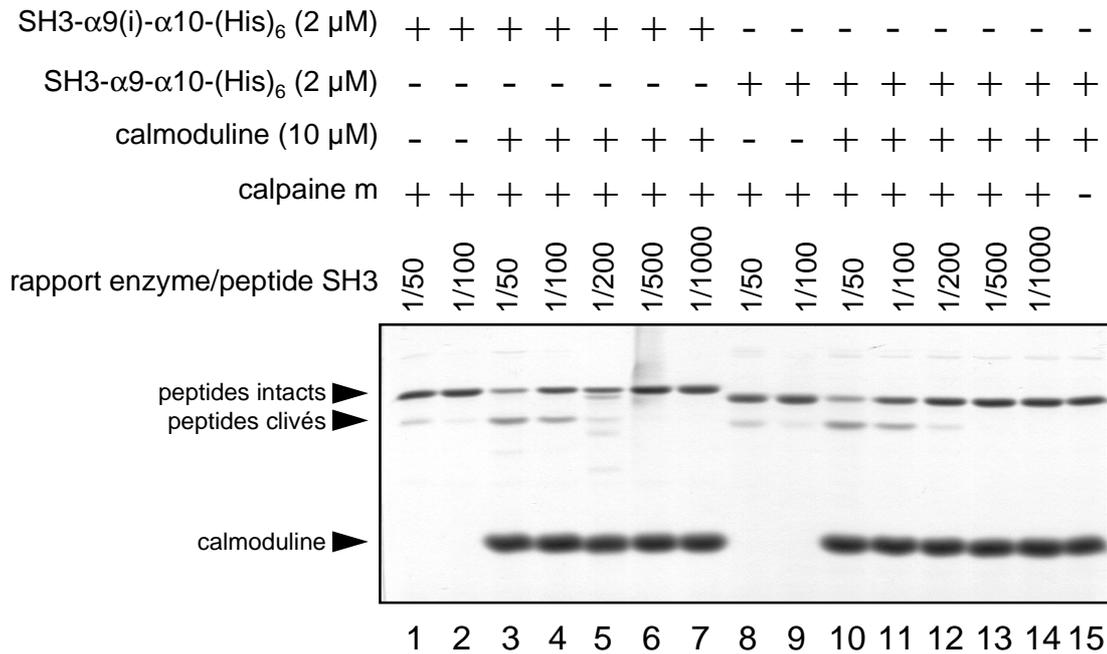
Les barres indiquent l'erreur standard (avec n=2 ou n=3 selon les échantillons).

Les calpaïnes sont une famille de protéases à cystéine, activées par le calcium. Il existe deux calpaïnes ubiquistes différentes, appelées milli et micro-calpaïne (ou calpaïne-m et calpaïne- μ), définies selon la concentration de calcium requise pour leur activation *in vitro*. Les deux peptides SH3 fodrine que nous avons produits contiennent le site de clivage pour les calpaïnes (Figure 7, page 49). Nous souhaitons donc vérifier si la présence des vingt acides aminés pouvait moduler l'activité des calpaïnes-m et μ . La digestion des peptides SH3 (2 μ M) a d'abord été étudiée en utilisant différents rapports enzyme/peptide avec ou sans calmoduline. La Figure 13A (page 84) montre qu'en présence de 10 μ M de calmoduline, les peptides SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ et SH3- α 9- α 10-(His)₆ sont protéolysés rapidement en un peptide d'environ 31 kDa, ce qui correspond à la partie N-terminale des peptides après digestion par la calpaïne après le résidu Tyr1174 (les masses théoriques des peptides N-terminaux sont de 33,3 et 31 kDa pour SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ et SH3- α 9- α 10-(His)₆, respectivement). Le peptide C-terminal n'est pas visible sur les gels en raison de sa masse moléculaire trop petite (7,3 kDa). En l'absence de calmoduline, les peptides sont peu protéolysés (Figure 13A, page 84, lignes 1-2 et 8-9). Une cinétique de digestion des peptides par la calpaïne-m confirme la différence de protéolyse avec ou sans calmoduline (Figure XB). Des résultats similaires ont été obtenus avec la calpaïne- μ . Cependant, il semblerait que son activité protéolytique vis-à-vis des peptides SH3 fodrine soit plus rapide que celle de la calpaïne-m. Nos résultats indiquent que le peptide SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ est clivé plus rapidement que le peptide SH3- α 9- α 10-(His)₆ mais cette différence est faible et demande à être confirmée.

2.1.5. Localisation intracellulaire

Afin d'étudier la localisation intracellulaire de chaque isoforme par microscopie confocale, nous avons préparé des anticorps reconnaissant spécifiquement l'isoforme α II Σ 1. Pour cela, la séquence codant pour les 20 acides aminés spécifiques de l'isoforme α II Σ 1 ainsi que deux acides aminés flanquant les extrémités N et C-terminales de la fodrine humaine a été produite dans *E. Coli* sous la forme d'une protéine de fusion avec la GST grâce au plasmide pGEX-KG: α II Σ 1. La protéine de fusion purifiée par chromatographie d'affinité a été utilisée pour immuniser un lapin (Eurogentec). La présence d'anticorps dirigés contre la région Asn₁₀₅₁-Tyr₁₀₇₄ a été vérifiée par immunotransfert sur des lysats bactériens surexprimant les peptides SH3- α 9- α 10-(His)₆ ou peptides SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆. Le sérum reconnaît spécifiquement le peptide SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ mais pas le peptide SH3- α 9- α 10-(His)₆. Le titre du sérum étant très faible nous étions obligés de l'utiliser de manière concentrée (dilution 1/1 000), ce qui générant un bruit de fond très important. Afin d'éliminer ce bruit de fond, nous avons purifié les anticorps spécifiques anti-(Asn₁₀₅₁-Tyr₁₀₇₄) par le système Hi-Trap (Pharmacia) en utilisant le peptide SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ comme matrice de purification. Les anticorps ainsi purifiés reconnaissent également spécifiquement le peptide SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ et pas le peptide SH3- α 9- α 10-(His)₆ sans bruit de fond (Figure 14, page 86).

A



B

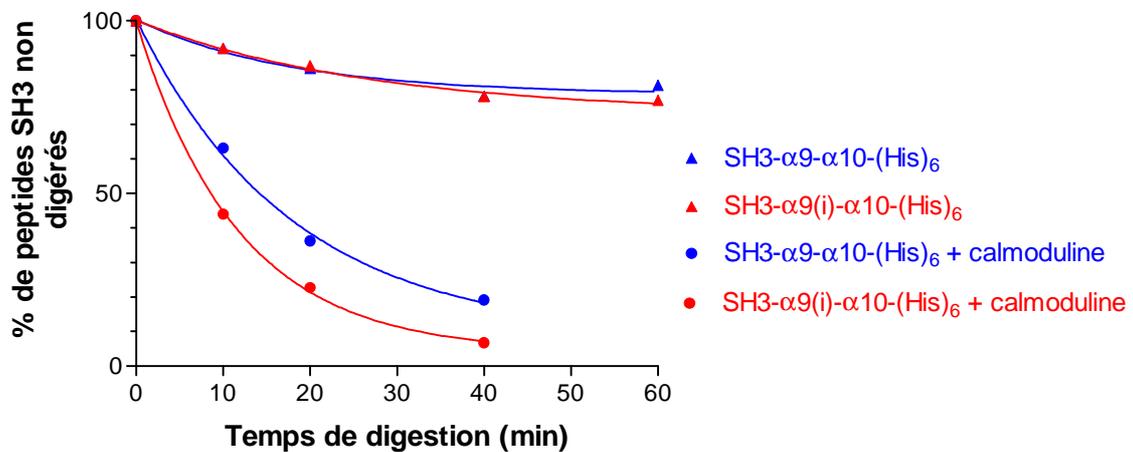


Figure 13

Étude du clivage des peptides SH3 fodrine par la calpaine-m

A - Digestion des peptides SH3 fodrine avec ou sans calmoduline et avec un rapport enzyme/peptide SH3 variable. Après digestion à 37°C pendant 30 minutes, les différentes espèces ont été séparées par SDS-PAGE et visualisées après coloration au bleu de Coomassie ;

B - Cinétique de digestion des peptides SH3 par la calpaine-m. La digestion a été réalisée à 30°C. Les différentes espèces ont été séparées par SDS-PAGE, visualisées au bleu de Coomassie et quantifiées par densitométrie.

Les symboles + et - indiquent respectivement la présence ou l'absence des peptides ou de l'enzyme dans le tube.

Deux protéines bactériennes étaient également reconnues par les anticorps anti-(Asn₁₀₅₁-Tyr₁₀₇₄) malgré leur purification. Ces protéines très immunogènes ont sans doute été copurifiées avec le peptide SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆.

Cependant, ni le sérum primaire, ni les anticorps purifiés ne reconnaissent la chaîne α de la fodrine endogène sur des extraits protéiques de lymphocytes T humain (Jurkat), de cellules rénales de rat (RCCD₁, nous reparlerons de cette lignée plus loin), ou de fibroblastes de singe vert (COS7). Des anticorps anti-SH3 fodrine utilisés comme contrôle positif montraient que la chaîne α de la fodrine endogène pouvait être détectée très spécifiquement.

2.2. Remise en cause de l'interaction entre ENaC et le domaine SH3 de la fodrine

Étant donné la proximité des 20 acides aminés et du domaine SH3 de la fodrine, il était intéressant de vérifier s'ils pouvaient réguler l'interaction entre le domaine SH3 de la fodrine et son ligand. Cette séquence pourrait agir soit de manière négative par encombrement stérique de la région proche du domaine SH3, soit de manière positive en apportant des régions spécifiques supplémentaires pour le domaine SH3. Nous souhaitons vérifier ces hypothèses en utilisant le seul ligand du domaine SH3 de la fodrine décrit à ce jour, le canal à sodium épithélial sensible à l'amiloride (ENaC).

2.2.1. Fodrine et ENaC

En 1994, Rotin *et coll.* montraient que :

1. la fodrine pouvait être coimmunoprécipitée avec des anticorps dirigés contre la sous-unité α de ENaC (α rENaC) à partir d'un lysat de cellules MDCK surexprimant le canal à sodium ;
2. le SH3 de la fodrine était capable de se lier directement à α rENaC. Par utilisation de peptides recombinants, ils ont démontré que la région C-terminale riche en proline (appelée P2) de α rENaC était indispensable pour fixer la fodrine ;
3. enfin, un peptide correspondant à la partie C-terminale de α rENaC microinjecté dans des cellules alvéolaires polarisées était transloqué vers la membrane plasmique apicale.

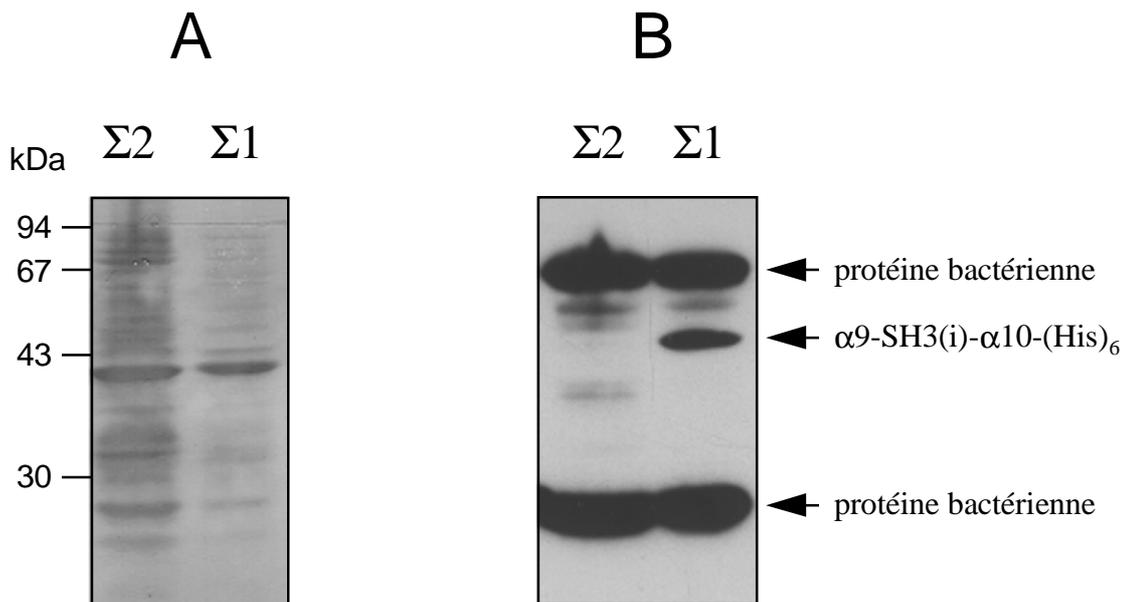


Figure 14

Caractérisation des anticorps purifiés anti- α II Σ I

Les bactéries (souche JM109) ont été transformées avec les plasmides pQE60:SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ ou pQE60:SH3- α 9- α 10-(His)₆. L'expression des peptides a été réalisée à 30°C pendant 3 heures avec 1 mM ou 2 mM d'IPTG pour les bactéries contenant les plasmides pQE60:SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ ou pQE60:SH3- α 9- α 10-(His)₆, respectivement. Les lysats bactériens ont été réalisés comme indiqué dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel contenant 12,5 % d'acrylamide puis transférées sur une membrane d'Immobilon-P.

A - Membrane d'Immobilon-P colorée au bleu de Coomassie ;

B - Immunotransfert réalisé avec les anticorps anti-(Asn₁₀₅₁-Tyr₁₀₇₄) purifiés avec le système Hi-Trap (dilution au 1/1 000).

L'ensemble de ces résultats suggérait une interaction entre le domaine SH3 de la fodrine et α ENaC mais le rôle exact de cette interaction était inconnu. Le domaine SH3 sert-il uniquement à adresser le canal à la membrane apicale ou bien est-il capable de le stabiliser et de limiter sa diffusion dans la membrane ? Une régulation de l'activité de transport du canal par le domaine SH3 pouvait également être envisagée. Nous souhaitons étudier ces différentes hypothèses en surexprimant le domaine SH3 de la fodrine dans une lignée épithéliale et étudier le transport vectoriel de sodium. Enfin, nous avons parallèlement étudié le comportement des isoformes α II Σ 1 et α II Σ 2 vis-à-vis de leur interaction avec α ENaC à l'aide de peptides recombinants.

2.2.2. Étude de l'interaction entre ENaC et le domaine SH3 de la fodrine

Lignée cellulaire

Les cellules RCCD₁ ont été immortalisées à partir d'une culture primaire de canal collecteur de rein de rat avec le virus SV40 (Blot-Chabaud *et coll.*, 1996). Ces cellules transformées possèdent les propriétés suivantes :

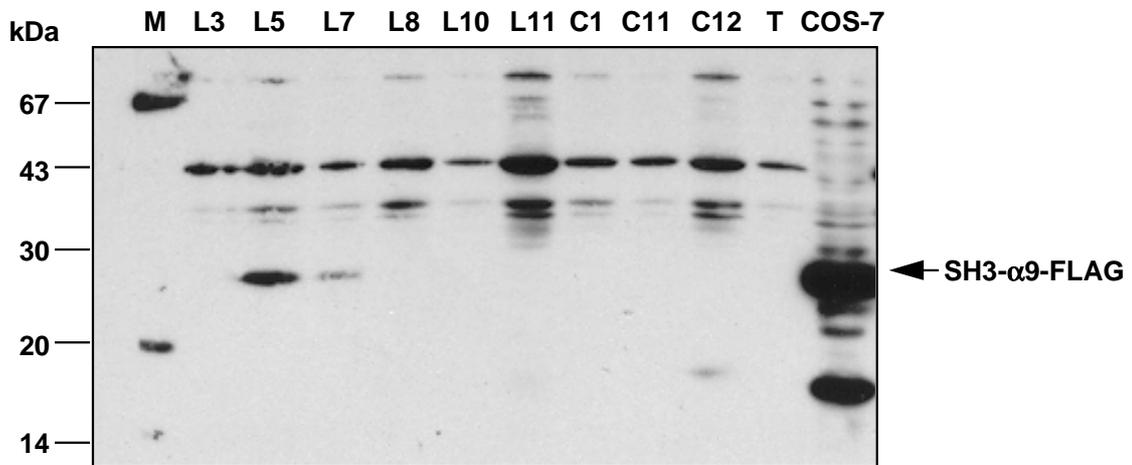
1. elles sont capables d'absorber les ions sodium par la membrane apicale et de les sécréter par la membrane basolatérale assurant ainsi un transport vectoriel très efficace de ces ions ;
2. les expériences de courant de court-circuit ont démontré qu'elles possédaient des canaux à sodium sensibles à l'amiloride ;
3. la résistance transépithéliale de ces cellules est élevée laissant supposer la mise en place de jonctions serrées indispensables à la polarisation des cellules (Blot-Chabaud *et coll.*, 1996).

Ainsi, l'ensemble de ces caractéristiques fait de la lignée RCCD₁ un excellent modèle pour étudier le transport du sodium dans des cellules épithéliales hautement polarisées.

Surexpression du domaine SH3 de la fodrine

Afin de surexprimer constitutivement le domaine SH3 de la fodrine dans les cellules RCCD₁, la séquence codante pour les acides aminés Asp₈₈₅ à Lys₁₀₉₃ (peptide SH3- α 9 contenant 4 acides aminés en plus du côté C-terminal) de la chaîne α de la fodrine a été introduite dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3, en aval du promoteur CMV. Une séquence consensus Kozak a été ajoutée en amont de la séquence codante afin de permettre la traduction du peptide dépourvu de son codon d'initiation naturel. Enfin, la séquence codante pour l'épitope FLAG (DYKDDDDK) a été introduite immédiatement derrière le résidu Lys₁₀₉₃. Cet épitope est reconnu par un anticorps monoclonal ce qui permet de différencier le peptide surexprimé de la chaîne α de la fodrine endogène.

A



B

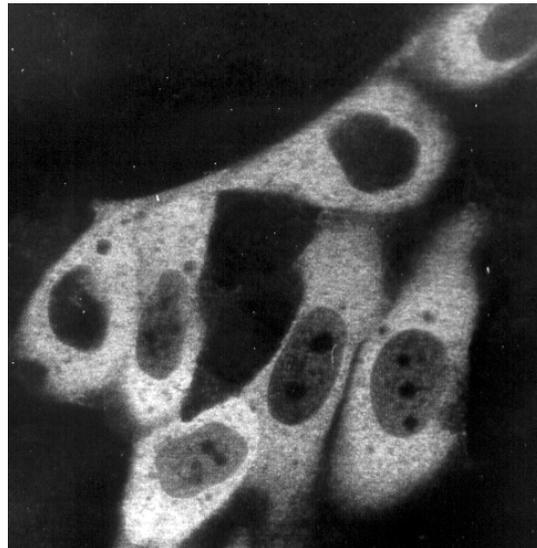


Figure 15

Vérification de la surexpression du peptide SH3- α 9-FLAG sur les clones résistants au G418

A - La migration électrophorétique des protéines a été réalisée sur un gel d'acrylamide 12,5 %. Chaque dépôt correspond au lysat d'environ 500 000 cellules. L3, L5, L7, L8, L10, C1, C11 et C12 sont les clones RCCD₁ stables obtenus après transfection avec le plasmide pcDNA3:SH3- α 9-FLAG et sélection avec le G418 ; T : cellules RCCD₁ non transfectées ; M = marqueurs de poids moléculaires. L'anticorps monoclonal anti-FLAG a été utilisé au 1/500 ;

B - Localisation cellulaire (clone L5) du peptide SH3- α 9-FLAG, révélée avec l'anticorps anti-FLAG et des igG anti-souris couplées au FITC.

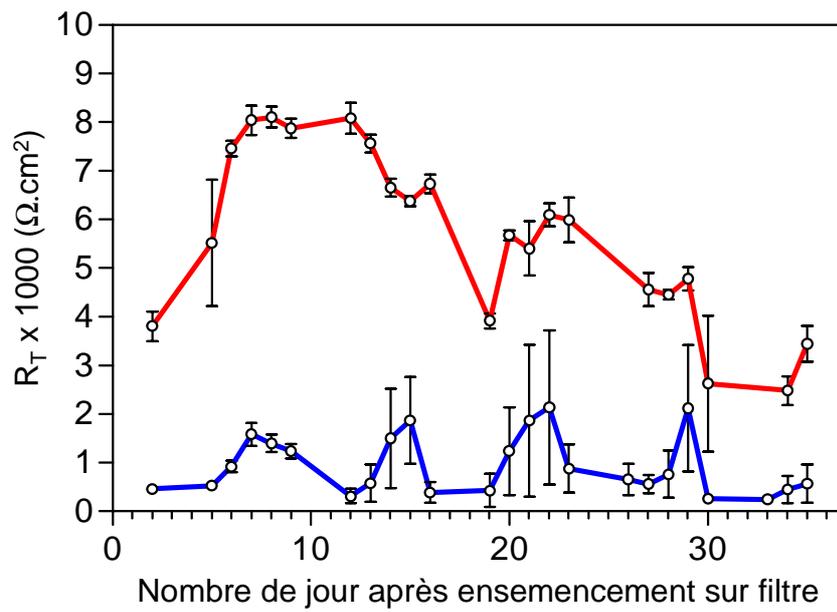


Figure 16

Mesure de la résistance transépithéliale (R_T)

Les cellules RCCD1 non transfectées (courbe bleue) ou les cellules surexprimant constitutivement le peptide SH3- α 9-FLAG (clone L5, courbe rouge) ont été placées sur filtre Transwel puis la R_T a été mesurée en fonction de leur croissance. Les barres représentent les déviations standards de 3 filtres.

Nous avons choisi de surexprimer le domaine SH3 inclus dans son unité conformationnelle complète car des études ont montré, au laboratoire, que les séquences adjacentes stabilisaient le domaine SH3 et étaient moins sensibles à la protéolyse (Andrieux et Fournier, résultats non publiés). En outre, nous pensons que ces séquences pouvaient renforcer la spécificité et l'affinité du canal pour le domaine SH3. Le plasmide pcDNA3 porte également le gène *Neo* conférant la résistance au G418, ce qui permet de réaliser des transfectants stables.

Avant de réaliser la transfection stable dans les cellules RCCD₁, la surexpression de ce peptide SH3- α 9-FLAG a été vérifiée par immunotransfert et immunofluorescence par microscopie confocale avec les anticorps anti-FLAG, après transfection transitoire du plasmide pcDNA3:SH3- α 9-FLAG dans les fibroblastes COS-7. Les résultats obtenus ont montré que le peptide SH3- α 9-FLAG était très fortement surexprimé dans ces cellules avec une localisation majoritairement cytoplasmique.

Transfection stable dans les cellules RCCD₁

La transfection stable a ensuite été réalisée avec le plasmide pcDNA3:SH3- α 9-FLAG par la méthode à la lipofectamine comme indiqué dans la partie « Matériels et Méthodes ». Après sélection au G418, 26 clones indépendants ont été isolés parmi lesquels 15 ont pu être maintenus en culture jusqu'à leur congélation (deux semaines après la transfection). La surexpression du peptide SH3- α 9-FLAG dans ces clones a été testée par immunotransfert avec les anticorps anti-FLAG. Deux clones seulement (L5 et L7) surexpriment le peptide attendu (Figure 15A, page 88). Les résultats de l'immunotransfert montrent que l'anticorps monoclonal reconnaît également la SAB (bande à 67 kDa dans les marqueurs de poids moléculaires) et plusieurs protéines endogènes inconnues des cellules RCCD₁. La surexpression stable du peptide SH3- α 9-FLAG est beaucoup plus faible dans les cellules RCCD₁ que la surexpression transitoire dans les cellules COS-7. Des études d'immunofluorescence réalisées par microscopie confocale avec l'anticorps anti-FLAG sur les cellules L5 ont démontré que le peptide SH3- α 9-FLAG était majoritairement cytoplasmique (Figure 15B, page 88).

Phénotype du clone L5 surexprimant le peptide SH3- α 9-FLAG

Les clones L5 et L7 ont une morphologie et une croissance similaires aux cellules RCCD₁ non transfectées. La résistance transépithéliale (R_T) a été mesurée sur des cellules RCCD₁ et L5 afin d'évaluer leur capacité à former des jonctions serrées indispensables pour maintenir un transport vectoriel des ions. Les résultats montrent que sur les cellules témoin, la R_T est d'abord nulle puis augmente jusqu'à atteindre un pic supérieur à 2 000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, compatible avec les données précédemment établies (Blot-Chabaud *et coll.*, 1996). Puis la R_T décroît pour redevenir nulle (Figure 16, page 89). Ce phénomène de croissance/décroissance de la R_T se produit régulièrement tant que les cellules sont maintenues en culture. La période entre deux pics est d'environ une semaine. La chute de la R_T pourrait être due à une mort

cellulaire importante. Les cellules survivantes pourraient alors recoloniser la surface du filtre, reformer des jonctions serrées, ce qui augmenterait la R_T . En ce qui concerne le clone L5 surexprimant constitutivement le peptide SH3- α 9-FLAG, d'une part la R_T est beaucoup plus élevée et d'autre part elle est maintenue pendant un laps de temps plus grand que pour les cellules témoins (Figure 16, page 89). Ces résultats demandent à être confirmés car une deuxième expérience a montré que les cellules RCCD1, L5 et L7, également cultivées sur filtre pendant deux semaines, présentaient des valeurs de R_T similaires. De plus, les études par microscopie électronique n'ont montré aucune différence au niveau des jonctions serrées entre les cellules RCCD₁ et L5.

Immunoprécipitation du peptide AB-SH3-C'-FLAG

Afin de confirmer l'interaction directe entre le domaine SH3 de la fodrine et α rENaC, une expérience de coimmunoprécipitation a été réalisée sur le clone L5. Le lysat cellulaire a été préparé avec une solution contenant 1 % de Triton X-100 identique à celle décrite par Rotin *et coll.* (1994) (voir partie « Matériels et Méthodes »). Le peptide SH3- α 9-FLAG a été immunoprécipité à partir du lysat avec l'anticorps monoclonal anti-FLAG couplé sur des billes de sépharose 4B et la présence de α rENaC a été révélée par immunotransfert avec des anticorps polyclonaux dirigés contre la partie N-terminale du canal (76 premiers acides aminés). La Figure 17 (page 92) montre que le peptide SH3- α 9-FLAG et la protéine α rENaC ont été bien solubilisés par le tampon de lyse décrit par Rotin *et coll.* (1994). En revanche, une partie de la fodrine reste insoluble (Figure 17, pistes C). La totalité du peptide SH3- α 9-FLAG a été retenue par les anticorps anti-FLAG, ce qui démontre l'efficacité de l'immunoprécipitation. De manière surprenante, α rENaC n'a pas été coimmunoprécipité avec le peptide SH3- α 9-FLAG et est resté dans la partie non retenue.

Afin de vérifier que l'absence d'interaction entre le peptide SH3- α 9-FLAG et α rENaC n'était pas due à une mutation ponctuelle située dans le domaine SH3 et qui aurait pu apparaître spontanément dans la cellule initiale dont L5 est issu, l'ADN génomique du clone L5 a été préparé et l'insert codant pour le peptide SH3- α 9-FLAG a été entièrement séquencé sur les deux brins d'ADN. Aucune mutation n'a été retrouvée.

L'interaction entre les deux partenaires a ensuite été testée par une autre méthodologie : la partie C-terminale de α rENaC a été exprimée et purifiée sous la forme d'un peptide recombinant en fusion avec la GST. Ce peptide correspond aux 83 derniers acides aminés et contient le motif P2 décrit par Rotin *et coll.* comme étant responsable de l'interaction directe entre la fodrine et le canal. Nous avons vérifié si ce peptide GST- α rENaC(Cterm) couplé à des billes de CL-4B était capable :

1. de retenir le peptide SH3- α 9-FLAG et/ou la fodrine endogène exprimés dans le clone L5 ;
2. de retenir les peptides SH3- α 9- α 10-(His)₆ et SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ précédemment décrits.

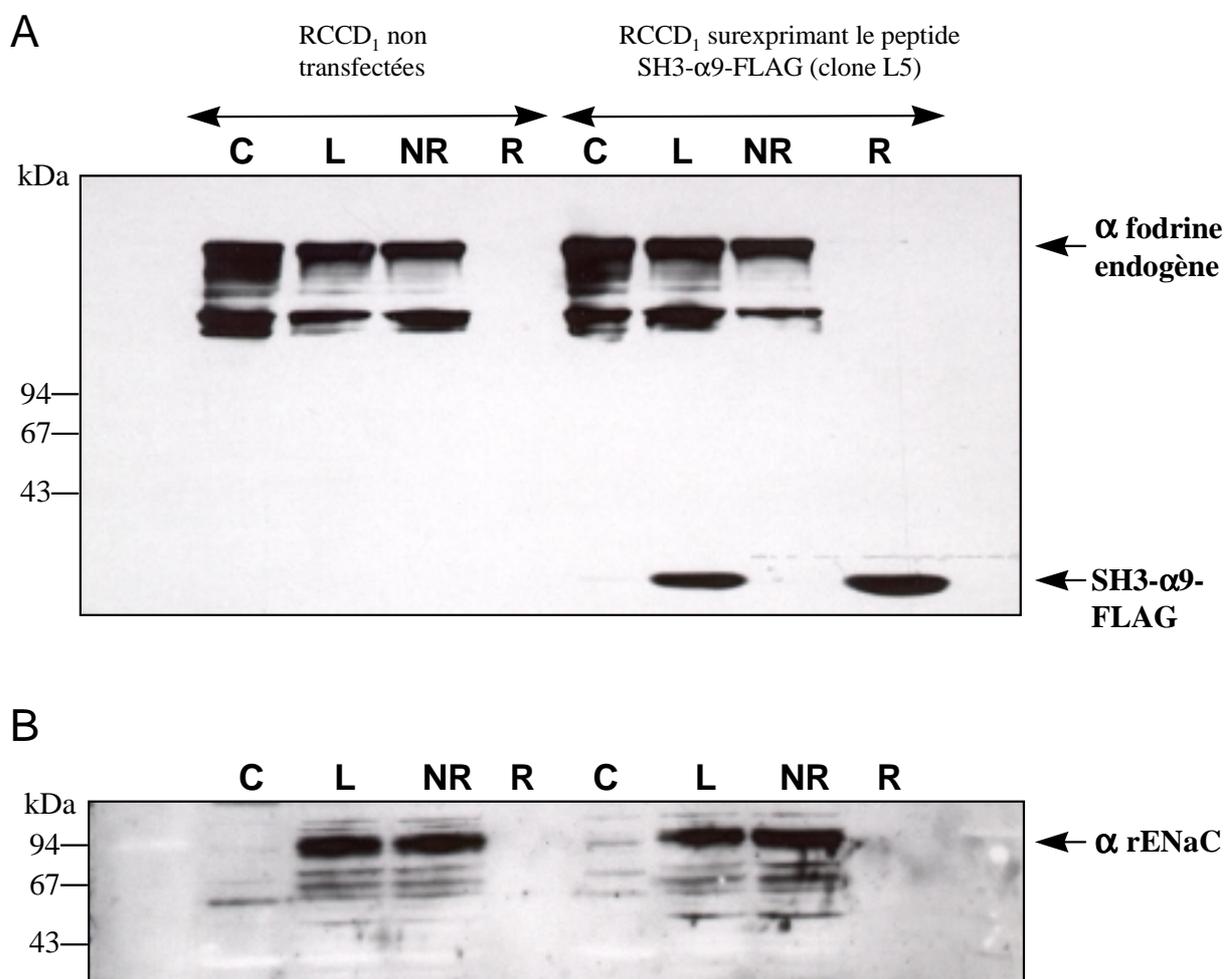


Figure 17

Immunoprécipitation du peptide SH3- α 9-FLAG

A - Immunotransfert révélé par des anticorps anti-SH3 fodrine au 1/10 000 ;

B - La même membrane a été révélée avec des anticorps anti- α rENaC (partie N-terminale) au 1/5 000. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes. C : culot insoluble correspondant aux protéines insolubles dans le tampon de lyse ; L : lysat cellulaire de départ correspondant aux protéines solubilisées avec le tampon de lyse ; NR : fraction non retenue sur les billes de CL-4B couplées à l'anticorps monoclonal anti-FLAG ; R : fraction retenue sur ces mêmes billes.

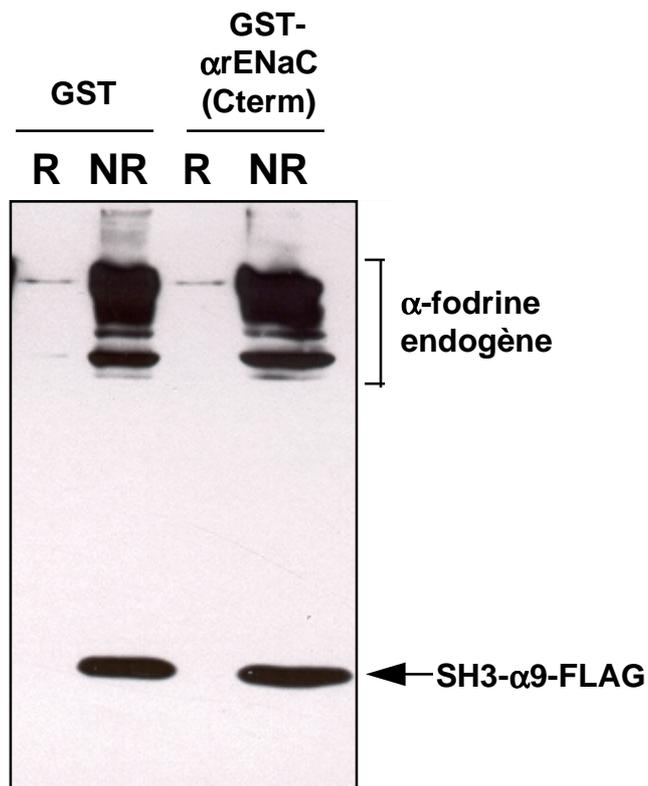


Figure 18

Étude de l'interaction entre α ENaC et le domaine SH3 de la fodrine par rétention d'un lysat cellulaire sur colonne d'affinité

Les protéines sont séparées par SDS-PAGE sur un gel acrylamide (gradient 5-15 %). Après transfert sur membrane, la chaîne α de la fodrine et le peptide SH3- α 9-FLAG ont été révélés avec des anticorps purifiés anti-SH3 fodrine (1/1 000 000). R : fraction retenue ; NR : fraction non retenue.

Purification du peptide GST- α rENaC(Cterm)

Ce peptide a été exprimé dans *E. coli*. Malgré l'utilisation d'une souche déficiente pour la protéase ompT, une expression à 30°C et la présence de concentrations élevées d'antiprotéases dans le tampon de lyse, une partie du peptide GST- α rENaC(Cterm) est protéolysée (Figure 19, page 95, ligne 1).

Interaction *in vitro*

Après incubation de la GST ou du peptide GST- α rENaC(Cterm) couplés à des billes de sépharose CL-4B avec le lysat cellulaire du clone L5 à 4°C pendant 4 heures, les protéines ont été collectées par centrifugation, lavées et séparées par SDS-PAGE. La révélation est réalisée par immunotransfert en utilisant des anticorps purifiés anti-SH3 fodrine. La Figure 18 (page 93) montre que ni la chaîne α de la fodrine endogène, ni le peptide SH3- α 9-FLAG surexprimé ne sont retenus sur les billes CL-4B couplées au peptide GST- α rENaC. Ces résultats étaient en contradiction avec la démonstration d'une interaction directe entre le domaine SH3 de la fodrine et α rENaC.

Les peptides recombinants SH3 précédemment décrits, SH3- α 9- α 10-(His)₆ et SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆, ont été incubés à 4°C dans des conditions peu stringentes (sans détergent) pendant 2 heures avec la GST ou la protéine de fusion GST- α rENaC(Cterm) couplées à des billes de CL-4B/glutathion. Après récupération des protéines GST ou GST- α rENaC(Cterm) par centrifugation, le complexe a été analysé par SDS-PAGE. La Figure 19 (page 95) révèle que les SH3- α 9- α 10-(His)₆ et SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ n'ont pas été retenus par la protéine GST- α rENaC.

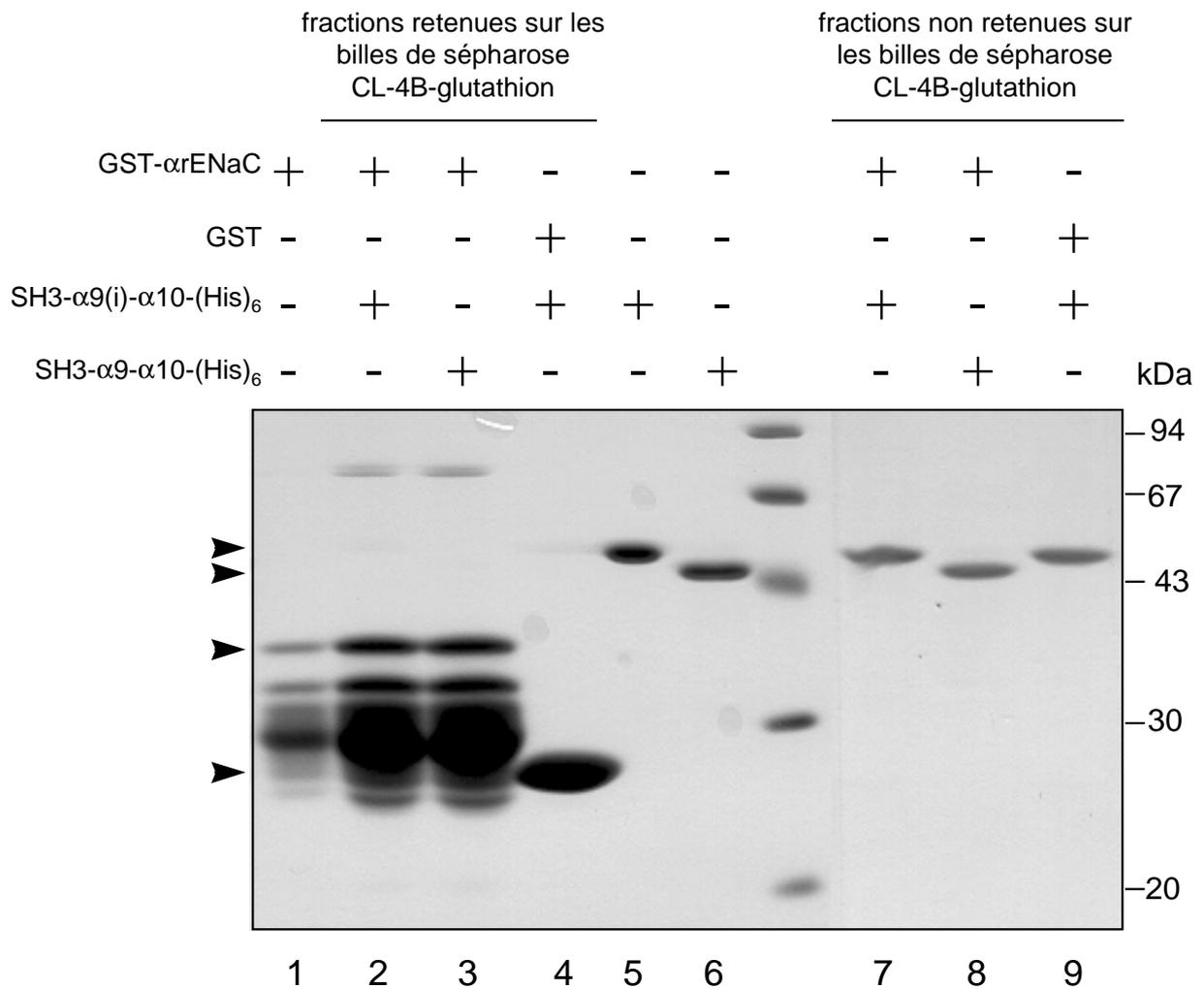


Figure 19

Étude de l'interaction entre α rENaC et le domaine SH3 de la fodrine à l'aide de peptides recombinants

Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel acrylamide (12,5 %). La quantité de peptides α 9(i)- α 10-(His)₆ et SH3- α 9- α 10-(His)₆, déposés dans les lignes 5 et 6, respectivement, est de 5 μ g.

2.3. Recherche d'autres partenaires du domaine SH3

Nos résultats n'ayant pas permis de confirmer une interaction directe entre le domaine SH3 et α ENaC, nous avons entrepris d'identifier plus précisément la nature du ou des partenaires du domaine SH3 de la fodrine en criblant, par la technique du double-hybride, une banque d'expression de rein de rat en utilisant le domaine SH3 comme appât. Les résultats de coimmunoprécipitation entre le canal et la fodrine obtenus par Rotin *et coll.* (1994) n'excluaient pas l'existence d'un ou plusieurs partenaires intermédiaires entre la fodrine et le canal. Afin de rechercher l'existence de ces partenaires intermédiaires, Laurence Malbert-Colas, dans le laboratoire, a parallèlement criblé cette même banque en utilisant la partie C-terminale (acides aminés Arg₆₁₆ à Leu₆₉₈) de α ENaC comme appât.

2.3.1. Description du système double-hybride

Une description simple d'un facteur activateur de la transcription le réduit à la somme de deux domaines structurellement et fonctionnellement distincts :

1. un domaine de liaison à l'ADN (DLA) servant exclusivement à ancrer le facteur transcriptionnel sur des séquences spécifiques appelées opérateurs, situées dans les promoteurs ;
2. un domaine d'activation de la transcription (DA) incapable de se lier à l'ADN mais dont le rôle est de recruter le complexe ARN polymérase II, lui permettant de transcrire le gène situé en aval des opérateurs.

Le facteur de transcription perd sa fonction lorsque ces deux domaines sont séparés. Le système dit du double-hybride est une technique de clonage par interaction protéique *in vivo*, dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, exploitant judicieusement la structure bipartite des facteurs activateurs de la transcription. Le DLA (dans notre cas, il s'agit de la protéine bactérienne LexA) est fusionné à une protéine dite « appât » et le DA (dans notre cas, il s'agit du domaine d'activation de la transcription de la protéine de levure GAL4, GAL4DA) à une protéine ligand. L'interaction entre les deux partenaires protéiques permet de rapprocher les deux domaines et de recréer ainsi un facteur activateur de la transcription hybride capable d'induire l'expression de gènes rapporteurs placés sous le contrôle d'un promoteur contenant un ou plusieurs opérateurs reconnus par le DLA (Fields et Song, 1989 ; Chien *et coll.*, 1991). Les gènes rapporteurs de l'interaction entre l'appât et le ligand que nous avons utilisés sont *HIS3* et *lacZ*. Le premier permet de réaliser une sélection grâce à une auxotrophie nutritionnelle alors que le deuxième permet de détecter cette même interaction grâce à un test colorimétrique.

Dans le cas d'une recherche de partenaires protéiques capables d'interagir avec une protéine appât donnée, la séquence de GAL4DA est fusionnée à une banque d'ADNc provenant d'un organe, d'un tissu, ou d'une lignée cellulaire (Figure 20, page 97).

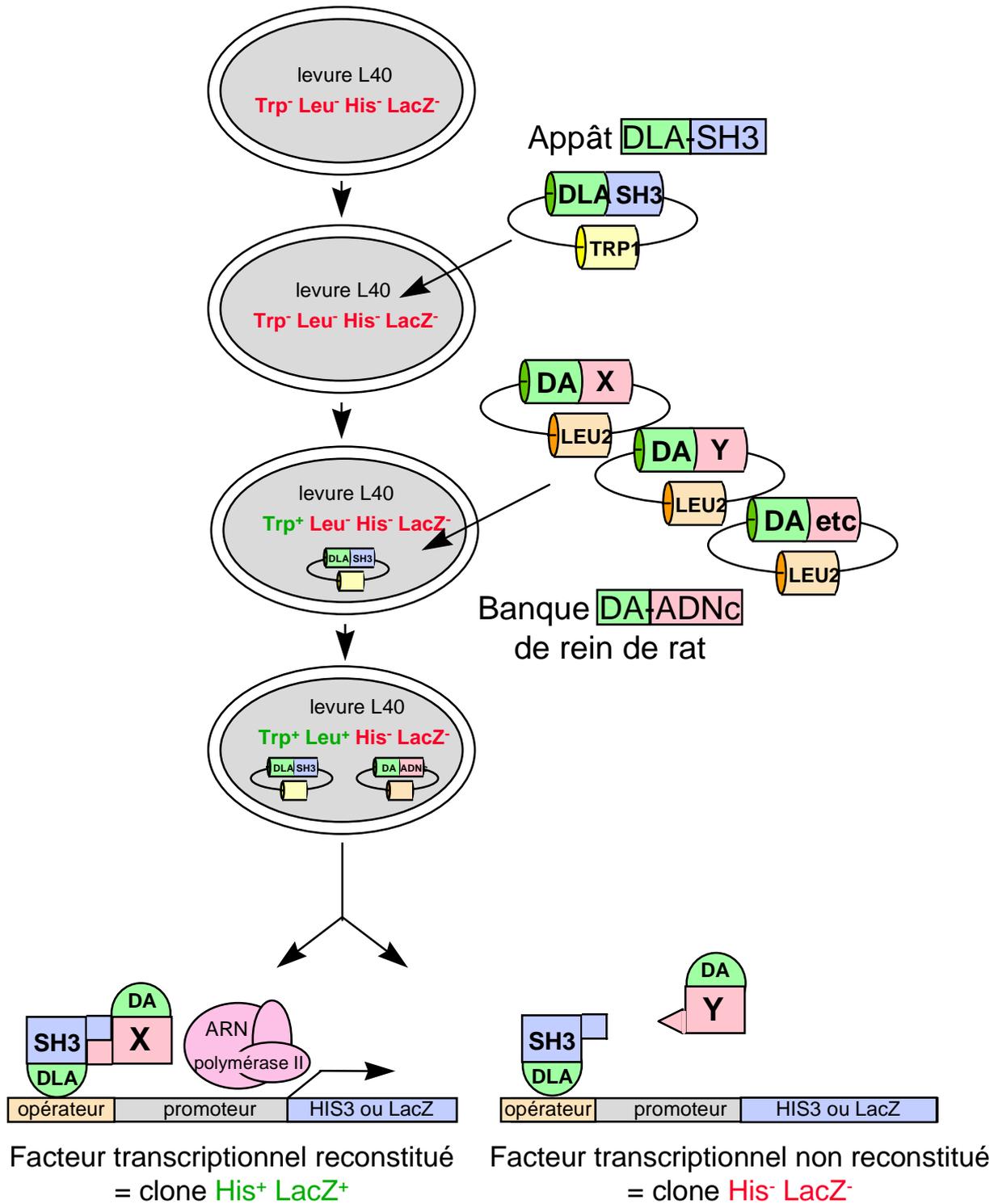


Figure 20

Crible d'une banque d'expression d'ADNc de rein de rat par la technique du double-hybride en utilisant le domaine SH3 de la fodrine comme appât

DA : domaine activateur de la transcription (provenant de la protéine GAL4 dans notre cas) ;
DLA : domaine de liaison à l'ADN (protéine LexA dans notre cas).

Choix du système

Nous avons utilisé un vecteur, pLex10, permettant de fusionner la protéine appât à la protéine LexA de *E. coli*. Dans la souche de levure L40 utilisée pour le crible, quatre et huit opérateurs pour LexA sont situés respectivement en amont des gènes rapporteurs *HIS3* et *lacZ*. Les ADNc de la banque de rein de rat ont été clonés dans le vecteur pGAD3S2X, en 3' de la séquence de GAL4DA.

Analyse du bruit de fond et de l'expression de la protéine hybride LexA-SH3_{fod}

La séquence codante pour la séquence minimum formant le domaine SH3 de la fodrine (acides aminés Glu₉₇₀ à Pro₁₀₂₆) a été introduite dans le vecteur pLex10 ce qui permet ainsi l'expression du peptide LexA-SH3_{fod}. La technique du double-hybride reposant exclusivement sur la création d'un activateur transcriptionnel hybride, il est indispensable de vérifier que le peptide appât (le domaine SH3 de la fodrine) ne possède pas d'activité transcriptionnelle intrinsèque qui pourrait lui permettre de transactiver les différents gènes rapporteurs, sans la présence de protéine ligand fusionnée au domaine de transactivation. Ceci avait déjà été réalisé, par Catherine Fournier dans le cadre de son travail de thèse (1998). D'autres constructions plus longues avaient été préparées, contenant notamment l'unité conformationnelle $\alpha 9$. Elles n'ont pas été utilisées du fait d'un bruit de fond élevé.

Il convenait également de vérifier, avant la réalisation du crible, que la protéine appât était bien exprimée et de façon stable dans la levure. Ceci a été réalisé sur un lysat protéique de levure L40 transformée avec le plasmide pLex10:SH3_{fod} par immunotransfert en utilisant soit des anticorps anti-LexA, soit des anticorps purifiés anti-SH3 fodrine. Une protéine de taille attendue (29,4 kDa) était détectée spécifiquement dans les deux cas (Figure 21, page 99). La détection avec les anticorps anti-SH3 fodrine montrait qu'une partie importante du peptide LexA-SH3_{fod} était protéolysée. Cependant, la protéolyse a pu avoir lieu au moment de la préparation du lysat protéique.

Le peptide LexA-SH3_{fod} ne possédant pas d'activité transcriptionnelle intrinsèque et étant correctement exprimé dans la levure, le criblage de la banque d'expression d'ADNc était réalisable.

Crible d'une banque d'expression d'ADNc de rein de rat par le système du double-hybride

La banque utilisée a été réalisée au laboratoire par Laurence Malbert-Colas. Il s'agit d'une banque oligo(dT) de rein total de rat (Sprague Dawley) contenant environ $2,7 \times 10^6$ clones bactériens indépendants. Les ADNc ont été clonés aux sites *EcoRI* et *XhoI* dans le vecteur pGAD3S2X. 98 % des clones bactériens possèdent un ADNc et la taille moyenne des inserts est d'environ 1 250 pb.

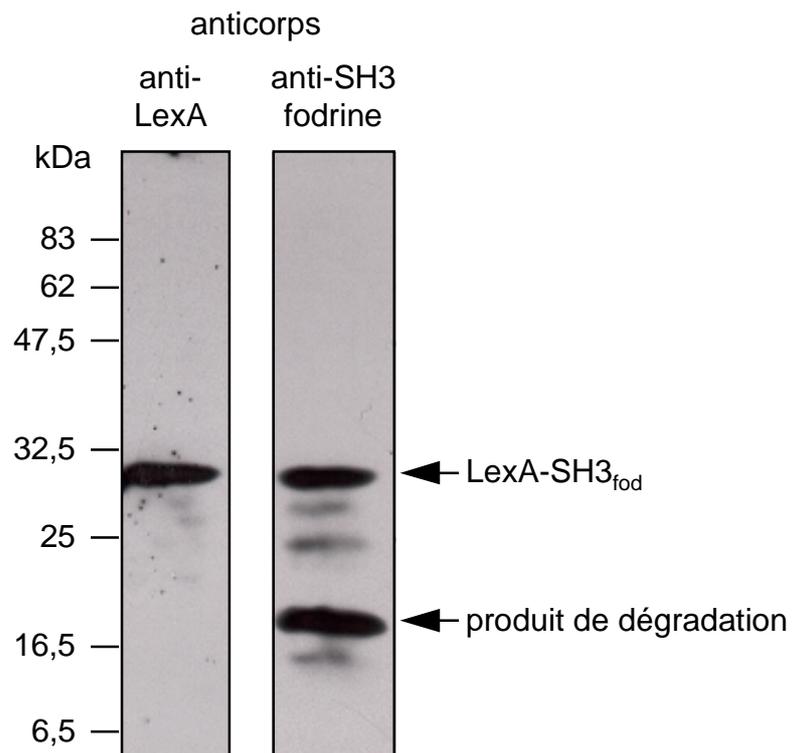


Figure 21

Vérification par immunotransfert de l'expression, dans la levure, du peptide LexA-SH3_{fod}

L'extrait protéique de levures L40 transformées avec le plasmide pLex10:SH3_{fod} a été préparé comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide 12,5 % puis transférées sur membrane de PDVF pour analyse par immunotransfert. La révélation a été faite avec des anticorps monoclonaux anti-LexA à 100 ng/μl ou des anticorps purifiés anti-SH3 fodrine au 1/500 000.

La souche de levure L40, préalablement transformée avec le plasmide pLex10:SH3_{fod} a été transformée avec 100 µg de plasmide de la banque. Le rendement de transformation a été estimé à $13,7 \times 10^4$ clones de levure par µg de plasmide. Nous pouvions donc nous attendre à ce que chacun des clones bactériens de la banque soit représenté en moyenne cinq fois (nombre total de clones de levure/nombre de clones bactériens de la banque) à l'issue du crible, ce qui permettait de conserver la complexité de notre banque. Ces clones ont été placés sur un milieu dépourvu de tryptophane, de leucine et d'histidine (DO-WLH). Les premières colonies sont apparues après trois jours d'incubation à 30°C sur DO-WLH. Au total, 1 258 clones auxotrophes pour le tryptophane, la leucine et l'histidine (Trp⁺ Leu⁺ His⁺) ont été repiqués sur de nouvelles boîtes DO-WLH afin de déterminer l'expression du deuxième gène rapporteur, *lacZ*. Parmi ceux-ci, 309 étaient LacZ⁺. La Figure 22 (page 101) montre un exemple du test β-galactosidase obtenu sur une partie des clones.

2.3.2. Analyse des clones Leu⁺ Trp⁺ His⁺ LacZ⁺

Amplification par PCR des ADNc et digestion par *MboI* et *AluI*

Le nombre de clones Leu⁺ Trp⁺ His⁺ LacZ⁺ étant élevé, nous souhaitions d'abord classer les clones redondants en familles, ceci afin de minimiser le travail ultérieur d'identification. Pour cela, nous avons préparé l'ADN plasmidique de 30 clones de levure sélectionnés au hasard (il s'agit des 30 derniers clones parmi les 309 clones positifs) et amplifié les ADNc qu'ils contiennent par PCR avec les amorces et pGAD793-S et promT7-AS. Les produits d'amplification ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction *MboI* ou *AluI*, qui reconnaissent des sites de 4 paires de base, GATC et AGCT respectivement. En raison de la courte taille des sites de reconnaissance des deux enzymes utilisées, chaque fragment amplifié devait être digéré en plusieurs fragments de restriction par ces enzymes (théoriquement, un site pour environ 200 pb). Les clones ont pu ainsi être classés par famille après analyse et comparaison des profils de digestion *MboI* et *AluI*.

L'analyse des fragments amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose a montré d'une part que les ADNc issus du crible avaient une taille comprise entre 800 pb et 3 000 pb, confirmant la qualité de la banque, et d'autre part qu'un clone unique de levure pouvait posséder plusieurs ADNc (Figure 23A, page 102). Ceci est dû au fait qu'il n'existe pas de phénomène d'exclusion des plasmides dans la levure, à l'inverse de ce que l'on observe chez les bactéries. Chaque fragment PCR amplifié a d'abord été digéré par *AluI* puis classé par rapport aux autres, en fonction de son profil de digestion. Une deuxième digestion des produits PCR par *MboI* a été réalisée afin de confirmer ou non les résultats obtenus avec *AluI*. La Figure 23 (page 102) montre les résultats obtenus pour les 30 premiers clones analysés. Malgré des profils de digestion relativement complexes, certaines familles de clones ont pu être établies (Figure 23, page 102).

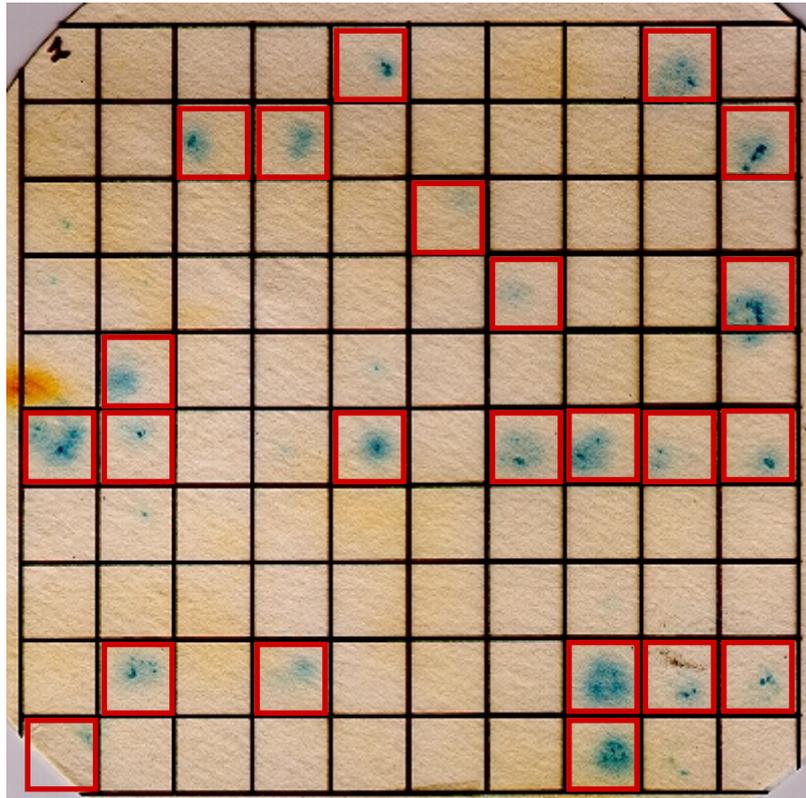


Figure 22

Exemple de l'analyse des clones $Trp^+ Leu^+ His^+$ par expression du deuxième gène rapporteur $LacZ$

Les 1 258 clones $Trp^+ Leu^+ His^+$ sont repiqués sur des disques de papier Whatman préalablement posés sur des boîtes DO-WL. Le test $LacZ$ sur filtre en présence de X-gal est réalisé comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les colonies positives $LacZ^+$ développent une coloration bleue après 8 heures d'incubation à 30°C. Les clones encadrés de rouge ont été sélectionnés.

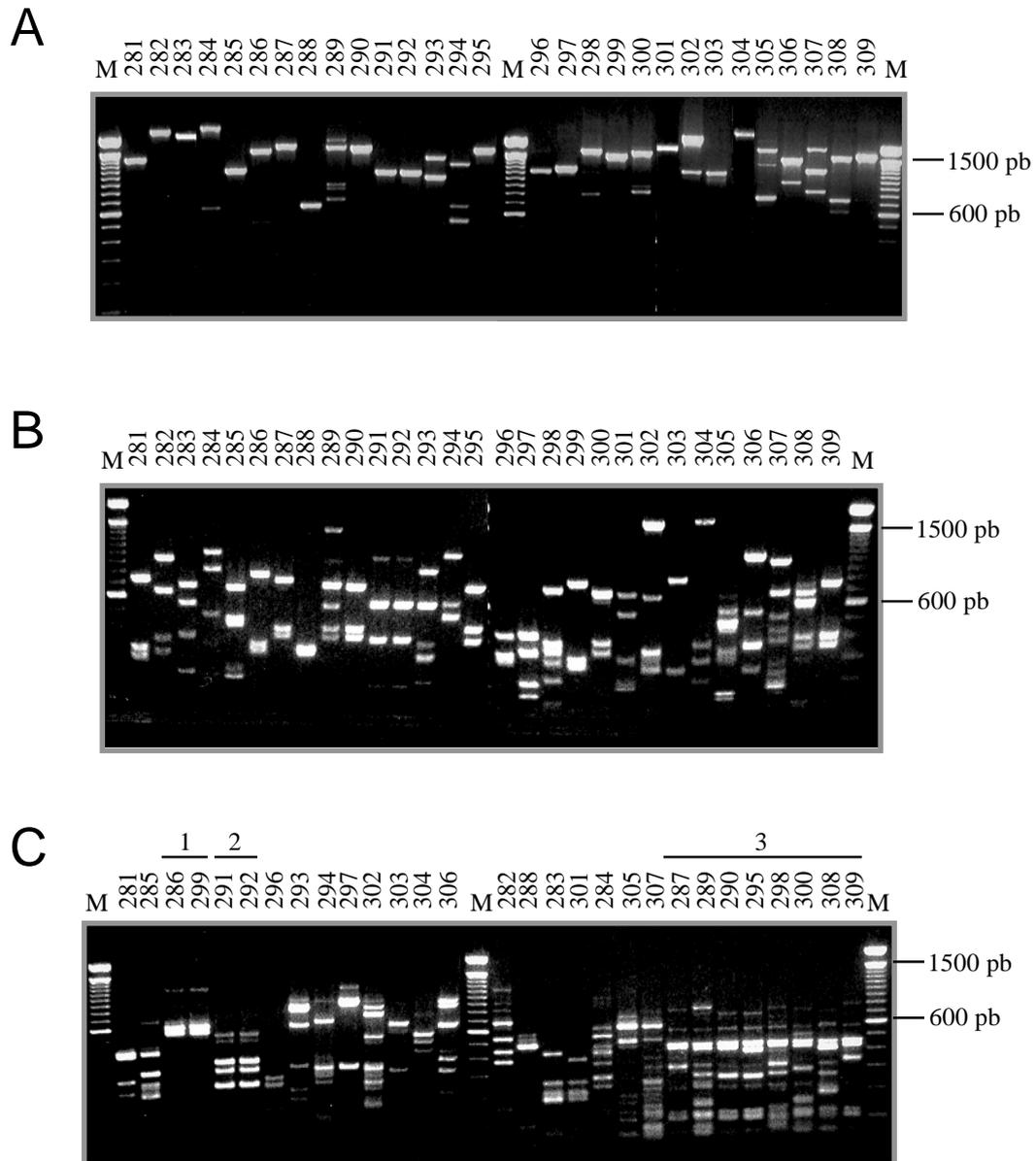


Figure 23

Digestion des ADNc par AluI et MboI

L'ADN plasmidique des 30 derniers clones Trp^+ Leu^+ His^+ $LacZ^+$ est amplifié avec les amorces pGAD793-S et promT7-AS (A) et digéré soit par AluI (B) soit par MboI (C). Sur le profil C sont indiquées trois familles (numérotées de 1 à 3) de clones présentant des profils de digestion similaires par AluI et MboI.

Comme le montre la Figure 23 (page 102), les clones issus du crible présentaient une ou plusieurs bandes après amplification par PCR. Les clones ne présentant qu'une seule bande (un seul plasmide présumé) ont été traités comme indiqué sur la stratégie n°1 de la Figure 24 (page 104). Pour les clones présentant plusieurs bandes par PCR (plusieurs plasmides), il était nécessaire de séparer individuellement les différents plasmides afin de déterminer lequel d'entre eux était responsable du phénotype His⁺ LacZ⁺. Ceci a été réalisé comme indiqué sur la stratégie n°2 de la Figure 24.

Identification des clones par séquençage

Un membre de chaque famille ainsi que tous les clones isolés ont été séquencés à partir des produits PCR purifiés. Les séquences ont été réalisées en utilisant l'amorce pGAD793-S située juste en amont de l'ADNc d'intérêt. Les séquences obtenues ont été identifiées grâce à une recherche dans les banques de données informatiques à l'aide du logiciel BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - version 2.0) du NCBI utilisable sur Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast>). Il s'agit d'un algorithme déterminant la similarité entre une séquence nucléique ou protéique et les séquences disponibles dans les banques de données informatiques. Cette première recherche dite « non redondante » permettait de vérifier si l'ADNc était disponible dans les banques GenBank, EMBL, DDBJ et PDB. Dans le cas où la séquence soumise n'était pas retrouvée dans ces banques, une deuxième recherche était réalisée dans la banque dbEST contenant toutes les séquences EST (*Expressed Sequence Tag* ; séquences nucléotidiques générées à partir des extrémités de clones d'ADNc sélectionnés au hasard) des banques GenBank, EMBL et DDBJ.

Étude de la fréquence des clones par hybridation

Une fois les premières séquences connues, nous avons choisi d'identifier rapidement les différents clones redondants par hybridation en utilisant une sonde marquée au [α -³²P]dCTP correspondant à l'ADNc séquencé. Les sondes ont été préparées à partir des produits d'amplification obtenus avec les amorces pGAD793-S et promT7-AS. Les produits PCR ont été digérés par *EcoRI* et *XhoI* puis purifiés sur gel d'agarose afin d'éliminer les séquences plasmidiques qui bordent l'ADNc et qui aurait pu augmenter le bruit de fond. La sonde obtenue a été ensuite utilisée pour hybrider les trois membranes Hybond-N⁺ contenant l'ADN des 309 clones Leu⁺ Trp⁺ His⁺ LacZ⁺. Cette technique s'est révélée très efficace pour éliminer rapidement les clones redondants. Nous avons par exemple identifié sans ambiguïté 78 clones parmi les 309 clones Leu⁺ Trp⁺ His⁺ LacZ⁺ (25 %) grâce à la sonde 287 (Figure 25, page 105).

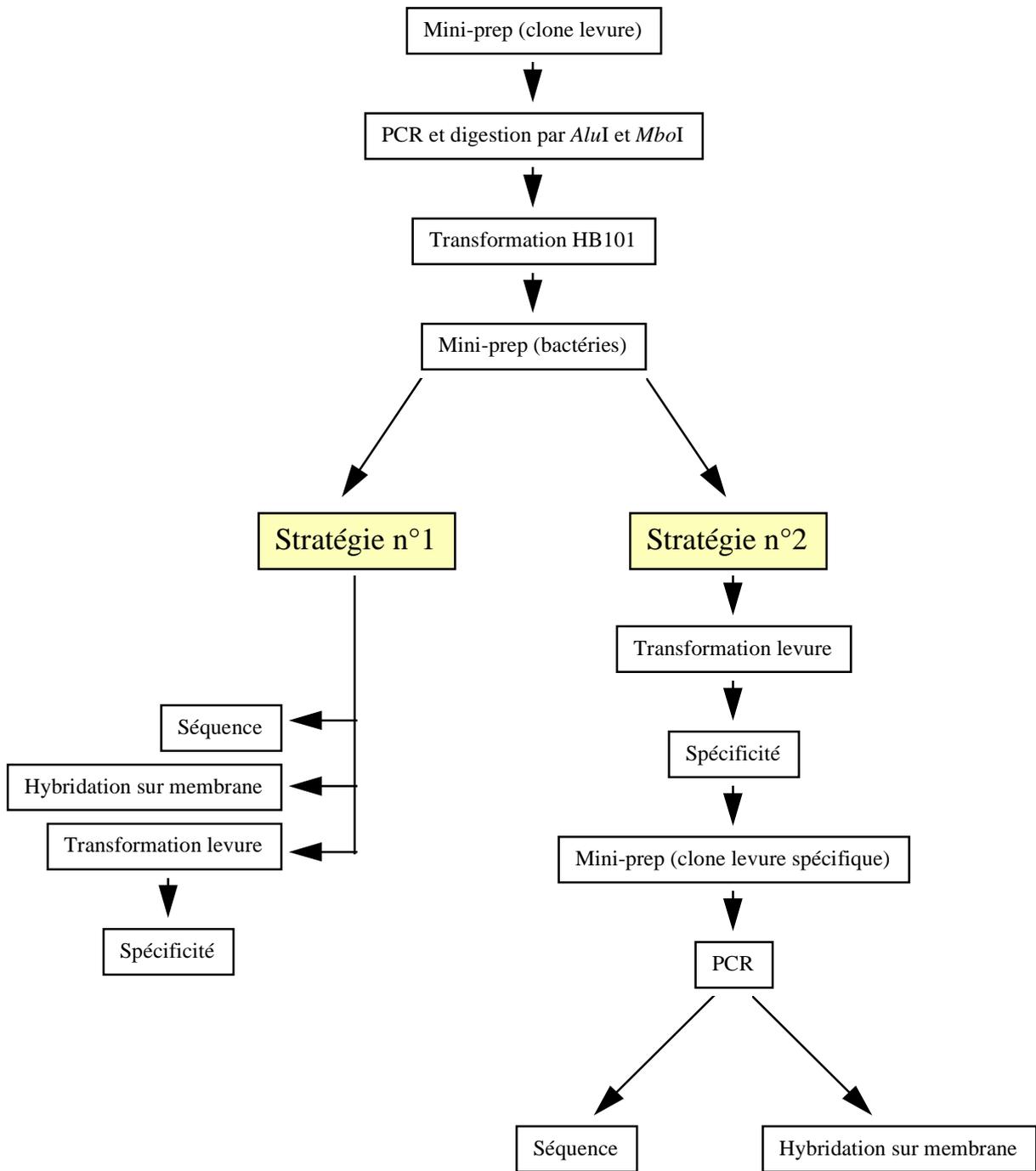


Figure 24

Stratégies employées pour l'identification des clones $Leu^+ Trp^+ His^+ LacZ^+$.

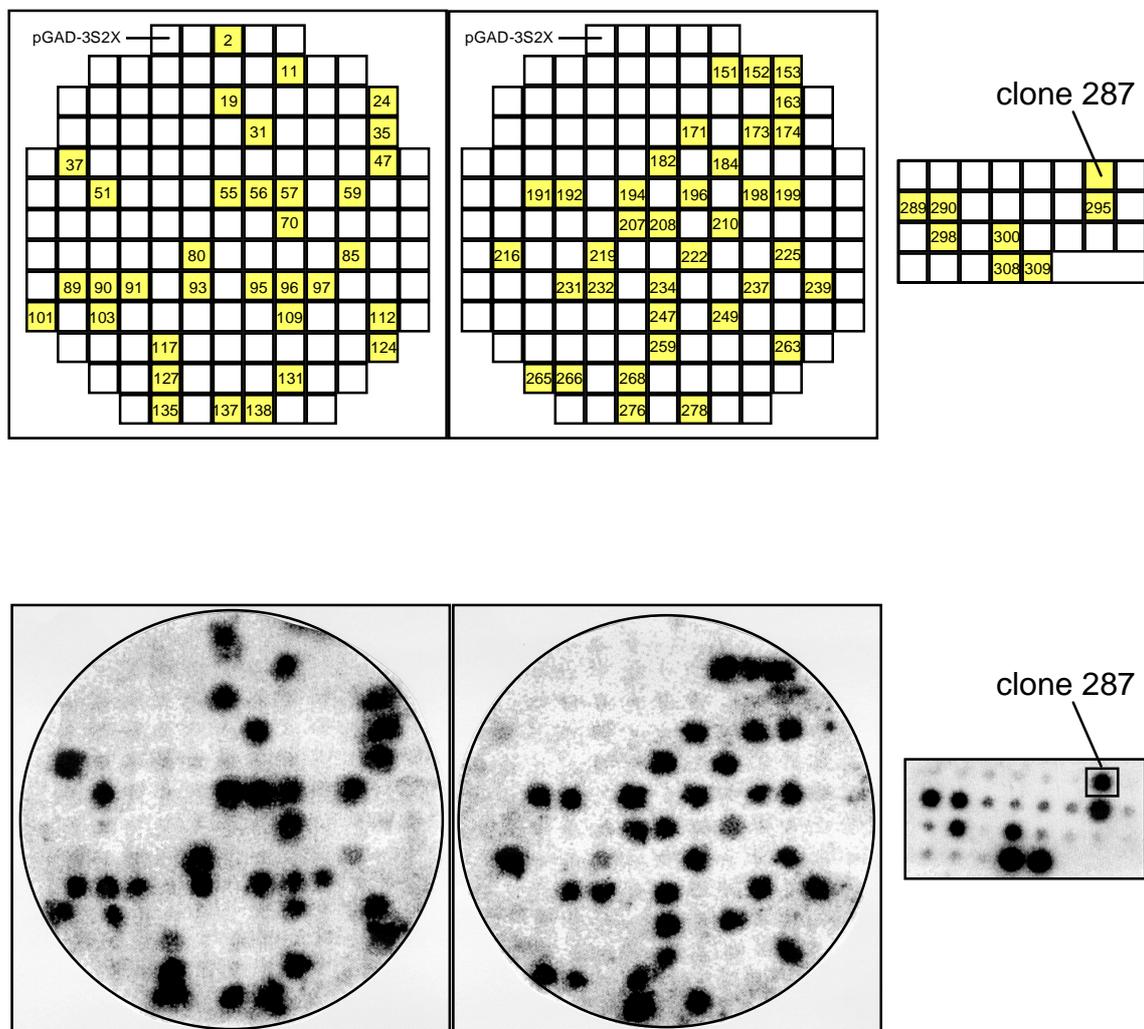


Figure 25

*Analyse des clones Leu^+ Trp^+ His^+ $LacZ^+$
par hybridation avec une sonde marquée au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$*

Pour chaque hybridation, le vecteur pGAD-3S2X est utilisé comme contrôle négatif et le clone correspondant à la sonde (ici 287) comme contrôle positif.

Commentaires

La comparaison des résultats obtenus après digestion par *AluI* et *MboI* avec ceux établis par hybridation sur membrane a montré des discordances. Certains clones ont été identifiés par hybridation alors qu'il semblait impossible de les regrouper en analysant leur profil de digestion. Par exemple, les clones 284, 305 et 307 sont hybridés par la sonde 284 alors qu'ils présentaient des profils de digestion différents (Figure 23, page 102). Ceci s'explique par les faits suivants :

- d'une part les clones qui possèdent plusieurs ADNc ont des profils de digestion très complexes dus à la digestion simultanée de tous les ADNc amplifiés ;
- d'autre part, les ADNc issus d'un même gène peuvent avoir des tailles variables à cause de l'élongation plus ou moins importante réalisée par la transcriptase inverse au moment de la réalisation de la banque d'ADNc. Ils auront donc là encore des profils de digestion différents ;
- enfin il faut ajouter qu'il peut exister, pour un gène donné, plusieurs isoformes dues à des mécanismes d'épissage alternatif d'exons. Le profil de digestion d'un ADNc par une enzyme de restriction sera donc différent selon la présence ou l'absence d'un ou plusieurs exons.

Ces trois éléments pouvant être combinés, cela accentue encore la difficulté d'interprétation des profils de digestion. Malgré cette difficulté, l'analyse des profils de digestion des clones obtenus après le crible nous a permis d'identifier rapidement un certain nombre de sondes et de séquences à faire en priorité. En outre, cette technique de PCR/digestion est aisée et rapide.

Le test de spécificité, qui sera décrit plus loin, nous a rapidement montré que certains ADNc choisis pour la séquence n'étaient pas spécifiques de l'appât. Présumés ne contenir qu'un seul plasmide en raison d'une bande unique après amplification par PCR, ces clones contenaient en fait d'autres plasmides non amplifiés par PCR. Ceci était principalement dû aux biais d'amplification des ADNc, notamment à partir des préparations plasmidiques des clones de levure possédant plusieurs plasmides. En effet, l'amplification de chaque ADNc dépend de sa représentativité dans la préparation plasmidique par rapport aux autres ADNc puisque chacun d'eux est en compétition avec les autres pour le même couple d'amorces. La longueur de l'ADNc est également un paramètre important car un ADNc de grande taille est généralement plus difficile à amplifier qu'un ADNc de petite taille. Enfin, le pourcentage de paires de base G-C de l'ADNc peut aussi influencer son amplification.

Par exemple, l'amplification par PCR de l'ADNc du clone 282 montrait une bande unique d'une taille supérieure à 2 000 pb (Figure 23, page 102). Le test de spécificité réalisé sur plusieurs sous-clones du clone initial montrait qu'il existait en fait deux populations de plasmides : l'un, spécifique contenant un ADNc de 1 100 pb interagissant avec LexA-SH3_{fold} et l'autre, non spécifique contenant un ADNc supérieur à 2 000 pb.

La PCR n'est donc pas le bon outil pour analyser le nombre de plasmides présents dans chaque clone. Ce cas n'étant pas isolé, nous avons décidé de vérifier systématiquement la spécificité de chaque ADNc avant de procéder à son analyse par séquençage/hybridation sur membrane (Figure 24, page 104, stratégie n°2). Cette technique s'est révélée plus efficace.

Résumé

En combinant les techniques de PCR, de digestion par *AluI* et *MboI*, d'hybridation sur membrane et de séquençage, la première série d'identification réalisée à partir de 30 clones nous a permis d'identifier un total de 248 clones regroupés en 13 familles différentes (le numéro des familles correspond au premier clone identifié : n° 281, 282, 283, 284, 285, 287, 296, 297, 299, 302, 303, 304 et 306). Grâce à une deuxième série, nous avons identifié 34 clones supplémentaires appartenant à 4 familles différentes (n° 14, 22, 39, 43). Parmi ces clones supplémentaires, quatre sont isolés (n° 32, 40, 41, et 64). Enfin, une dernière série a été nécessaire pour identifier les derniers clones. Treize clones ont été éliminés pour des raisons techniques.

Parmi tous les clones identifiés, aucun ne contenait l'ADNc de α ENaC.

2.3.3. Nature des interactions

Élimination des clones faux-positifs et test de spécificité de l'interaction

Après identification des clones $\text{Leu}^+ \text{Trp}^+ \text{His}^+ \text{LacZ}^+$, il est impératif de vérifier que l'expression des gènes rapporteurs *HIS3* et *lacZ* est bien le résultat d'une interaction entre la protéine candidate codée par l'ADNc de la banque et l'appât utilisé (le domaine SH3 de la fodrine). En effet, dans un certain nombre de clones dits faux-positifs, les gènes rapporteurs sont exprimés en l'absence d'interaction entre les protéines appât et ligand. Le plus fréquemment, ces clones possèdent des ADNc codant pour des protéines capables :

1. de transactiver seule l'expression des gènes rapporteurs en se fixant sur les séquences nucléotidiques situées en amont des promoteurs contrôlant l'expression des gènes rapporteurs ;
2. de se fixer directement sur la partie LexA de la protéine hybride appât ;
3. de stabiliser les produits du gène rapporteur (ici *HIS3*) dont il peut exister une expression illégitime et permettre ainsi la croissance des levures (Golemis et Brent, 1992) ;
4. d'induire l'expression des gènes rapporteurs en présence de la protéine LexA fusionnée à n'importe quel appât. Ces ADNc sans spécificité vis-à-vis de l'appât sont difficiles à identifier car ils sont incapables d'induire l'expression des gènes rapporteurs en présence de la protéine LexA seule (Bartel *et coll.* 1993).

Il est donc nécessaire d'éliminer les clones faux-positifs et d'évaluer la spécificité des interactions, c'est-à-dire de tester chaque ADNc vis-à-vis de plusieurs appâts, chaque interaction fournissant une information précise sur la nature de l'ADNc.

Nous avons testé chaque ADNc candidat vis-à-vis de :

1. LexA fusionnée à l'appât d'origine (domaine SH3 de la fodrine) ;
2. LexA non fusionnée à l'appât ;
3. afin d'identifier les clones faux-positifs tels que ceux décrits par Bartel *et coll.* (1993), c'est-à-dire exprimant les gènes rapporteurs quelle que soit la nature de l'appât, nous avons choisi de tester le domaine SH3 de la fodrine muté sur un résidu défini comme crucial pour sa fonction : ce résidu, P1017, situé au cœur hydrophobe du domaine SH3 (Figure 26, page 110) est conservé dans la quasi-totalité des domaines SH3. La mutation de ce résidu (P49L) dans l'un des domaines SH3 de *Sem5*, l'homologue de Grb2 chez *C. elegans*, est associé à une perte totale de sa fonction (Clark *et coll.*, 1992). Cette mutation P1017L sur le domaine SH3 de la fodrine devrait abolir l'interaction avec chaque ligand spécifique de ce domaine.

Afin de préciser la spécificité des interactions vis-à-vis du domaine SH3 de la fodrine, nous avons testé chaque ADNc en présence d'autres domaines SH3 :

- celui de la spectrine érythroïde (gène αI) ;
- la protéine de levure Scd2, *a priori*, sans relation fonctionnelle avec la fodrine mais possédant deux domaines SH3.

Enfin, nous avons testé chaque ADNc vis-à-vis de LexA fusionnée à deux autres mutants du domaine SH3 de la fodrine. La mutation E985A touche un résidu semi-conservé de la boucle RT-*Src* (Glu ou Asp) dans un très grand nombre de domaines SH3 connus (Figure 26, page 110). De nombreuses études biochimiques et biophysiques ont démontré que ce résidu était très souvent en interaction directe avec le ligand en formant une liaison ionique avec un résidu chargé positivement (Arg ou Lys) (Lim *et coll.*, 1994 ; Feng *et coll.*, 1994). Sa mutation entraîne une diminution très importante de la constante d'association entre le domaine SH3 et son ligand (Yu *et coll.*, 1994 ; Weng *et coll.*, 1995). Ce résidu est conservé dans les quatre domaines SH3 que nous avons testés (Figure 26, page 110). Enfin, nous avons choisi de muter le résidu K1002. Celui-ci, situé dans la boucle n-*Src*, n'est pas conservé et pourrait être impliqué dans la spécificité du domaine SH3 de la fodrine vis-à-vis de son ligand.

Les trois mutants ont été réalisés par la technique de mutagenèse dirigée sur le plasmide pLex10:SH3_{fod} comme cela est décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». L'expression, dans la levure, de chaque protéine LexA-SH3_{fod} mutée a ensuite été analysée par Western-blot. Ceci permettait de s'assurer qu'une absence d'interaction n'était pas due à une mauvaise expression ou à une dégradation de la protéine mutée. Les résultats (non présentés) ont montré que chaque mutant est exprimé dans la levure à un niveau comparable à la protéine LexA-SH3_{fod} non mutée.

Ces différents appâts fusionnés à LexA ont été testés simultanément par un test de conjugaison vis-à-vis de chaque partenaire retenu (Figure 8, page 65). Ce test de spécificité par conjugaison nécessite d'isoler le plasmide pGAD3S2X:ADNc du plasmide pLex10:SH3_{fod}. L'ADN plasmidique préparé à partir des clones de levure Leu⁺ Trp⁺ His⁺ LacZ⁺ a été utilisé pour transformer la souche *E. coli* HB101. Celle-ci

étant auxotrophe pour la leucine, seuls les clones bactériens ayant reçu le plasmide pGAD3S2X:ADNc pourront se développer sur un milieu sans leucine grâce au gène *LEU2* porté par le plasmide et conférant la prototrophie à la leucine. Les plasmides pGAD3S2X:ADNc ont été de nouveau préparés à partir de ces clones bactériens et réintroduits dans la souche de levure L40. La souche de levure complémentaire AMR70 a été transformée par les différents plasmides pLex10:appât.

Un exemple du test *HIS3* est présenté sur la Figure 27 (page 111).

Définition des groupes de spécificité

À partir des résultats d'expression du gène *HIS3* obtenus par conjugaison, nous avons choisi de classer les différents partenaires issus du crible dans cinq groupes de spécificité différentes (Tableau 7, page 112) :

- le groupe 1 rassemble les clones présentant le phénotype His⁺ uniquement en présence de l'appât SH3 fodrine. Ils sont His⁻ avec les appâts SH3 spectrine et Scd2 ;
- le groupe 2 correspond aux clones His⁺ en présence des appâts SH3 fodrine et spectrine mais His⁻ avec Scd2 ;
- le groupe 3 correspond aux clones His⁺ avec les appâts SH3 fodrine, SH3 spectrine et la protéine Scd2 ;
- le groupe 4 correspond aux clones qui n'interagissent plus avec le domaine SH3 de la fodrine dans le test de conjugaison mais qui conservent une interaction avec les appâts SH3 spectrine et/ou Scd2 ;
- enfin, le groupe 5 correspond aux clones faux-positifs c'est-à-dire aux clones His⁺ testés en l'absence d'appât (LexA seule) et His⁺ avec la protéine LexA-SH3_{fod} P1017L.

Les résultats ont montré que tous les ADNc testés, à l'exception de la famille 285 (groupe 5), n'étaient plus capables d'induire le phénotype His⁺ lorsque le domaine SH3 de la fodrine est muté sur le résidu P1017. Ces résultats suggèrent que chacune des protéines des groupes 1 à 4 sont des partenaires spécifiques de domaines SH3 dans la levure, et non des clones faux-positifs tels que ceux décrit par Bartel *et coll.* (1993).

L'ensemble des résultats d'identification (séquençage, spécificité et hybridation sur membrane) obtenus est regroupé dans le Tableau 8, page 113.

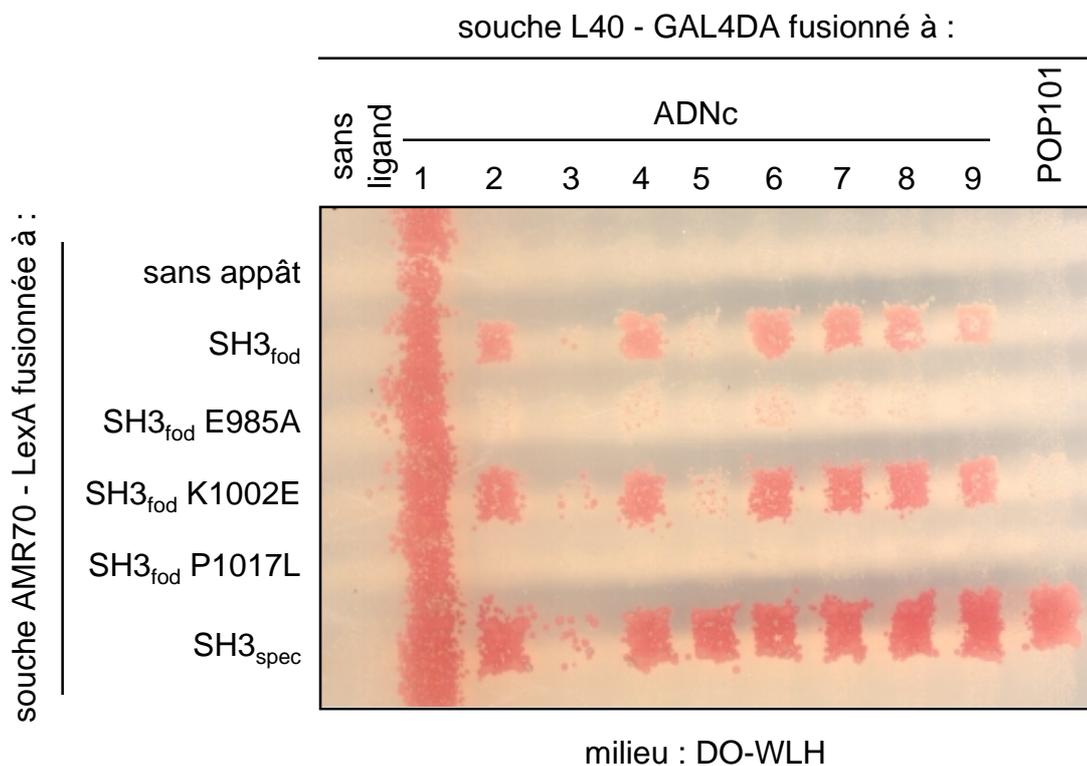


Figure 27

Exemple de test de spécificité par conjugaison

La souche de levure L40 a été transformée avec une préparation de plasmides contenant les plasmides pGAD3S2X:ligand tandis que la souche de levure AMR70 a été transformée avec les plasmides pLex10 contenant les différents appâts. La spécificité des ADNc a été testée par conjugaison comme cela est indiqué dans la partie « Matériels et Méthodes ». On voit ici au moins quatre populations différentes d'ADNc : un ADNc majoritaire qui interagit avec les appâts LexA:SH3_{fod}, LexA:SH3_{fod} K1002E et LexA:SH3_{spec} (n°2, 4, 6, 7, 8 et 9), un ADNc qui interagit uniquement avec LexA:SH3_{spec} (n°5), un ADNc qui n'interagit avec aucun appât (n°3), et un ADNc ayant acquit le phénotype Trp⁺ Leu⁺ His⁺ spontanément (n°1).

Groupe	LexA fusionnée à :				
	aucun appât	SH3 _{fod}	SH3 _{fod} P1017L	SH3 _{spec}	Scd2
1	-	+	-	-	-
2	-	+	-	+	-
3	-	+	-	+	+
4	-	-	-	+	+ ou -
5	+	+	+	+	+

Tableau 7

Les différents groupes de spécificité.

Chaque plasmide pGAD3S2X:ADNc ou pLex10:appât a été transformé dans la souche de levure L40 (MAT a) ou AMR70 (MAT α), respectivement. Après conjugaison, l'interaction entre chaque ADNc et chaque appât a été testée par la capacité des diploïdes à pousser (+) ou non (-) sur milieu DO-WLH. Les différentes combinaisons d'interaction d'un ADNc avec les appâts nous ont permis de créer cinq groupes de spécificité (voir texte).

N° ID	Identification	Nombre total de clones
-------	----------------	------------------------

Groupe 1

287	Isoforme A de la phosphotyrosyl protéine phosphatase de faible poids moléculaire (rat ; gb: AF171072) ^a	78
296	Phosphotyrosyl protéine phosphatase PTP-TD14 (rat ; gb:AF175208) ^a	9
306	EST (souris ; gb:AA270425) - le produit de traduction de l'ADNc 306 présente 46 % d'identité avec le produit du gène KIAA0512	4

Groupe 2

302	Aucune homologie avec les séquences des banques de données	7
-----	--	---

Groupe 3

3	EST (homme ; gb:W39473)	1
14	RNB6 ou Evl (rat ; gb:U70211)	9
22	N-WASP, protéine de dépolymérisation de l'actine (rat ; gb:D88461)	6
32	EST (homme ; gb:AC004797)	1
41	ATFx (souris ; gb:AB012276)	1
64	Cycline T (homme ; gb:AF045161)	1
281	Cbl-b (homme ; gb:AF199504) ^a	10
282	Protéine riche en proline 48 (souris ; gb:AF020313) partie 3' non codante	34
283	Protéine Fr1 de la famille des formines (souris ; gb:AF006466)	31
284	e3B1 (homme ; gb:AF176784) ^a	26
297	Protéine WBP11 (<i>WW domain binding protein 11</i>) (souris ; gb:AF071186)	24
303	EST (souris ; gb:AA110245)	2
304	Protéine KIAA1014 (homme ; gb:AB023231)	6

Tableau 8

Identification des clones Trp⁺ Leu⁺ His⁺ LacZ⁺

(suite du tableau page suivante)

N° ID	Identification	Nombre total de clones
Groupe 4		
18	EST (rat ; gb:A1178804)	1
39	eps8 (souris ; gb:L21671)	15
40	EST (souris ; gb:AA726183)	1
43	EST (souris ; gb:AA967047)	2
76	Protéine à doigt de zinc (souris ; gb:U14556)	4
86	HYA22 (homme ; gb:D88153)	1
88	EST (homme ; gb:AA262785)	1
98	p53BP2 (homme ; gb:U09582)	1
157	EST (souris ; gb:AA388728)	2
158	SATB1 (souris ; gb:U05252)	1
299	Importine α S2 (souris ; gb:AF020773)	4
Groupe 5 (faux-positif)		
285	Protéine inconnue homologue avec des protéines possédant des motifs en doigts de zinc	13

Tableau 8 (suite)

Identification des clones Trp^+ Leu^+ His^+ $LacZ^+$

Les familles sont classées selon leur groupe de spécificité (voir Tableau 7, page 112). Le numéro d'identification de la famille correspond au premier clone identifié appartenant à celle-ci. Pour chaque famille sont indiqués :

1. le nom de l'ADNc présentant la même séquence nucléique que l'insert plasmidique du clone avec le numéro d'accèsion dans la banque de donnée informatique GenBank ;
2. l'espèce dont la séquence est issue ;
3. le nombre de clones révélés par une sonde [α - ^{32}P]dCTP spécifique de ce clone.

^a : ces numéros d'accèsion correspondent aux séquences que nous avons réalisées au laboratoire et soumises dans GenBank.

2.3.4. Les clones non spécifiques du domaine SH3 de la fodrine

Groupe 4

Le test de spécificité réalisé par conjugaison révèle que plusieurs clones ont perdu le phénotype His⁺ c'est-à-dire l'interaction avec le domaine SH3 de la fodrine (groupe 4). Ce résultat peut sembler surprenant car ces clones ont été sélectionnés grâce au phénotype His⁺ LacZ⁺ lors du crible de la banque. Cette divergence peut être expliquée par le fait que le crible et les tests de spécificité n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions. Dans le crible, nous avons utilisé la technique de cotransformation dans la souche de levure haploïde L40 (Figure 20, page 97). Pour le test de spécificité, nous avons utilisé la technique de conjugaison avec les souches L40 et AMR70 (Figure 8, page 65). Ces choix s'appuient sur plusieurs critères :

1. le principal avantage de la technique de conjugaison réside dans la réduction du nombre de transformations de levure nécessaires pour tester différentes interactions. Par exemple, pour tester dix ADNc vis-à-vis de sept protéines appâts différentes, la technique de cotransformation requiert 70 cotransformations afin de créer les souches de levure possédant les 70 combinaisons appât-ligand possibles. La technique de conjugaison nécessite seulement sept transformations avec les protéines appâts et dix transformations avec les protéines ligands. Les différentes combinaisons sont ensuite créées par conjugaison (Figure 8, page 65) ;
2. les rendements de transformation étant parfois relativement faibles, il peut être difficile d'obtenir des levures possédant les plasmides appâts et ligand en une seule transformation.

Ainsi, si la spécificité des interactions peut être testée par cotransformation, elle est grandement facilitée par la technique de conjugaison.

Cependant, les résultats des tests d'auxotrophie à l'histidine et β -galactosidase semblent indiquer que la technique de cotransformation est plus sensible que la technique de conjugaison. Ces données pourraient expliquer pourquoi certains clones présentent un phénotype His⁺ LacZ⁺ faible (faible coloration bleue en présence de X-gal) par cotransformation (au moment du crible) sont retrouvés négatifs par la technique de conjugaison vis-à-vis du même appât (au moment du test de spécificité).

Parmi les clones appartenant au groupe 4, nous avons identifié :

- eps8, protéine substrat de protéines tyrosine kinase ;
- HYA22, protéine dont la fonction est inconnue ;
- SATB1, protéine se liant à la matrice nucléaire ;
- p53BP2, protéine liant la protéine suppresseur de tumeur p53 et capable d'augmenter sa fonction de transactivation ;
- l'importine α S2, protéine impliquée dans le transport nucléaire ;
- une protéine avec des motifs en doigts de zinc ;
- cinq protéines inconnues (EST).

Considérant d'une part que la faible expression du phénotype His⁺ était le reflet d'une interaction faible entre le domaine SH3 et ces ligands et d'autre part que l'interaction était plus forte avec d'autres SH3 tels que celui de la spectrine ou ceux de la protéine Scd2, ce qui suggérait fortement qu'il ne s'agissait pas de ligands intéressants, nous avons décidé de ne pas les analyser d'avantage.

Groupe 5 (les clones faux-positifs)

Les tests de spécificité ont démontré que la famille 285 correspondait à des clones faux-positifs capables d'interagir en présence du DLA seul, non fusionné à un appât ou du DLA fusionné à n'importe quel appât, y compris le domaine SH3 de la fodrine possédant la mutation P1017L. La séquence d'un membre de cette famille a montré qu'il s'agit d'un ADNc inconnu possédant des homologies de séquences avec des protéines à motifs en doigts de zinc. La séquence protéique traduite à partir de l'ADNc du clone 285 laisse apparaître effectivement la présence de motifs en doigt de zinc. De tels motifs sont connus pour lier des séquences spécifiques d'ADN. Ils pourraient ancrer la protéine GAL4DA-ADNc sur des séquences d'ADN situées dans les promoteurs contrôlant l'expression des gènes *HIS3* et *lacZ* sans avoir recours à une interaction avec la protéine hybride LexA-appât. Notons que cet ADNc a été retrouvé dans le crible réalisé sur cette même banque de rein de rat, avec comme appât la partie C-terminale de α ENaC, ce qui confirme qu'il pourrait s'agir d'un ADNc faux-positif.

2.3.5. Les clones spécifiques du domaine SH3 de la fodrine

Groupe 1

Les partenaires appartenant à ce groupe sont très spécifiques du domaine SH3 de la fodrine (gène α II) et n'interagissent pas avec le domaine SH3 de la spectrine (gène α I). Trois familles ont été identifiées :

- la phosphotyrosyl protéine phosphatase de faible poids moléculaire (LMPTP - *Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase*) ;
- la phosphotyrosyl protéine phosphatase PTP-TD14 ;
- une protéine inconnue (EST) présentant une forte identité de séquence (46 %) avec la protéine KIAA0512, elle-même de fonction inconnue.

Groupe 2

Une seule famille fait partie du groupe 2. La séquence d'un membre de cette famille (clone 302) montre que la partie 5' de celui-ci est exclusivement composée d'une succession de bases C ou T sur une longueur de plus de 200 bases, codant potentiellement pour un polypeptide très riche en sérine et en proline. Elle pourrait correspondre à de l'ADN extragénique qui aurait contaminé légèrement les ARNm au moment de la préparation de la banque. Cette hypothèse est renforcée par l'absence d'homologie de

cette séquence avec les séquences des banques informatiques, y compris les EST. Nous avons également abandonné l'étude de cette famille.

Groupe 3

Les partenaires appartenant à ce groupe reconnaissent (phénotype His⁺) toutes les protéines LexA-SH3_{fod}, LexA-SH3_{spec} et LexA-Scd2 mais sont de phénotype His⁻ vis-à-vis des protéines LexA ou LexA-SH3_{fod} P1017L. Ces résultats suggèrent que les protéines codées par ces ADNc sont capables d'interagir avec de nombreux domaines SH3. Neuf familles ont été identifiées :

1. une protéine de dépolymérisation de l'actine (N-WASP) ;
2. RNB6, protéine impliquée dans la mobilité cellulaire par l'assemblage des filaments d'actine ;
3. cbl-b, protéine codée par un proto-oncogène ;
4. une protéine de la famille des formines (FR1) ;
5. e3B1 (*eps8 binding protein 1*), protéine régulant négativement la croissance cellulaire et préalablement identifiée comme partenaire du domaine SH3 de la spectrine ;
6. la protéine WBP11 (*WW domain binding protein 1*), préalablement identifiée comme partenaire de domaines WW ;
7. la protéine KIAA1014 de fonction inconnue ;
8. une protéine inconnue (EST). Tous les clones séquencés possèdent des ADNc partiels mais en phase avec le polypeptide GAL4DA ;
9. une dernière famille correspond à la partie 3' non codante d'une protéine riche en proline.

Enfin quatre clones isolés ont été classés dans le groupe 3 : la protéine ATFx, la cycline T et deux protéines inconnues (EST). L'analyse des séquences protéiques traduites à partir des ADNc a démontré que toutes possédaient des séquences riches en proline, y compris la famille 282 correspondant à une région non codante, ce qui pouvait expliquer le fait qu'ils puissent interagir avec des domaines SH3 différents.

2.3.6. Affinement des spécificités des groupes 1 et 3

L'interaction des deux protéines LexA-SH3_{fod} E985A et LexA-SH3_{fod} K1002E a été testée vis-à-vis de chaque ADNc par l'analyse de l'expression du gène *HIS3*, après conjugaison pour les ADNc des groupes 1 et 3, étant donné que les ADNc des autres groupes n'ont pas été retenus comme partenaires intéressants. Ce test n'a pas été réalisé pour les clones isolés du groupe 3, ni pour la famille 282 qui, comme nous l'avons déjà vu, correspond à la partie 3' non codante d'un ADNc. L'expression du gène *lacZ* a été également mesurée, grâce à un test β -galactosidase liquide, sur chaque levure diploïde, à l'exception des levures diploïdes possédant le plasmide pLex10:Scd2. Le Tableau 9 ci-dessous regroupe l'ensemble des tests d'auxotrophie à l'histidine et β -galactosidase réalisés sur les ADNc des groupes 1 et 3.

Notons que pour les familles 287 et 306, l'expression du gène *lacZ* étant déjà très faible dans les levures diploïdes qui expriment le domaine SH3 de la fodrine non muté et le ligand, il est difficile d'évaluer l'effet des mutations grâce au test β -galactosidase liquide (Tableau 9 - Groupe 1, ci-dessous).

Mutation E985A

L'effet de cette mutation était plus ou moins prononcé selon les ligands testés. En ce qui concerne les deux protéines tyrosine phosphatase, la mutation entraîne une perte totale de l'interaction comme le démontre le test d'auxotrophie à l'histidine (et le test β -galactosidase pour PTP-TD14). En ce qui concerne l'EST 306, le test HIS3 démontre que l'interaction n'est pas affectée par la mutation. Il était malheureusement impossible d'évaluer l'effet de la mutation par le test β -galactosidase pour la raison que nous avons évoqué ci-dessus.

Mutation K1002E

La mutation K1002E affecte l'interaction avec la PTP-TD14 comme le montre à la fois le test d'auxotrophie à l'histidine et le test β -galactosidase (diminution de l'activité d'un facteur 9). Les interactions entre les autres ligands et le domaine SH3 de la fodrine K1002E ne sont pas affectées comme le suggèrent les levures diploïdes qui conservent leur phénotype His⁺ sur un milieu sans histidine et un métabolisme du X-gal non significativement différent de celui observé dans les diploïdes exprimant le domaine SH3 normal de la fodrine. Ce résultat est intéressant car il démontre que ce résidu pourtant situé dans la boucle n-*Src* et éloigné du sillon hydrophobe formé par le domaine SH3 (Figure 25, page 105) est impliqué dans des contacts moléculaires avec PTP-TD14.

		Groupe 1									
		LexA		LexA-SH3 _{fod}		LexA-SH3 _{fod} E985A		LexA-SH3 _{fod} K1002E		LexA-SH3 _{spc}	
N°	identification	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>
287	LMPTP-A (entière)	-	0,30 ± 0,01	+	0,45 ± 0,01	-	0,32 ± 0,01	+	0,42 ± 0,02	-	0,44 ± 0,01
296	PTP-TD14 (His ₁₂₄₃)	-	0,26	++	6,3	-	0,27	-	0,68	±	0,49
306	EST	-	0,33 ± 0,02	++	0,43 ± 0,01	++	0,49 ± 0,00	++	0,40 ± 0,01	-	0,40 ± 0,01

Tableau 9

Effet des mutations du domaine SH3 de la fodrine

(suite du tableau page suivante)

Groupe 3				
LexA	LexA-SH3 _{fod}	LexA-SH3 _{fod} E985A	LexA-SH3 _{fod} K1002E	LexA-SH3 _{spc}

Familles

N°	identification	HIS3	lacZ	HIS3	lacZ	HIS3	lacZ	HIS3	lacZ	HIS3	lacZ
14	RNB6 (Leu ₆₉)	-	0,22 ± 0,05	++	178 ± 2	±	0,37 ± 0,00	++	131 ± 76	++	502 ± 69
22	N-WASP (Asp ₆₇)	-	0,24 ± 0,04	++	25,7 ± 0,1	±	5,0 ± 1,8	++	41,0 ± 1,4	++	165 ± 9
281	cbl-b (Gly ₇₃₉)	-	0,26 ± 0,01	++	2,5 ± 0,0	-	0,34 ± 0,01	++	2,3 ± 0,0	++	85,4 ± 18,5
283	Fr1 (Pro ₅₁₅)	-	0,22 ± 0,02	++	14,4 ± 0,3	++	5,7 ± 0,4	++	17,4 ± 2,9	++	101 ± 15
	e3B1	-	a	++	a	++	a	++	a	++	a
297	WBP11 (Gly ₂₄₈)	-	0,15 ± 0,01	++	0,88 ± 0,06	++	0,56 ± 0,25	++	4,0 ± 2,0	++	1,3 ± 0,3
303	EST	-	0,18 ± 0,01	++	0,55 ± 0,01	-	0,28 ± 0,03	++	1,5 ± 0,0	++	137 ± 12
304	KIAA1014 (Glu ₂₁₃)	-	0,23 ± 0,02	++	129 ± 9	++	13,8 ± 0,4	++	111 ± 4	++	682 ± 10

Clones isolés

3	EST	-	ND	++	ND	±	ND	++	ND	++	ND
32	EST	-	ND	+	ND	-	ND	+	ND	++	ND
41	ATFx (ND)	-	ND	++	ND	-	ND	++	ND	++	ND
64	cycline T (Glu ₄₄₅)	-	ND	++	ND	++	ND	++	ND	++	ND

^a Le test β -galactosidase liquide de e3B1 est présenté dans le Tableau 10, page 130

Tableau 9 (suite)

Effet des mutations du domaine SH3 de la fodrine

L'expression du gène rapporteur HIS3 et éventuellement lacZ est indiquée dans des colonnes distinctes pour chaque appât étudié. Le numéro (N°) du clone testé est indiqué ainsi que le nom de l'ADNc auquel il correspond et le premier résidu protéique.

Test HIS3 (-) : pas de pousse sur DO-WLH ; (±) : pousse très faible sur DO-WLH ; (+) : pousse sur DO-WLH plus faible que la pousse des levures diploïdes GAL4DA:POP101 + LexA:SH3_{spec} ; (++) : très bonne pousse sur DO-WLH (identique ou supérieure à la pousse des levures diploïdes GAL4DA:POP101 + LexA:SH3_{spec}).

Test β -galactosidase : les mesures sont exprimées en unités de Miller (1972). Une unité β -galactosidase de Miller est la quantité d'enzyme hydrolysant une μ mole d'ONPG en une minute à 30°C (voir la partie « Matériels et Méthodes »). Chaque mesure est rapportée à un nombre égal de levures équivalente à une DO à 600 nm de 1. Les valeurs indiquées sont les moyennes obtenues sur deux levures diploïdes indépendantes possédant le même appât et même ligand, à l'exception du clone 296 pour lequel les valeurs indiquées correspondent à une seule levure diploïde.

Les problèmes de recombinaison homologue

Lors des tests de spécificité, nous avons souvent observé que certains clones de levure L40 transformés uniquement avec une préparation plasmidique pGAD3S2X:ligand devenaient auxotrophes non seulement pour la leucine mais également pour le tryptophane et l'histidine. Ceci est théoriquement impossible car, *a priori*, ces clones sont dépourvus de plasmide de type pLex10. La Figure 27 (page 111) montre un exemple de ce phénomène (clone n°1).

Ce phénotype $\text{Trp}^+ \text{Leu}^+ \text{His}^+$ apparaît après transformation de levures à partir de plasmides ayant déjà eu un passage dans la levure. Nous n'avons jamais observé l'acquisition du phénotype sur des levures transformées à partir de plasmides n'ayant jamais été en contact avec la levure. Cela suggère que le passage dans la levure est indispensable pour l'apparition du phénotype. La levure étant un organisme capable d'effectuer des recombinaisons homologues avec une efficacité très élevée, l'acquisition du phénotype pourrait être due à une recombinaison entre le plasmide pLex10:SH3_{fod} et le plasmide pGAD3S2X:ligand. Une telle recombinaison est théoriquement possible car les deux plasmides possèdent en commun des séquences identiques codant pour le gène de résistance à l'ampicilline et dont la taille, supérieure à 1,3 kpb, est largement suffisante pour permettre la recombinaison. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons recherché par PCR la présence de l'insert codant pour le domaine SH3 de la fodrine sur les préparations plasmidiques des clones bactériens HB101 transformés avec l'ADN plasmidique des clones de levure issus du crible. Comme nous l'avons dit, ces clones bactériens ont normalement perdu le plasmide pLex10:SH3_{fod} et ne conservent que le ou les plasmides pGAD3S2X:ADNc. Les résultats obtenus par PCR mettent en évidence que certains clones bactériens possèdent effectivement l'insert SH3 fodrine en plus de l'ADNc de la banque (résultats non présentés). Nous avons également observé par digestion enzymatique spécifique que ces clones possèdent un plasmide unique de très grande taille suggérant une recombinaison entre deux plasmides de taille plus petite (résultats non présentés). Enfin, un tel plasmide purifié à partir d'un clone bactérien transmet systématiquement le phénotype $\text{Trp}^+ \text{Leu}^+ \text{His}^+$ à la levure qui le reçoit. Ainsi, nos résultats indiquent qu'une recombinaison existe dans la levure entre les plasmides pLex10:appât et pGAD3S2X:ADNc. Les levures transformées par les plasmides recombinés vont donc pouvoir se développer sur un milieu doublement sélectif (DO-WL) car la recombinaison a créé un plasmide possédant à la fois les gènes *TRP1* et *LEU2*, mais également les ADNc codants pour le domaine SH3 de la fodrine et un ligand de celui-ci. L'interaction entre les deux protéines permet l'expression du gène *HIS3* et la croissance sur un milieu carencé en histidine (DO-WLH).

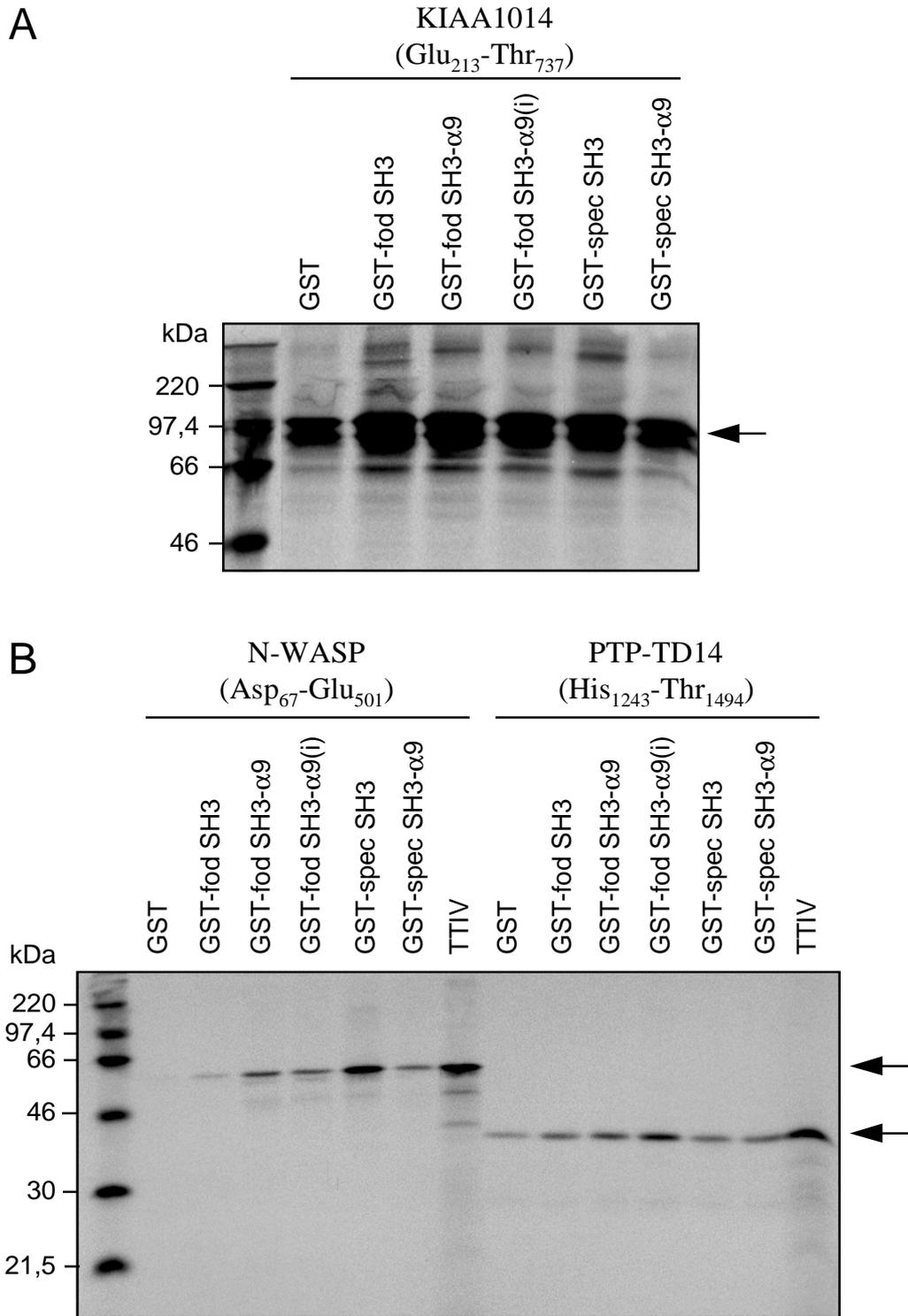


Figure 28

Interaction in vitro entre le domaine SH3 fodrine et les ligands

(suite de la figure page suivante)

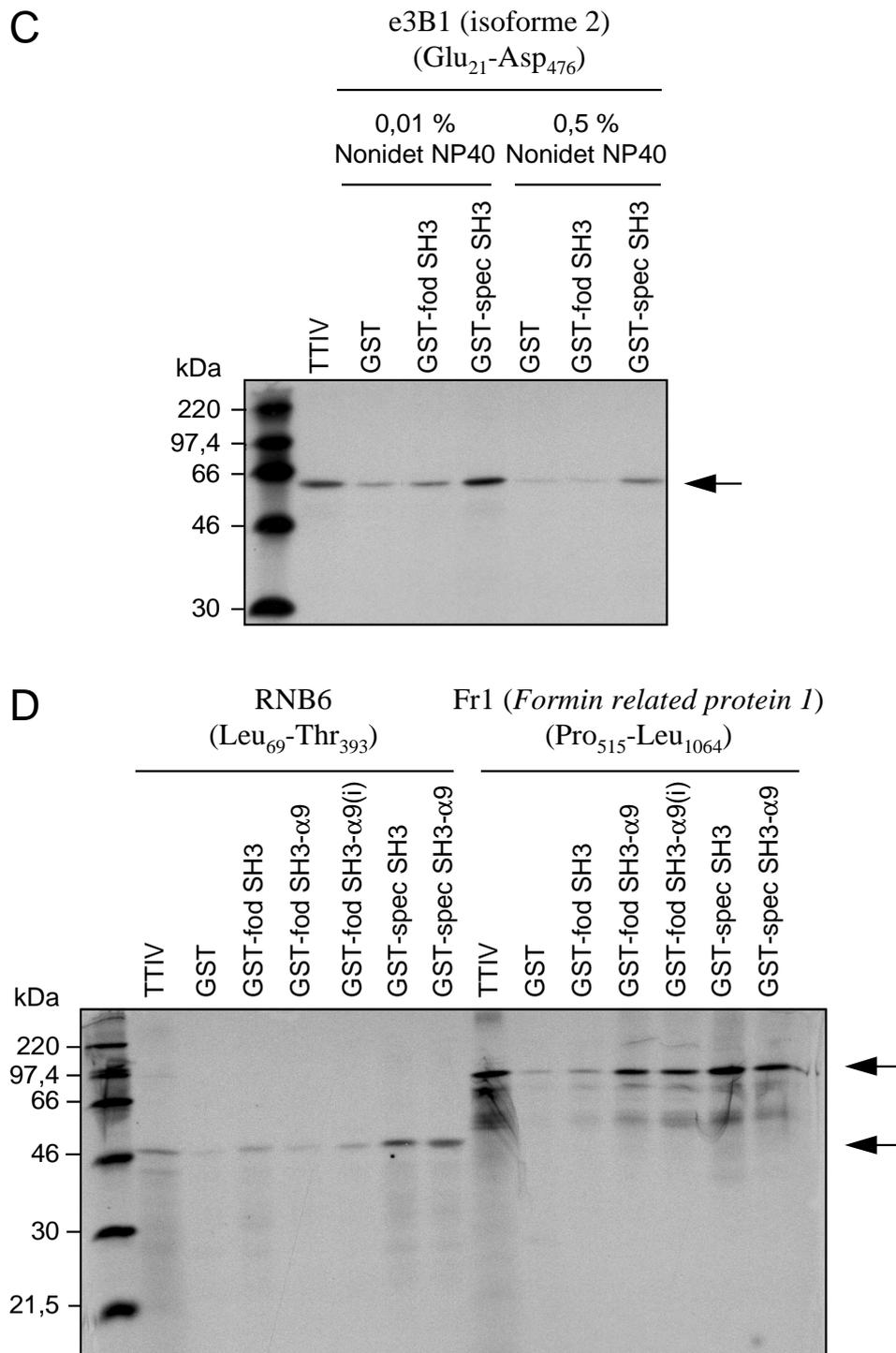


Figure 28 (suite)

Interaction in vitro entre le domaine SH3 fodrine et les ligands

L'interaction a été réalisée sans Nonidet NP40 pour KIAA1014 ; avec 0,01 % de NP40 pour les protéines N-WASP, PTP-TD14, RNB6 et Fr1 ; avec 0,01 % ou 0,5 % pour e3B1.

TTIV : produit de transcription-traduction in vitro (1/7 de la réaction)

2.3.7. Validation des interactions *in vitro*

Transcription/traduction *in vitro*

Une fois les ligands spécifiques identifiés par la technique du double-hybride, il est nécessaire de confirmer leurs interactions par une technique indépendante. Pour cela, nous avons décidé d'étudier la rétention des ligands marqués avec de la [³⁵S]méthionine sur plusieurs peptides SH3 fodrine ou spectrine fusionnés à la GST. Seuls les ligands des groupes de spécificité 1 et 3 ont été étudiés à l'exception des quatre clones isolés du groupe 3 (clones 3, 32, 41 et 64) en raison de leur sous-représentativité, et de la famille 282. Les ADNc des clones ont été amplifiés par PCR avec les amorces pGAD-TIV-S et pGAD-TIV-AS puis purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose. L'amorce pGAD-TIV-S contient la séquence du promoteur T7 immédiatement suivie d'une séquence consensus de Kozak. Dix bases supplémentaires ont été ajoutées en amont du promoteur T7 afin d'augmenter l'efficacité de la transcription. Les produits PCR obtenus ont été transcrits et traduits avec un lysat de réticulocyte contenant l'ARN polymérase T7 en présence de [³⁵S]méthionine. La GST ou les protéines de fusion GST-SH3_{fod}, GST-SH3_{spec}, GST-SH3_{fod}-α9, GST-SH3_{fod}-α9(i) et GST-SH3_{spec}-α9 (10 µg chacune) préalablement fixées sur des billes de Sépharose CL-4B couplées au glutathion ont été incubées en présence du produit de traduction avec ou sans détergent Nonidet NP40. Après lavage, les protéines ont été séparées par électrophorèse dénaturante sur gel d'acrylamide (12,5 %). Le gel a été ensuite séché et les interactions analysées après autoradiographie. Les résultats sont présentés sur la Figure 28 (page 121).

L'un des avantages principaux de cette technique est la possibilité de tester tous les ligands en série car les produits PCR ont été réalisés avec un couple d'amorces unique. Les autoradiographies des produits obtenus après transcription/traduction *in vitro* montrent que la majorité d'entre eux ont une masse moléculaire apparente plus importante que celle calculée. Ce retard de migration en SDS-PAGE peut être dû soit aux séquences riches en proline présentes dans la plupart des ligands et connues pour modifier la migration électrophorétique, soit à des modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations par des kinases présentes dans le lysat de réticulocytes.

Groupe 1

En ce qui concerne la LMPTP-A et la famille 306 (EST), nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'interaction avec le domaine SH3 de la fodrine même dans des conditions peu stringentes (sans détergent). En ce qui concerne la PTP-TD14, la protéine traduite est retenue spécifiquement sur la protéine GST-SH3_{fod} et la protéine GST-SH3_{spec} en présence de 0,01 % de Nonidet NP40 (Figure 28B). La présence de l'unité conformationnelle α9 de la fodrine semble renforcer l'interaction alors que ce

n'est pas le cas pour la spectrine. De manière intéressante, l'interaction semble plus forte en présence de la protéine GST-SH3_{fod}- α 9(i) reproduisant l'isoforme α II Σ 1.

Groupe 3

L'interaction de la protéine codée par l'ADNc EST 303 n'a pas pu être confirmée par cette méthode en raison de sa masse moléculaire trop petite (10,5 kDa). De même, les résultats des protéines cbl-b et WBP11 n'étaient pas satisfaisants car les protéines traduites interagissaient beaucoup plus fortement avec la GST qu'avec les autres protéines de fusion.

En revanche, la Figure 28 montre qu'il existe une interaction entre le domaine SH3 de la fodrine et les protéines KIAA1014, N-WASP, e3B1, RNB6 et Fr1. Dans certains cas, l'interaction non spécifique avec la GST reste élevée mais c'est la quantité plus importante de la protéine ligand fixée sur les protéines GST fusionnées aux domaines SH3 qui permet de confirmer les interactions sans ambiguïté (KIAA1014, Figure 28A). Il serait intéressant pour ces protéines de tester les interactions dans des conditions plus stringentes. En ce qui concerne la protéine KIAA1014, la présence de l'unité conformationnelle α 9 ne semble pas renforcer l'interaction avec le domaine SH3 fodrine alors qu'elle semble diminuer l'interaction avec le domaine SH3 de la spectrine (Figure 28A). Les mêmes conclusions sont obtenues pour la protéine N-WASP. On voit même que l'interaction GST-SH3_{fod}/N-WASP n'est détectable qu'en présence de l'unité conformationnelle α 9 alors, qu'au contraire, l'unité α 9 de la spectrine diminue l'interaction GST-SH3_{spec}/N-WASP (Figure 28A).

L'interaction avec la protéine e3B1 a été testée uniquement avec les protéines GST, GST-SH3_{fod} et GST-SH3_{spec}. En présence de 0,01 % de Nonidet NP40, l'interaction est plus importante avec le domaine SH3 de la spectrine. En présence de 0,5 % de Nonidet NP40, seule l'interaction GST-SH3_{spec}/e3B1 peut être observée alors que l'interaction GST-SH3_{fod}/e3B1 est indétectable (Figure 28B). Ce résultat confirme ceux publiés par Ziemnicka-Kotula *et coll.* (1998) qui ont démontré que e3B1 interagissait plus spécifiquement avec le domaine SH3 de la spectrine. Enfin, l'ensemble de nos résultats démontrent l'importance des séquences protéiques adjacentes au domaine SH3.

Comme pour e3B1, l'interaction avec la protéine RNB6 est très spécifique du domaine SH3 de la spectrine comme le montrent les différences de fixation très importantes qui existent entre les peptides SH3 fodrine et spectrine.

Enfin, la protéine Fr1 est spécifique des domaines SH3 de la fodrine et de la spectrine. Une nouvelle fois, la présence de l'unité α 9 de la fodrine renforce l'interaction avec la protéine Fr1. Quant au domaine SH3 spectrine, la présence de l'unité α 9 ne semble pas affecter l'interaction.

Nous avons donc confirmé pour ces six partenaires qu'ils étaient capables d'interagir *in vitro* avec les domaines SH3 de la fodrine ou de la spectrine, ou bien encore avec les deux. Certaines interactions

démontrent que l'unité $\alpha 9$ renforce l'interaction entre le domaine SH3 et ces ligands, ce qui confirme l'importance de ces régions adjacentes et le contexte naturel du SH3.

2.3.8. Autres résultats spécifiques de chaque ligand

La phosphotyrosyl protéine phosphatase de faible poids moléculaire (LMPTP)

Parmi les 309 clones $\text{Leu}^+ \text{Trp}^+ \text{His}^+ \text{LacZ}^+$ du crible, l'ADNc codant pour la LMPTP a été retrouvé dans 78 clones (soit plus de 25 % du total) et constitue le ligand majoritaire de ce crible. Trois isoformes différentes, appelées A, B et C de la LMPTP ont été décrites. Les isoformes B et C se distinguent l'une de l'autre par une région centrale différente de 34 acides aminés. Chacune est produite par un épissage alternatif excluant l'exon A, pour la LMPTP-B et l'exon B pour la LMPTP-A (Bryson *et coll.*, 1995). L'isoforme C, ne contenant aucun des deux exons spécifiques des isoformes A et B, est raccourcie de 34 acides aminés (Tailor *et coll.*, 1999). Les clones 163, 224, 287, et 295 ont été séquencés. Tous possèdent la séquence codante complète de l'isoforme A de la LMPTP (LMPTP-A). Les séquences complètes de ces quatre ADNc montrent une disparité au niveau de la longueur des extrémités 5' et 3', ce qui signifie qu'ils proviennent tous de clones bactériens indépendants.

L'amplification par PCR avec les amorces spécifiques rLMPTP-M1-S et rLMPTP-H158-R en utilisant la banque totale d'ADNc de rein de rat comme matrice témoin, suivie de la digestion par *BglI* qui possède un site de clivage dans l'ADNc de la LMPTP-B mais pas dans la LMPTP-A a montré la présence d'ADNc codant pour la LMPTP-B dans cette banque. La nature de l'isoforme présente a été vérifiée dans six autres clones (clones 289, 290, 298, 300, 308 et 309) de la même manière. Les clones 224, 287 et 295 nous ont servi de témoin. Parmi tous ces clones testés, nous n'avons identifié que la LMPTP-A. Ces données suggèrent que contrairement à la LMPTP-B, la LMPTP-A serait spécifiquement capable d'interagir, dans la levure, avec le domaine SH3 de la fodrine.

Afin de confirmer cette hypothèse, l'interaction des trois isoformes de la LMPTP humaines avec le domaine SH3 de la fodrine a été testée en double-hybride par conjugaison. Les résultats montrent que la LMPTP-B est incapable d'interagir avec le domaine SH3 de la fodrine dans ce système (Figure 29, page 126). Les mêmes résultats ont été obtenus avec la LMPTP-C (non présentés). De même, la LMPTP-A n'interagit pas avec le domaine SH3 de la spectrine. L'ensemble de ces résultats suggère la grande spécificité de l'interaction du SH3 fodrine avec la LMPTP-A.

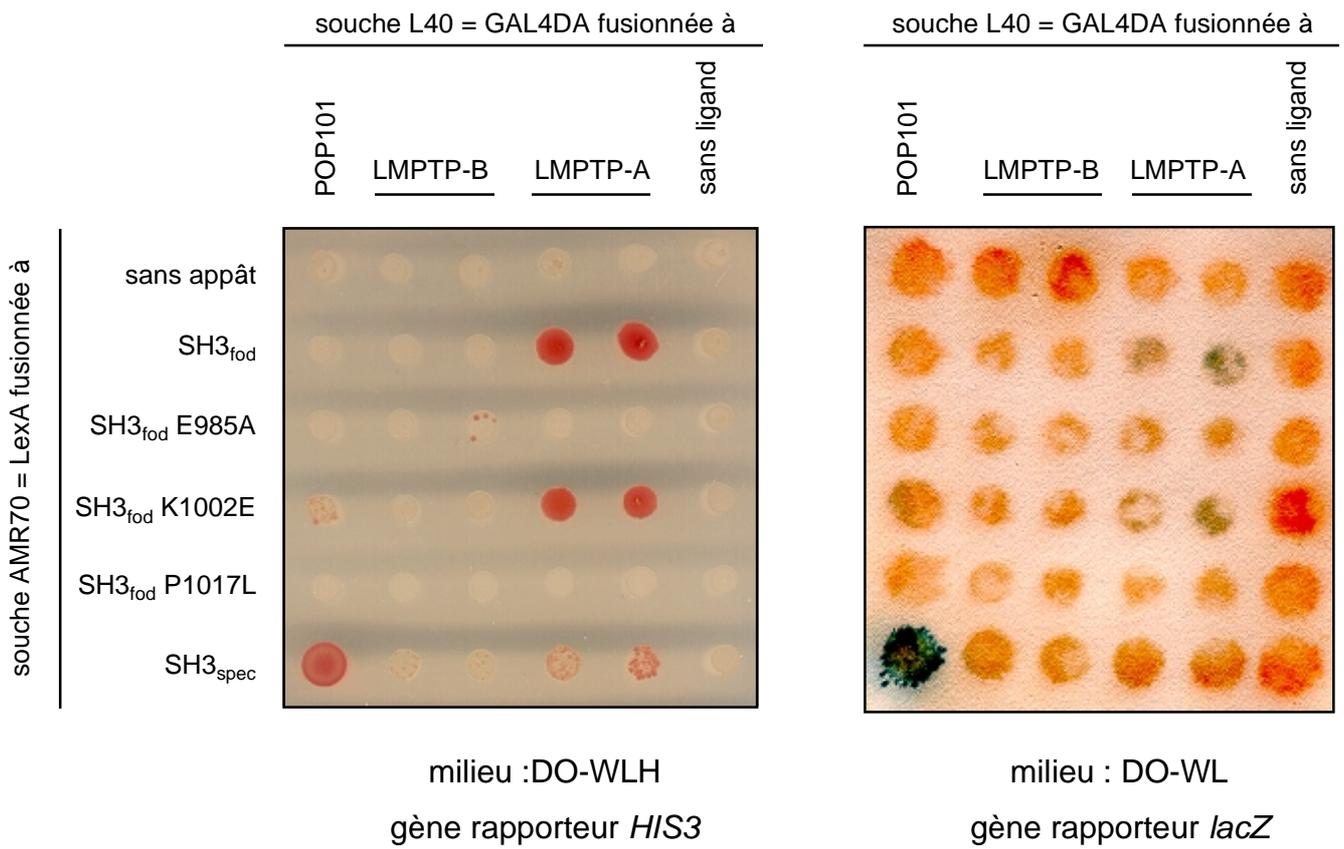


Figure 29

Spécificité de l'interaction entre la LMPTPA et le domaine SH3 fodrine

Les interactions ont été testées par conjugaison grâce à un test d'auxotrophie à l'histidine (gauche) et un test β -galactosidase sur filtre (droite)

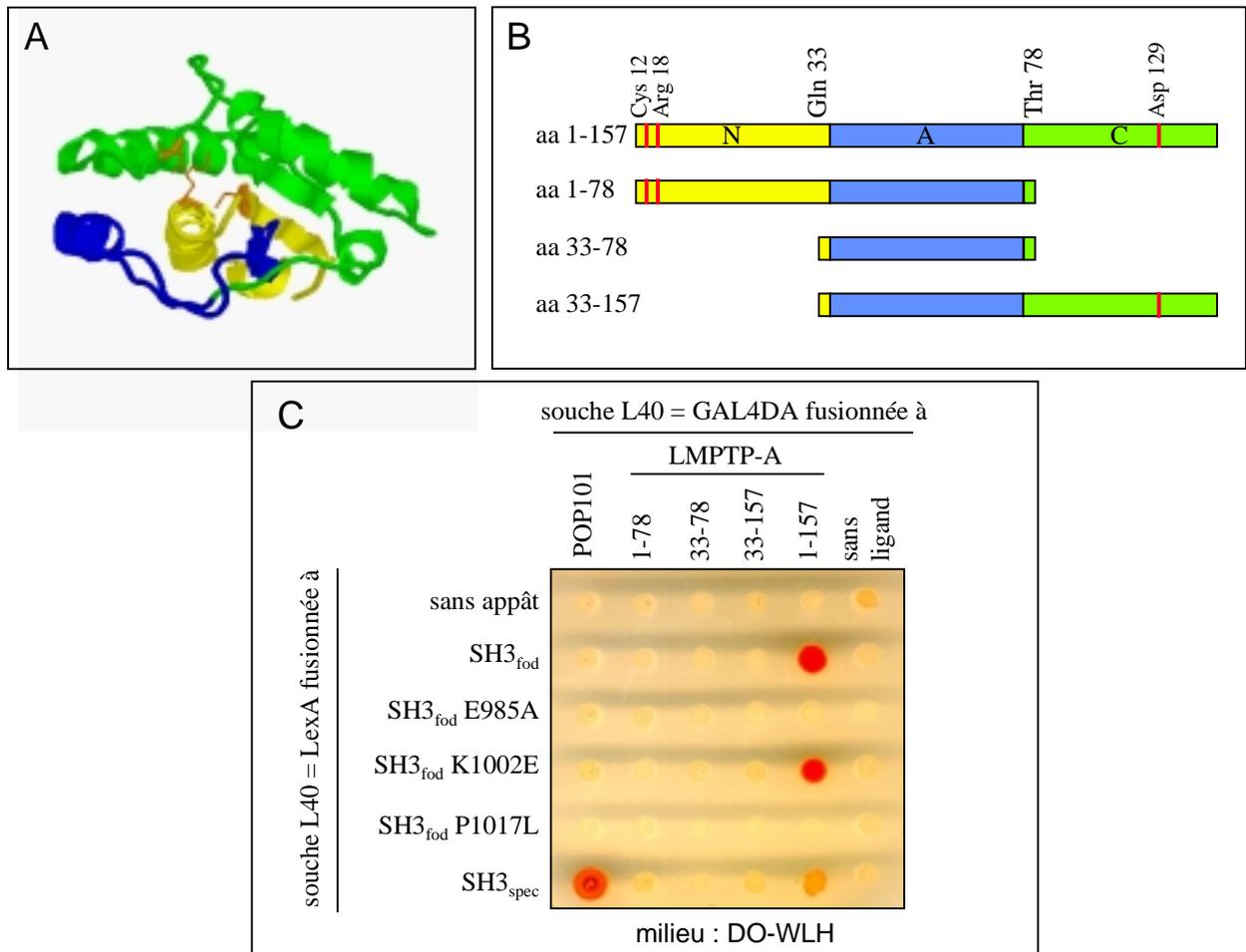


Figure 30

Recherche d'une région nécessaire et suffisante de la LMPTPA permettant l'interaction avec le domaine SH3 de la fodrine

- A - Représentation tridimensionnelle de la LMPTPA. Les parties N-terminale, centrale, et C-terminale sont indiquées en jaune, bleu et vert, respectivement ;
- B - Schéma des trois constructions LMPTPA utilisées dans ce test ;
- C - Les interactions ont été testées par conjugaison grâce à un test d'auxotrophie à l'histidine.

Recherche d'une région de la LMPTP-A nécessaire et suffisante pour interagir avec le domaine SH3 de la fodrine

Les trois protéines isoformes de la LMPTP, codées par le même gène, diffèrent exclusivement par une séquence de 34 acides aminés située au milieu de la protéine (Figure 30A et B, page 127). Nous souhaitons vérifier si cette courte région de la LMPTP-A était suffisante pour interagir avec le domaine SH3 de la fodrine. Pour cela, nous avons réalisé trois constructions différentes dans le vecteur pGAD3S2X (Figure 30B) :

1. la construction 1-78 (acides aminés Ala₁ à Thr₇₈) correspond à la partie N-terminale (en jaune) et à la partie centrale A (en bleu) qui différencie les deux isoformes de la LMPTP ;
2. la construction 33-78 protéine (acides aminés Gln₃₃ à Thr₇₈) correspond uniquement à la partie centrale de la protéine ;
3. enfin, la construction 33-157 (acides aminés Gln₃₃ à His₁₅₇) correspond à la partie centrale et la partie C-terminale (en vert) de la LMPTP-A.

Ces trois peptides ont été testés en double-hybride, par conjugaison, vis-à-vis des différents appâts.

Les résultats montrent qu'aucune de ces trois constructions n'est capable d'assurer l'interaction avec le domaine SH3 de la fodrine (Figure 30C). Sous réserve que les trois constructions réalisées soient bien exprimées dans la levure (ce qui n'a pas été vérifié), ces données montrent que non seulement la région spécifique de l'isoforme A de la LMPTP est incapable d'assurer seule l'interaction avec le domaine SH3 de la fodrine mais aussi que la structure entière de la LMPTP-A est indispensable pour l'interaction. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors du crible. En effet, tous les clones que nous avons étudiés (10 sur 78) possèdent la totalité de la séquence codante de la LMPTP-A. Ainsi, il semble probable qu'un clone LMPTP-A raccourci dans sa partie N-terminale de quelques résidus n'est pas capable d'interagir avec le domaine SH3 de la fodrine.

Interaction *in vitro* à l'aide de peptides recombinants

L'utilisation de la technique de transcription/traduction *in vitro* ne nous a pas permis de montrer une interaction entre la LMPTP-A traduite et marquée avec de la [³⁵S]méthionine et les peptides SH3 fodrine fusionnés à la GST. Nous souhaitons vérifier l'interaction entre les deux partenaires en utilisant des peptides recombinants. La protéine LMPTP-A, fusionnée à la GST a été exprimée et purifiée à partir d'une culture bactérienne puis testée pour sa capacité à retenir les peptides SH3- α 9- α 10-(His)₆ ou SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ dans des conditions non stringentes (sans détergent) sur des billes de sépharose couplées au glutathion. Dans un premier temps, nous avons analysé la rétention de chacun des peptides sur des billes de sépharose CL-4B couplées au glutathion (Figure 31A, page 129). Les protéines GST et GST-LMPTP-A sont bien retenues sur les billes et pas les peptides SH3-(His)₆. Puis les peptides GST et GST-LMPTP-A ont été incubés en présence des peptides SH3 (Figure 31B, page 129). Ces derniers ne sont pas retenus spécifiquement par la protéine GST-LMPTP-A.

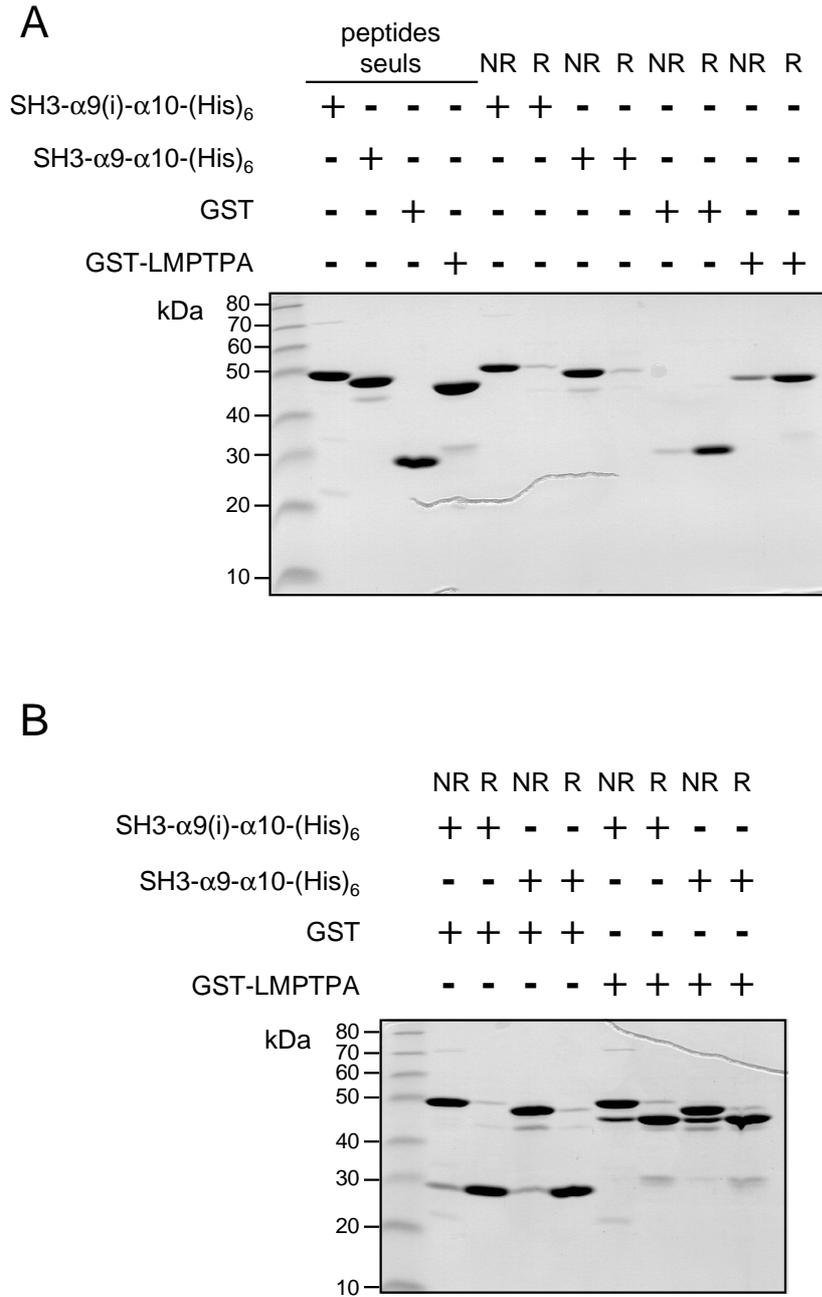


Figure 31

Étude de l'interaction entre la LMPTPA et le domaine SH3 de la fodrine à l'aide de peptides recombinants

A - Analyse de la fixation des peptides sur les billes de sépharose CL-4B couplées au glutathion ;
 B - Analyse de l'interaction entre les différents peptides.

Les protéines GST ou GST-LMPTPA ont été incubées en présence des peptides SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆ ou SH3- α 9- α 10-(His)₆ dans des conditions peu stringentes. Après interaction, le milieu réactionnel est mis en contact avec des billes de sépharose CL-4B couplées au glutathion. Ces billes sont lavées et les protéines retenues analysées par SDS-PAGE.

Les symboles + et - indiquent respectivement la présence ou l'absence du peptide dans le tube. Les notations R et NR correspondent respectivement aux fractions retenues et aux fractions non retenues sur les billes de sépharose CL-4B couplées au glutathion.

e3B1

Parmi les 26 clones e3B1 identifiés avec la sonde 284, il est apparu que certains présentaient une activité β -galactosidase très faible alors que d'autres avaient une activité β -galactosidase extrêmement élevée. Le Tableau 10 ci-dessous montre les résultats du test β -galactosidase réalisé sur un clone appartenant à chacune de ces catégories. Le rapport entre les activités β -galactosidase des clones 230 et 284 est de 37 et 58 pour les levures diploïdes contenant respectivement les domaines SH3 de la fodrine et de la spectrine. Ce résultat suggère qu'il existe des clones dont l'ADNc contient une séquence qui est capable d'augmenter très fortement l'activité du gène rapporteur *lacZ*.

N° ID	identification	LexA		LexA:SH3 _{fod}		LexA:SH3 _{fod} E985A		LexA:SH3 _{fod} K1002E		LexA:SH3 _{spc}	
		<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>	<i>HIS3</i>	<i>lacZ</i>
230	e3B1 (Glu ₂₁)	-	0,3	++	18,5	++	ND	++	ND	++	5 069
284	e3B1 (Ile ₂₅₈)	-	0,3	++	0,5	++	ND	++	ND	++	87,3

Tableau 10

Test de spécificité de e3B1

Test β -galactosidase : les mesures sont exprimées en unités de Miller (1972). Une unité β -galactosidase de Miller est la quantité d'enzyme hydrolysant une μ mole d'ONPG en une minute à 30°C (voir la partie « Matériels et Méthodes »). Chaque mesure est rapportée à un nombre égal de levures équivalente à une DO à 600 nm de 1. Les valeurs indiquées correspondent à une seule levure diploïde.

ND : non déterminé

Afin de localiser cette séquence sur l'ADNc, nous avons analysé l'ADNc de 24 clones allumés avec la sonde 284. L'ADNc a été amplifié en utilisant les amorces pGAD793-S et r-e3B1-1474R. Une bande est amplifiée spécifiquement avec tous les ADNc testés. L'utilisation d'une amorce spécifique de e3B1 (re3B1-1474R) montre que tous ces clones contiennent un ADNc de e3B1, ce qui conforte la validité des hybridations sur membrane. Les inserts amplifiés ont été séquencés avec l'amorce pGAD793-S. Sept séquences n'ont pu être obtenues (clones 5, 42, 65, 142, 169, 217 et 270). Le séquençage des autres clones a permis d'établir le premier acide aminé de e3B1 codé et de vérifier que les ADNc étaient tous en phase avec le domaine transactivateur de GAL4. Le Tableau 11 (page 132) montre que parmi les clones présentant une activité β -galactosidase élevée, le clone le plus court commence au résidu Asp₄₂. Parmi les clones présentant une faible activité β -galactosidase, le clone le plus long commence au résidu

Thr₁₉₁. Ces bornes permettent de localiser la séquence renforçant l'activité β -galactosidase entre les résidus 42 et 191.

Ziennicka-Kotula *et coll.* (1998) ont décrit cinq isoformes différentes de e3B1 qui se différencient par des épissages alternatifs d'exons. Nous souhaitons identifier si une isoforme particulière pouvait être responsable de l'augmentation de l'activité β -galactosidase. Pour cela, les ADNc ont été amplifiés avec les amorces r-e3B1-818S et r-e3B1-1189R encadrant la zone spécifique des isoformes (Figure 32, page 133). Les isoformes 1, 2, 3, 4 et 5 permettent l'amplification d'un fragment de 456 pb, 375 pb, 288 pb, 198 pb et 111 pb, respectivement. En ce qui concerne les clones 12, 15, 63, 143, 166 et 175, il est impossible d'amplifier leur ADNc étant donné que leur premier résidu nucléotidique est situé en aval du site d'hybridation de l'amorce r-e3B1-818S. L'isoforme 2 a été retrouvée dans les deux groupes de clones. L'isoforme 3 a été retrouvé en un seul exemplaire dans le groupe de clones à faible activité β -galactosidase alors que l'isoforme 4 a été retrouvée parmi 11 clones appartenant uniquement au groupe des clones à forte activité β -galactosidase. D'après nos résultats de séquençage et de PCR, nous n'avons pas identifié de séquence spécifique d'une isoforme particulière qui pourrait être responsable de la différence d'activité β -galactosidase entre les clones, même si l'isoforme 4 n'a été retrouvée que dans le groupe de clones à forte activité β -galactosidase (Tableau 11, page 132).

Clones	Premier acide aminé	Isoforme de e3B1
Activité β -galactosidase forte		
230, 305	Glu ₂₁	2
1, 50, 92, 110, 246, 307	Ala ₄₀	4
254	Asp ₄₂	2
5	non déterminé	4
42	non déterminé	4
65	non déterminé	4
142	non déterminé	2
169	non déterminé	4
217	non déterminé	2
270	non déterminé	4
Activité β -galactosidase faible		
29	Thr ₁₉₁	2
284	Ile ₂₅₈	3
175	Pro ₃₀₇	1 ou 2
12	Ala ₃₄₁	1 ou 2
15, 63, 143	Asn ₃₅₀	1 ou 2
166	Thr ₃₇₉	1 ou 2

Tableau 11
Caractéristiques de 24 clones e3B1

Les clones sont classés en fonction de leur activité β -galactosidase déterminée sur les boîtes de culture (voir la partie « Matériels et Méthodes »). Pour chaque clone est indiqué :

- le premier acide aminé de e3B1 lorsque celui-ci a été identifié ;
- l'isoforme identifiée par séquençage ou par PCR.

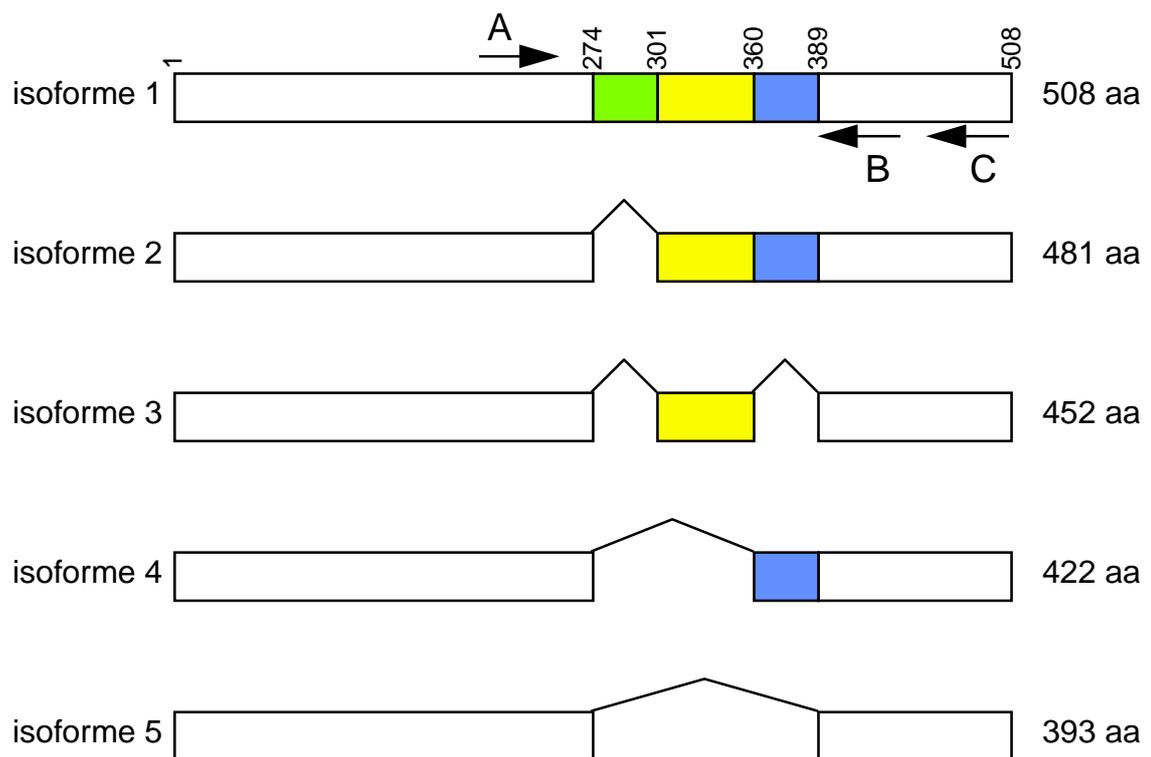


Figure 32

*Isoformes de e3B1 produites par épissage alternatif (Ziennicka-Kotula et coll., 1998)
et position des amorces utilisées par PCR.*

Amorce A : re3B1-818S ; Amorce B : re3B1-1189R ; Amorce C : re3B1-1474R

Discussion

1. Étude fonctionnelle du site de tétramérisation de la spectrine

1.1. Confirmation du modèle par des études biochimiques

L'auto-association de la spectrine constitue une fonction cruciale pour la stabilité du squelette membranaire comme l'ont montré les mutations associées à des élliptocytoses héréditaires. Cette interaction implique les extrémités N-terminale de la chaîne α et C-terminale de la chaîne β . Les séquences des chaînes α et β déduites des ADNc ont montré que la chaîne α commence par une hélice C isolée alors que la chaîne β se termine par deux hélices A et B. Ces données nous ont conduit à proposer le modèle suivant pour le site d'auto-association de la spectrine : l'hélice C de la chaîne α pourrait se réassocier avec les hélices A et B de la chaîne β pour constituer une nouvelle unité conformationnelle hybride identique à celle observée le long de la spectrine (Tse *et coll.*, 1990). Ce modèle est conforté par la pathologie de la spectrine associée aux élliptocytoses héréditaires. Il existe en effet une relation directe entre la localisation de ces mutations et l'intensité de l'interaction au sein du tétramère $(\alpha\beta)_2$ de spectrine. Les mutations localisées dans les trois hélices probablement impliquées dans le site d'auto-association de la spectrine sont associées à un défaut d'interaction important, à l'inverse des autres mutations localisées en dehors du site présumé.

Dans ce travail, nous souhaitons déterminer et confirmer, à l'aide de peptides recombinants, les zones des chaînes α et β nécessaires et suffisantes pour cette interaction.

Nous avons étudié le site de tétramérisation en analysant l'interaction des peptides recréant l'extrémité N-terminale de la chaîne α avec les peptides de l'extrémité C-terminale de la chaîne β , interaction analysée soit avec l'un des partenaires fusionnés à la GST et retenus sur des billes de sépharose couplées au glutathion, soit par électrophorèse non dénaturante avec les deux partenaires débarassés de la GST. Les résultats ont montré que les hélices isolées des peptides α et β ne pouvaient se réassocier à leur partenaire respectif qu'en présence d'une unité conformationnelle adjacente complète, $\alpha 1$ pour les peptides α et $\beta 16$ pour les peptides β .

Dans l'étude concernant l'extrémité N-terminale de la chaîne α , le peptide comprenant l'hélice C isolée suivie d'une unité conformationnelle complète (A, B et C) est capable de se réassocier aux peptides β avec une stœchiométrie d'une mole de peptide α pour une mole de peptide β . Ce peptide α est également capable de se fixer au dimère de spectrine et d'inhiber la formation du tétramère. Le peptide α contenant uniquement l'hélice C est, quant à lui, incapable de se réassocier aux peptides β dans les conditions précédemment citées. Ceci peut s'expliquer par un mauvais repliement du peptide α 1-50. En effet, les études de dichroïsme circulaire ont démontré que ce peptide était principalement structuré en feuillets β . Nous avons cependant réussi à mettre en évidence une réassociation de celui-ci avec le partenaire β en présence d'un agent pontant, le DMS (résultats non présentés). Le complexe résultant de cette interaction est sans doute très instable et il faut déplacer l'équilibre grâce à la création d'une ou plusieurs liaisons covalentes entre les partenaires pour pouvoir l'observer. L'ensemble de nos résultats ne remet pas en cause l'implication de l'hélice C isolée dans le site de tétramérisation car il a été démontré qu'un peptide comprenant les unités conformationnelles α 1 à α 6, mais délété des 45 premiers acides aminés N-terminaux par digestion ménagée à la trypsine était incapable de se réassocier (Speicher *et coll.*, 1993). De même, Kotula *et coll.* (1993) ont démontré que même si l'implication de l'hélice C de la chaîne α dans le processus de tétramérisation ne fait pas de doute, elle n'est pas suffisante, ce qui est en accord avec nos résultats. La présence des hélices A et B adjacentes (peptides α 1-85 et α 1-124) n'a pas non plus permis de renforcer l'interaction avec les peptides β .

Concernant les constructions β , nous avons obtenu des résultats similaires : les peptides contenant les deux hélices A et B isolées avec ou sans l'extrémité C-terminale non homologue étaient incapables de se réassocier avec le partenaire α sans la présence de l'unité conformationnelle complète β 16. Il apparaît ainsi que les deux unités conformationnelles α 1 et β 16 sont nécessaires pour stabiliser le site de tétramérisation. Par ailleurs, le fait qu'une unité conformationnelle trihélicoïdale supplémentaire soit nécessaire pour renforcer l'interaction, pourrait expliquer l'effet de mutations α situées dans les unités conformationnelles suivantes et donc, *a priori*, plus éloignées du site d'auto-association de la molécule. Des résultats similaires ont été rapportés pour un autre site d'interaction de la spectrine. Li et Bennett (1996) ont ainsi démontré que les unités conformationnelles β 1 et β 2 stabilisaient l'interaction spectrine-actine ce qui confirme que les unités conformationnelles peuvent intervenir dans des interactions dans lesquelles elles ne sont pas directement impliquées.

Comme rapporté par Kennedy *et coll.* (1994), nous avons confirmé que l'extrémité C-terminale non homologue (domaine III) de la chaîne β n'était pas nécessaire pour obtenir une interaction pleinement fonctionnelle. Cependant, la présence de deux pentes sur la représentation de Scatchard suggérait la présence de deux populations de peptide, l'une correspondant à un peptide avec une conformation équivalente au peptide avec le domaine III et l'autre avec une affinité moindre. Le domaine III pourrait stabiliser soit la structure des deux hélices A et B isolées, soit l'unité conformationnelle recréée durant

l'interaction. Kennedy *et coll.* (1994) ont également démontré qu'un site de tétramérisation peut être recréer en déléant l'hélice C de l'unité β 16. Ainsi, ces deux nouvelles hélices A et B isolées sont capables d'interagir avec le peptide α . Cette étude démontre que la notion de tétramérisation peut être appliquée, *a priori*, à d'autres unités conformationnelles de la spectrine.

Au total, nous avons pu définir les régions nécessaires et suffisantes pour permettre une auto-association similaire à celle observée par la spectrine native ($K_D = 1 \mu\text{M}$) comprenant l'unité conformationnelle β 16 suivie des deux hélices A et B sur la chaîne β et l'hélice C isolée suivie de l'unité conformationnelle α 1 sur la chaîne α .

1.2. Réalisation d'un modèle tridimensionnel du site de tétramérisation de la spectrine : compréhension du mécanisme moléculaire des EH

En l'absence de données structurales établies expérimentalement (RMN ou diffraction des rayons X), des méthodes analogiques et algorithmiques permettent d'approcher la structure tridimensionnelle d'un domaine particulier à partir de celle établie pour un domaine apparenté. Nous avons proposé par homologie une structure du site de tétramérisation de la spectrine en utilisant comme modèle la structure cristallographique de l'unité conformationnelle α 13 (Yan *et coll.*, 1993) et le programme WHATIF (*The modelling server* sur <http://loulou.embl-heidelberg.de:1128/>). La structure cristallographique est particulièrement intéressante car elle a été obtenue sur un homodimère de cette unité : dans le cristal obtenu, les hélices A et B d'une molécule sont associées de façon antiparallèle pour former un sillon capable d'accueillir l'hélice C d'une autre molécule. Ce cristal pouvait donc être utilisé comme modèle des interactions interhélices comme il peut en exister au sein du site de tétramérisation. Nous avons établi ce modèle uniquement sur la base d'homologie et n'avons pas recherché la structure qui pourrait posséder une énergie minimale. Sur le modèle que nous proposons (Figure 33, page 138), ont été localisés tous les résidus mutés dans les EH. On peut constater que les résidus en position *a* sur les hélices A et C ou en position *d* sur l'hélice C sont particulièrement affectés. Ces positions sont localisées dans le cœur hydrophobe formé par les trois hélices et interviennent probablement dans la stabilisation de l'unité conformationnelle hybride.

La mutation W2024R qui affecte le tryptophane invariant empêche toute interaction entre les peptides α et β . D'autres études par dichroïsme circulaire ont révélé la position critique de ce résidu : lorsqu'il est muté, il est associé à une diminution du contenu en hélice α (MacDonald *et coll.*, 1994 ; Pantazatos et MacDonald, 1997). Le modèle que nous proposons permet d'expliquer l'effet dramatique de la mutation W2024R. La substitution du résidu β -Trp₂₀₂₄ (position *g*) par une arginine pourrait provoquer la répulsion de l'arginine 2064 située en position *g*, inhibant la formation du sillon hydrophobe entre les hélices A et B de la chaîne β et par conséquent l'interaction entre les chaînes α et β . Une autre modélisation de ce site réalisée à partir de la structure de l'unité répétitive α 16 établie par RMN aboutit à la même conclusion (Pascual *et coll.*, 1997b).

Une autre position est particulièrement affectée dans les EH : il s'agit de la position *g* sur l'hélice C occupée par des résidus chargés (arginine ou lysine). Il est probable que la plupart de ces résidus forment des liaisons ioniques avec des résidus chargés négativement en position *e* de l'hélice A. La localisation de ces mutations dans notre modèle rend compte des défauts d'auto-association de spectrine chez les patients EH. Comme précédemment, le modèle établi à partir de l'unité répétitive $\alpha 16$ apporte les mêmes conclusions (Pascual *et coll.*, 1997b).

Par contre, certaines mutations, comme les mutations β -Ser₂₀₁₉ et β -Ala₂₀₅₃, respectivement en position *b* et *f*, sont situées en dehors des zones présumées d'interaction. Dans ces deux cas, le résidu est substitué par une proline qui pourrait détruire la structure hélicoïdale et empêcher ainsi toute interaction : par exemple, les membranes érythrocytaires du patient homozygote pour la mutation $\beta A2053P$ ne présentent pas de tétramère.

Sur la fodrine, le site de tétramérisation n'a pas été étudié mais ce domaine est bien conservé : entre spectrine et fodrine, il existe 73,9 % d'identité des hélices A et B et 70,6 % pour l'hélice C impliquées dans le site alors que cette identité n'est que de $55,5 \pm 4,3$ % entre les neuf premières unités répétitives des chaînes α de la spectrine et de la fodrine. Les résidus en positions *a* et *d* fortement impliqués dans la constitution du sillon hydrophobe sont tous conservés à l'exception de deux résidus situés à la fin des hélices. De même, trois résidus sur quatre en position *e* de l'hélice C sont conservés. La majorité des résidus non conservés sont localisés en dehors des zones d'interaction présumées. Ces données suggèrent que l'auto-association de la fodrine pourrait posséder les mêmes caractéristiques que celles établies pour la spectrine.

2. Étude fonctionnelle du domaine SH3 de la fodrine

2.1. Le domaine SH3 de la fodrine et la sous-unité α du canal à sodium

Parmi les domaines particuliers de la fodrine, le domaine SH3 est l'un de ceux dont la fonction reste peu étudiée. Il pourrait présenter un intérêt fonctionnel important.

Les domaines SH3 sont des modules protéiques d'une cinquantaine d'acides aminés intégrés dans diverses protéines et dont la fonction, aujourd'hui relativement bien définie, est d'assurer des interactions protéine-protéine via des motifs riches en proline. Cette fonction d'adaptateur moléculaire fait que les domaines SH3 sont impliqués dans des processus aussi divers que la transduction des signaux, la régulation d'activité enzymatique ou bien encore l'adressage de protéines.

En ce qui concerne le domaine SH3 de la fodrine, un seul partenaire a été jusqu'alors rapporté : il s'agit de la sous-unité α du canal à sodium épithélial sensible à l'amiloride (Rotin *et coll.*, 1994). Les auteurs ont montré que la chaîne α de la fodrine était immunoprécipitée avec des anticorps anti- α rENaC à partir d'un lysat de cellules MDCK surexprimant α rENaC. Puis, à l'aide de peptides recombinants recouvrant différentes régions de la partie C-terminale de α rENaC (technique *overlay*), ils ont proposé une interaction directe impliquant un motif, appelé P2 (PPLALTAPPPA), riche en proline avec le domaine SH3 de la fodrine.

2.1.1. Remise en cause de l'interaction

En utilisant une approche similaire, à savoir l'interaction *in vitro* de peptides recombinants recouvrant la partie C-terminale du canal [GST- α rENaC(Cterm)] identique au peptide décrit par Rotin *et coll.* et le domaine SH3 de la fodrine (SH3- α 9- α 10-(His)₆ et SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆), nous n'avons pas pu reproduire cette interaction.

La recherche d'un complexe SH3 fodrine/ α rENaC ou α -fodrine/ α rENaC par coimmunoprécipitation et par rétention sur colonne d'affinité, à partir de la lignée de canal collecteur de rein de rat (RCCD₁) possédant un bon transport transépithélial de sodium et exprimant le peptide SH3- α 9-FLAG, s'est révélée aussi négative.

Aucune interaction n'a été mise en évidence en utilisant la technique de conjugaison en double-hybride, avec les couples de protéines hybride LexA-SH3_{fod} et GAL4DA- α rENaC(Cterm) (Fournier, 1998) ou

LexA- α ENaC(Cterm) et GAL4DA-SH3_{fod}. Enfin, parmi les 309 clones de levure sélectionnés et de phénotype His⁺ LacZ⁺ (sur 13,7 millions de clones criblés) dans notre criblage d'une banque de rein de rat avec le domaine SH3 de la fodrine comme appât (résultats discutés ultérieurement), la sous-unité α du canal n'a pas été identifiée bien que celle-ci soit présente dans la banque (présence vérifiée par PCR).

Nous avons également analysé l'activité du canal à sodium par courant de court-circuit à la fois sur les cellules RCCD₁ non transfectées et sur les cellules surexprimant le peptide SH3- α 9-FLAG. Les cellules RCCD₁ non transfectées possédaient un courant transépithélial sensible à l'amiloride caractéristique de la présence de ENaC dans la membrane apicale. Les premières analyses de l'activité du canal sur les clones surexprimant SH3- α 9-FLAG montraient que les cellules ne répondaient plus à l'amiloride indiquant une perte de l'activité du canal. Malheureusement, les cellules servant de contrôle (RCCD₁) ont perdu leur capacité de réponse à l'amiloride dans les jours suivants, ce qui ne nous a pas permis de conclure sur le rôle du domaine SH3 de la fodrine sur l'activité du canal.

2.1.2. Quels sont les facteurs pouvant expliquer les discordances entre nos résultats et ceux de Rotin *et coll.* ?

Une autre étude utilisant la technique *overlay* a montré que l'extrémité C-terminale de α ENaC était capable de lier les domaines SH3 des protéines abl, crk, fyn et lck (McDonald et Welsh, 1995). Ceci suggère que cette technique, réalisée dans des conditions peu physiologiques, n'est sinon artéfactuelle, en tout cas pas adaptée pour étudier la spécificité d'une interaction de type domaine SH3/ligand. Or, l'interaction directe entre le domaine SH3 de la fodrine et le canal, décrite par Rotin *et coll.*, a été mise en évidence par cette technique. De plus, dans la recherche de nouveaux partenaires capables de se fixer sur une colonne d'affinité couplée à une protéine de fusion GST- α ENaC, McDonald et Welsh n'ont pas observé de rétention de la fodrine mais la présence de deux protéines de 116 et 134 kDa. Dans des expériences similaires, nous avons également observé une protéine de 116 kDa.

Si une interaction directe entre le domaine SH3 de la fodrine et le canal ne peut être démontrée, il peut exister une interaction directe entre les deux protéines mais qui ne passe pas par le domaine SH3. Une interaction directe de la fodrine avec des protéines transmembranaires comme CD45 et NMDA-R a déjà été observée (Iada *et coll.*, 1994 ; Wechsler et Teichberg, 1998). Dans ces deux cas, la fodrine reconnaît le motif consensus KK(K/N)XN qui n'est pas présent sur la sous-unité α du canal du rat ou de l'homme.

Enfin, l'analyse des données de Rotin *et coll.* n'exclut pas l'existence d'un ou plusieurs partenaires intermédiaires reliant la fodrine au canal. La discordance observée entre nos résultats de rétention sur colonne d'affinité GST- α ENaC et ceux de Rotin *et coll.* pourrait être liée aux différentes lignées cellulaires utilisées et ne surexprimant pas les mêmes partenaires, ainsi qu'à la variabilité de l'expression des différents partenaires selon l'état cellulaire (multiplication et différenciation). Une étude très récente a démontré l'existence *in vivo* dans des cellules rénales

de xénopé, d'un complexe α -fodrine/ α ENaC/Apx (Zuckerman *et coll.*, 1999). La protéine Apx est localisée spécifiquement au pôle apical des cellules épithéliales et il a été démontré qu'elle jouait un rôle dans la régulation de l'activité du canal. Ces données suggèrent la nature multiprotéique des interactions nécessaires à l'adressage du canal au pôle apical des cellules épithéliales. Si les données de Rotin *et coll.* semblent claires quant à l'implication de l'extrémité C-terminale de α ENaC pour son adressage à la membrane, en revanche tous nos résultats convergent vers la conclusion qu'il n'y a pas d'interaction directe entre le domaine SH3 de la fodrine et ENaC et que cette interaction pourrait être médiée par d'autres protéines intermédiaires.

2.1.3. Partenaires intermédiaires pouvant être impliqués dans l'interaction entre le domaine SH3 fodrine et α ENaC

Afin de rechercher d'éventuels partenaires entre ces deux protéines, Laurence Malbert-Colas au laboratoire a criblé une banque d'expression d'ADNc de rein de rat par la technique du double-hybride en utilisant comme appât l'extrémité C-terminale de α ENaC. Parmi les clones identifiés avec l'extrémité C-terminale de ENaC comme appât (92 sur 409 sélectionnés), un seul partenaire commun a été retrouvé au sein des 29 partenaires sélectionnés par le domaine SH3 fodrine : il s'agissait de la famille 285, caractérisée comme faux-positif. Actuellement, l'hypothèse d'un seul partenaire intermédiaire reste donc à confirmer.

Toutefois, la présence d'un complexe incluant deux partenaires intermédiaires peut être envisagée. En effet, Laurence Malbert-Colas a identifié la protéine WWP1 comme partenaire de ENaC. Cette protéine contient entre autre, quatre domaines WW. Comme les domaines SH3, les domaines WW sont de petits modules protéiques de 40 acides aminés impliqués dans des interactions avec des protéines contenant également des motifs riches en proline mais de type PPXY (motif PY). Cette protéine WWP1 présente une organisation structurale proche de la protéine Nedd4 qui régule négativement l'activité de ENaC en assurant sa dégradation lysosomiale. Les domaines WW de Nedd4 se lient spécifiquement sur des motifs PY présents sur les extrémités C-terminales des sous-unités β et γ de ENaC et dans une moindre mesure sur la sous-unité α . Parmi les protéines identifiées comme partenaires potentiels du domaine SH3 de la fodrine et contenant des motifs en proline, trois pourraient également se fixer à des protéines possédant des domaines WW et être ainsi des intermédiaires entre la fodrine et ENaC :

1. la protéine WBP11 (*WW domain binding protein 11*, 24 clones), dont la seule propriété connue est sa capacité à lier des domaines WW (Bedford *et coll.*, 1998). Les premiers résultats obtenus au laboratoire montrent que cette protéine WBP11 interagit très fortement, par double-hybride, avec la protéine WWP1. Notre clone WBP11, correspondant aux 142 derniers acides aminés sur 389, contient de nombreux motifs riches en proline ($n=7$) d'un type particulier : PPPGPPPG. Cette protéine pourrait donc participer à la formation d'un complexe multiprotéique SH3-fodrine/WBP11/ WWP1/ α ENaC. Cependant les interactions mises en évidence *in vitro* ou dans la levure sont peu spécifiques, car cette protéine WBP11 peut interagir avec différents domaines WW et tous les domaines SH3 que nous

avons testés. La nature d'un tel complexe demande à être confirmée par d'autres méthodes indépendantes, soit à l'aide de peptides recombinants ou plus idéalement en immunoprécipitant un tel complexe à partir d'un lysat cellulaire surexprimant les différents partenaires ;

2. la protéine KIAA1014 (6 clones) qui contient trois motifs contenant de 8 à 14 prolines. La recherche de motifs particuliers que nous avons effectuée à l'aide du programme SMART (<http://coot.embl-heidelberg.de/SMART/>) indique la présence probable d'un domaine WW : score de $1,49 \times 10^{-4}$, score plus faible que ceux obtenus pour les quatre domaines WW de la protéine Nedd4 (compris entre $2,28 \times 10^{-9}$ et $1,09 \times 10^{-15}$). Le clone que nous avons étudié et qui possède le domaine WW présumé n'interagit pas avec α rENaC en double-hybride ;
3. la protéine p53BP2 (1 clone), partenaire de la protéine p53, contient un motif PPYPYPYP qui interagit *in vitro* avec les domaines WW n°1, 2 et 3 de WWP1 (Pirozzi *et coll.*, 1997). Elle contient également un domaine SH3.

2.2. Quels sont les autres partenaires du domaine SH3 de la fodrine ?

Trois protéines interagissent spécifiquement avec le domaine SH3 de la fodrine : la phosphotyrosyl protéine phosphatase de faible poids moléculaire (LMPTP), la phosphotyrosyl protéine phosphatase PTP-TD14 et une protéine inconnue possédant une phase ouverte de lecture de 38 kDa. Parmi ces trois protéines, deux sont dépourvues de motifs riches en proline de type PXXP. Il s'agit de la LMPTP et de la protéine inconnue de 38 kDa. En revanche, la protéine PTP-TD14 possède neuf motifs PXXP regroupés dans la partie C-terminale de la protéine.

2.2.1. Le domaine SH3 fodrine et les protéines tyrosine phosphatases

La phosphotyrosyl protéine phosphatase de faible poids moléculaire (LMPTP)

La LMPTP est le partenaire majoritaire (78 clones) identifié au cours de notre crible. Trois isoformes (A, B et C) de l'enzyme, générées par épissage alternatif du pré-ARMm, existent chez l'homme. Tous les clones étudiés (n=10) correspondent à l'isoforme A de la LMPTP. Catherine Fournier (1998) a également identifié, par criblage d'une banque de lymphocytes T humains (Jurkat) avec le système double-hybride, l'isoforme A de la LMPTP comme partenaire du domaine SH3 de la fodrine (17 clones). Les nombreux polymorphismes d'espèces rat/homme qui existent entre les deux enzymes (87 % d'identité de séquence) ne modifient pas l'interaction entre les deux partenaires ce qui suggère que cette interaction est conservée. Par contre, nous avons également démontré que la LMPTPA n'interagit pas avec le domaine SH3 de la spectrine qui présente 74 % d'identité avec le domaine SH3 de la fodrine.

Nous avons confirmé que les deux isoformes B et C étaient incapables d'interagir, en double hybride, avec le domaine SH3 de la fodrine. Il est à noter que la LMPTPA possède une séquence $_{54}PPDY_{57}$, absente de la LMPTPB. Ce motif reproduit la signature moléculaire consensus PPXY responsable des interactions avec les domaines WW. Les domaines SH3 et WW pouvant lier des ligands identiques (Chan *et coll.* 1996), il est possible que ce motif intervienne dans la liaison entre le SH3 fodrine et la LMPTPA. Cependant, nos résultats montrent que la région centrale spécifique de l'isoforme A et contenant ce motif PPDY n'est pas suffisante pour permettre l'interaction avec le SH3. Seule la protéine entière interagit. Toutes ces données indiquent une spécificité importante.

La faible activité β -galactosidase observée dans les levures diploïdes SH3_{fod}/LMPTPA laisse penser que cette interaction est faible ou transitoire, à l'instar d'une interaction de type enzyme/substrat. Les études *in vitro* (peptides recombinants, transcription/traduction *in vitro*) ne nous ont pas permis de reproduire cette interaction. Néanmoins, nous avons testé l'interaction des deux partenaires (LMPTPA débarrassée de la GST après clivage par la thrombine et GST-SH3_{fod}) en présence d'un agent pontant, le DMS. Une bande spécifique dont la masse moléculaire est compatible avec un complexe GST-SH3_{fod}/LMPTPA apparaît. Cette bande n'est pas observée lorsque les protéines GST-SH3_{fod} et LMPTPA sont remplacées séparément par les protéines GST-SH3_{spec} et LMPTPB. Ce résultat confirme à la fois les données obtenues par double-hybride mais également le fait que l'interaction pourrait être transitoire. L'une des difficultés majeures après l'identification des partenaires intéressants est de démontrer que les interactions existent bien en dehors du double-hybride. Cette difficulté est considérablement accrue pour des interactions faibles ou transitoires comme cela semble être le cas entre le SH3 fodrine et la LMPTPA.

La LMPTP est essentiellement retrouvée dans le cytosol bien que la majorité de ses substrats actuellement connus soient des protéines transmembranaires (bande 3, récepteur du PDGF, récepteur de l'insuline). Cette localisation cytosolique pourrait représenter un stock d'enzyme inactif prêt à être recruté dans les régions sous-membranaires. Cependant, une partie de la LMPTP est présente dans une fraction cellulaire insolubilisée par le Triton. Contrairement à la fraction cytosolique, cette fraction est phosphorylée sur tyrosine, probablement par la c-Src kinase (Cirri *et coll.*, 1998). La surexpression de la LMPTP inhibe la prolifération cellulaire induite par l'insuline ou le PDGF (Berti *et coll.*, 1994 ; Chiarugi *et coll.*, 1997).

L'interaction SH3 fodrine/LMPTPA pourrait participer au recrutement de l'enzyme vers la membrane, à proximité de ses substrats. La fodrine pourrait également être un substrat de la LMPTP. Il a été en effet démontré que la chaîne α de la fodrine était phosphorylée *in vivo* (Balasubramanian et Haganir, 1999) et *in vitro* par c-Src (Akiyama *et coll.*, 1986) et par une protéine tyrosine kinase de rate non identifiée (Wang *et coll.*, 1988). Nous avons étudié la phosphorylation par c-Src et Lck de nos peptides SH3, SH3- $\alpha 9$ et SH3- $\alpha 9$ - $\alpha 10$ fodrine et spectrine. Les résultats préliminaires montrent que seuls les peptides contenant l'unité conformationnelle $\alpha 10$ de la fodrine sont spécifiquement phosphorylés par les deux enzymes. Cette unité $\alpha 10$ ne contient qu'une seule tyrosine en position 1 176 située dans le site de

coupure pour les calpaïnes. La validation de la phosphorylation de ce résidu est actuellement en cours par mutagenèse dirigée. Il a été démontré que le clivage par les calpaïnes pouvait être régulé par la phosphorylation sur tyrosine du substrat. Ainsi, le clivage de la cortactine, protéine liant l'actine et très abondante dans les plaquettes circulantes, est augmenté après sa phosphorylation par c-Src (Huang *et coll.*, 1997). De manière similaire, la phosphorylation du résidu tyrosine 1 176 pourrait augmenter la protéolyse de la fodrine par les calpaïnes. La LMPTP, en déphosphorylant ce résidu localisé à proximité du domaine SH3, pourrait alors être un régulateur négatif de l'action des calpaïnes. Nos études préliminaires révèlent que la LMPTP est capable de déphosphoryler les peptides SH3 probablement phosphorylés par c-Src.

La phosphotyrosyl protéine phosphatase PTP-TD14

Parmi les trois familles spécifiques du domaine SH3 de la fodrine, nous avons identifié une deuxième phosphotyrosyl protéine phosphatase appelée TD14, dont l'ADNc a été très récemment cloné (Cao *et coll.*, 1998). Nous avons identifié neuf clones correspondant à l'ADNc de la PTP-TD14. Les séquences réalisées sur six clones révèlent une discordance de 63 acides aminés (résidus 1 302-1 364) avec la séquence publiée. Les séquences que nous avons obtenues sont en accord avec celles référencées dans les banques d'EST. Cette discordance est due à l'ajout d'une base G en position 4 033 suivie de l'absence d'une base A immédiatement après la position 4 219.

Cao *et coll.* ont démontré que la surexpression de la protéine PTP-TD14 dans les cellules NIH-3T3 diminue la formation des foyers de cellules transformées par *Ha-ras*. Une mutation dans le site catalytique de la protéine entraîne une perte de cette inhibition. L'enzyme possède une localisation cytoplasmique. À l'instar de ce qui se passe pour la LMPTP, la PTP-TD14 pourrait être localisée principalement dans le cytoplasme sous forme inactive et recrutée sous la membrane après activation d'une voie de signalisation particulière. Aucun substrat n'a pour le moment été identifié pour la PTP-TD14. Comme pour la LMPTP, l'interaction SH3 fodrine/PTP-TD14 pourrait avoir les mêmes fonctions (déphosphorylation de la fodrine ou recrutement de l'enzyme vers la membrane). Il faut noter que l'interaction avec la PTP-TD14 est beaucoup plus forte et plus spécifique que celle avec la LMPTP. En effet, il y a perte de l'interaction avec tous les mutants du domaine SH3 fodrine testés. La spécificité de l'interaction a été aussi confirmée par les études d'interaction *in vitro*. La présence de l'unité conformationnelle $\alpha 9$ renforce l'interaction SH3 fodrine/PTP-TD14, ce qui n'est pas le cas pour l'unité $\alpha 9$ de la spectrine. L'ensemble de ces résultats fait de la protéine PTP-TD14 le partenaire le plus intéressant du domaine SH3 de la fodrine. Pour compléter ces résultats (vérification de l'interaction dans la cellule par coimmunoprécipitation des partenaires surexprimés et étude de la déphosphorylation de la fodrine par l'enzyme), il est nécessaire de cloner l'ADNc complet de la PTP-TD14 car les clones isolés en double-hybride

ne contiennent que des séquences partielles. Nous criblons actuellement une banque d'ADNc de rein humain clonés dans un vecteur d'expression eucaryote (*Rapid-screen*TM *cDNA library panels*, Origene).

L'existence d'un complexe fodrine/phosphotyrosyl protéine phosphatase a déjà été rapportée : l'interaction de la protéine PTP CD45 avec la fodrine stimule son activité enzymatique, notamment la déphosphorylation des protéines kinases lck et fyn (Iada *et coll.*, 1994). La PTP CD45 est exprimée dans toutes les lignées hématopoïétiques à l'exception du globule rouge. Ainsi, non seulement le domaine SH3 pourrait permettre de recruter la LMPTP ou la PTP-TD14 vers la membrane, mais il pourrait également servir à réguler l'activité de ces enzymes dans cette région sous-membranaire.

2.2.2. Le domaine SH3 fodrine et la régulation de la polymérisation de l'actine

Deux familles de clones, N-WASP (6 clones) et RNB6 (9 clones) appartiennent à une famille de protéines adaptatrices VASP/WASP impliquées dans le contrôle spatial de la polymérisation de l'actine intervenant dans la mobilité cellulaire et l'établissement de la polarité cellulaire. Différents modèles suggèrent que ces protéines sont recrutées aux sites d'expansion de la membrane après un stimulus extracellulaire. Ensuite, ces protéines recrutent ou activent les différents composants de la machinerie de polymérisation de l'actine. Les membres de cette famille se caractérisent par :

1. un domaine EVH1 (*Enabled/VASP homology 1*) aussi appelé WH1 (*WASP homology 1*) localisé dans la partie N-terminale de ces protéines. Ce domaine EVH1 présente une structure similaire à celles des domaines PH et PTB (*Phosphotyrosine binding*) mais il lie les séquences riches en proline de type FPPPP (Prehoda *et coll.* 1999) retrouvées dans certaines protéines impliquées dans la transmission des signaux externes aux cytosquelette d'actine (zyxine, vinculine, SAX-3/Robo). Ce domaine permet le recrutement de ces protéines à la membrane ;
2. une séquence GPPPPP impliquée dans l'interaction avec la profiline, protéine liant les monomères d'actine et impliquée dans la régulation positive ou négative de la polymérisation ;
3. le domaine EVH2 localisé dans la partie C-terminale, liant les filaments d'actine.

N-WASP

La protéine ubiquiste N-WASP appartient à la sous-famille des protéines WASP/N-WASP. La partie centrale de N-WASP interagit avec la forme active (c'est-à-dire liée au GTP) de la petite protéine G, Cdc42 membre de la famille Rho (Ras homologue), connue pour stimuler la polymérisation de l'actine. La partie C-terminale de N-WASP participe au recrutement du complexe multiprotéique Arp2/3 impliqué dans la polymérisation des filaments d'actine (Rohatgi *et coll.*, 1999). La protéine N-WASP surexprimée

dans les cellules COS-7 est localisée principalement au niveau de la membrane plasmique et entraîne des protubérances membranaires (Miki *et coll.*, 1996 et 1998).

Le seul clone séquencé contient la totalité des séquences riches en proline (neuf motifs contenant de 5 à 11 prolines dont quatre motifs GPPPP). Ce partenaire n'est pas spécifique du domaine SH3 de la fodrine car il interagit avec les autres domaines SH3 testés. De même, il a été démontré une interaction de N-WASP avec la protéine Grb2 contenant deux domaines SH3 (Miki *et coll.* 1996). Cependant, l'effet des mutations E985A et P1017L démontre que cette protéine est bien un partenaire de domaines SH3. L'abondance des motifs riches en proline (58 % de proline sur 115 acides aminés) dans la région centrale de la protéine pourrait expliquer l'interaction de N-WASP avec plusieurs domaines SH3. Il serait intéressant de définir si parmi ces motifs, l'un est spécifique du domaine SH3 fodrine. Nos résultats d'interaction *in vitro* montrent que la présence de l'unité $\alpha 9$ renforce l'interaction avec le domaine SH3 de la fodrine alors que l'unité $\alpha 9$ de la spectrine, au contraire, diminue l'interaction. Ceci suggère donc que l'interaction N-WASP/fodrine est intéressante car elle est renforcée par les séquences englobant le domaine SH3. De plus, il a été démontré qu'un peptide GST-SH3_{fod} micro-injecté dans des fibroblastes en mouvement de poulet était transloqué au niveau des régions mobiles (lamellipodes) particulièrement riches en actine (Merilainen *et coll.*, 1993). De telles concentrations de ce peptide ne sont pas observées dans des cellules immobiles. Le peptide SH3 dépourvu des domaines classiques d'interaction avec la membrane présents sur la fodrine (MAD1 et MAD2, domaines de liaison à l'ankyrine et à la protéine 4.1) pourrait être recruté vers N-WASP localisée à la membrane grâce à son domaine EVH1 ou à son domaine de fixation de la petite protéine G, Cdc42, elle-même membranaire.

Il a été proposé que N-WASP pourrait exister sous deux conformations : l'une inactive, correspondant à une forme repliée sur elle-même dans laquelle l'extrémité C-terminale impliquée dans le processus de polymérisation de l'actine est masquée par une interaction avec la partie centrale qui contient le domaine de liaison à la protéine Cdc42 (Rohatgi *et coll.*, 1999) ; l'autre conformation, active, dans laquelle la partie C-terminale serait exposée et capable d'interagir avec Arp2/3 pour participer à la polymérisation de l'actine. Ces deux états semblent dépendants de la fixation de Cdc42, c'est-à-dire que Cdc42 ouvrirait ou maintiendrait l'ouverture de la molécule N-WASP. Par le biais de son domaine SH3 sur la partie centrale de N-WASP, la fodrine pourrait avoir la même fonction ou renforcer celle de Cdc42. Nous souhaitons conforter ces hypothèses en collaboration avec Marie-France Carlier (CNRS UPR A 9063, Gif-sur-Yvette) en utilisant les essais *in vitro* de reconstitution de la mobilité de la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* (Laurent *et coll.*, 1999).

RNB6

RNB6 est l'homologue, chez le rat, des protéines murine et humaine Evl (*Ena/VASP-like protein*) appartenant à la sous-famille Ena/VASP. Elle est essentiellement exprimée dans le cerveau, la rate, le

thymus et les testicules (Ohta *et coll.*, 1997). Bien que l'ARNm de RNB6 soit rare dans le rein (absence de signal par *Northern blot*), neuf clones contenant l'ADNc RNB6 ont été isolés dont au moins trois ne sont pas redondants (sur quatre clones séquencés). Tous les clones analysés contiennent au moins la partie centrale de la protéine dans laquelle se situent quatre motifs riches en proline. En double hybride, RNB6 interagit avec les différents SH3 testés et plus particulièrement avec le SH3 spectrine. Les interactions *in vitro* révèlent également que l'interaction est très faible avec le SH3 fodrine et n'est pas renforcée par les séquences environnantes alors qu'elle est très importante avec le SH3 spectrine. Comme pour N-WASP, il serait intéressant d'analyser l'effet des peptides recombinants SH3 spectrine sur la polymérisation de l'actine avec le système *in vitro* de reconstitution de la mobilité de la *Listeria monocytogenes*.

Fr1

La soumission de la séquence d'ADN du clone 283 dans la banque de données GenBank révèle qu'il est l'homologue d'une protéine, Fr1 (*Formin related 1*), appartenant à la famille des formines (également appelées *Limb Deformity Protein*). Aucune fonction n'est connue pour cette protéine Fr1 qui présente cependant l'architecture générale des formines contenant notamment deux motifs conservés : un motif riche en proline appelé FH1, d'une centaine d'acides aminés, (*Formin homology 1*) liant la profiline et un domaine appelé FH2, d'environ 130 acides aminés, contenant le motif consensus ILXXGNYMN(X)₃₋₇AXGF. Les formines lient également les petites protéines G de la famille Rho, telles que Rho et Cdc42. D'une façon générale, les formines participent à la réorganisation du cytosquelette durant la cytocinèse et l'établissement de la polarité cellulaire aussi bien dans les cellules de mammifères que chez la levure (Wasserman, 1998). Des mutations de certains membres de la famille des formines sont associées à des surdités, des troubles du développement des membres et du rein. Le clone séquencé (sur 31 clones identifiés par hybridation) débute juste en amont du domaine FH1. En double-hybride, cet ADNc n'est pas spécifique du domaine SH3 de la fodrine. Dans les interactions *in vitro*, les séquences environnant le domaine SH3 de la fodrine augmentent l'interaction. Il y a également une très bonne interaction avec le domaine SH3 de la spectrine.

2.2.3. Autres partenaires

e3B1

Nous avons identifié 26 clones e3B1 parmi les clones His⁺ LacZ⁺. Ce partenaire avait déjà été sélectionné par double-hybride sur une banque de lymphocyte T humain (Fournier, 1998). Récemment, Ziemnicka-Kotula *et coll.* (1998) ont également identifié la protéine e3B1 comme partenaire spécifique du domaine SH3 de la spectrine érythroïde à partir d'une banque de cerveau humain. Nos résultats de double-hybride et d'interaction *in vitro* confirment que la protéine e3B1 est beaucoup plus spécifique du domaine SH3 de la

spectrine. En séquençant 17 clones e3B1, nous avons montré qu'un motif, localisé entre les résidus Asp₄₂ et Thr₁₉₁ de la protéine, augmentait très fortement l'interaction avec les domaines SH3 de la spectrine et de la fodrine, en double-hybride. Un seul motif riche en proline (PPTQKPPSPP) présent dans cette région pourrait contenir les séquences interagissant fortement avec les deux domaines SH3. En ce qui concerne le rôle de e3B1, des études de surexpression de la protéine ont démontré qu'elle régule négativement la croissance des cellules murines NIH3T3 (Biesova *et coll.*, 1997). De plus, le gène e3B1 pourrait être un gène suppresseur de tumeur (Kotula, communication personnelle). Le rôle de l'interaction e3B1/SH3 spectrine est actuellement en cours, en collaboration avec l'équipe de Leszek Kotula.

cbl-b

Nous avons également identifié cette protéine comme partenaire du domaine SH3 de la fodrine sur la banque de lymphocytes T humains. La protéine cbl-b est similaire au proto-oncogène c-cbl. Elle est exprimée de manière ubiquiste mais plus fortement dans les tissus épithéliaux et dans les cellules hématopoïétiques. Comme les autres ligands, cbl-b possède une région riche en proline capable d'interagir avec différents domaines SH3 (Keane *et coll.*, 1995). La protéine cbl-b serait impliquée dans la régulation négative des transmissions de signaux via les récepteurs à activité tyrosine kinase (Ettenberg *et coll.*, 1999). Nous avons réussi à coimmunoprécipiter la protéine cbl-b avec les anticorps anti-FLAG à partir du lysat des cellules RCCD₁ surexprimant le peptide SH3- α 9-FLAG. Cependant, nous n'avons pas détecté l'interaction SH3 fodrine/cbl-b dans nos expériences de transcription/traduction *in vitro*. Cette interaction pourrait nécessiter soit une modification post-traductionnelle telle que la phosphorylation, soit la présence d'un troisième partenaire qui pourrait stabiliser le complexe SH3 fodrine/cbl-b. Il est nécessaire de reproduire les résultats de coimmunoprécipitation avant de comprendre le rôle de cette interaction. Nous souhaitons également compléter ces résultats par des expériences de colocalisation (généreusement fournis par l'équipe de Olivier Rosnet, INSERM U-119, Marseille).

Les ESTs

Parmi les trois ADNc les plus spécifiques du domaine SH3 de la fodrine, l'un n'est pas encore caractérisé (famille 306). De nombreuses séquences EST présentent une forte identité de séquence avec cet ADNc. La création d'un *contig* à l'aide des différentes EST montre qu'il pourrait s'agir d'un ARN d'environ 2 kb avec une phase de lecture ouverte codant pour un polypeptide de 342 acides aminés dont la masse moléculaire calculée est de 38 kDa. Les quatre clones de la famille 306 possèdent leur ADNc dans la même phase de lecture. Ce polypeptide possède 46 % d'identité de séquence avec la protéine du gène inconnu KIAA0512. La soumission de la séquence protéique putative avec le logiciel SMART montre qu'elle pourrait contenir un domaine appelé Armadillo comme unique signature moléculaire (score = $3,32 \times 10^{-1}$; à titre de comparaison, les 12 domaines Armadillo de la β -caténine donnent des scores compris entre $1,26 \times 10^{-1}$ et $2,95 \times 10^{-7}$), tout comme la protéine KIAA0512. Ces modules protéiques

d'une quarantaine d'acides aminés sont impliqués dans les interactions protéine-protéine. Par exemple, dans la plakoglobine, les domaines Armadillo servent à lier la protéine à l' α -caténine ou à la N-cadherine.

En ce qui concerne les autres ESTs identifiés après le crible, nous n'avons identifié aucune signature moléculaire particulière, si ce n'est qu'elles possèdent toutes un ou plusieurs motifs PXXP en phase avec le peptide GALDA. L'étude approfondie de ces protéines aux fonctions inconnues passe d'abord par l'identification de leurs phases de lecture complètes.

2.3. Avantages du système double-hybride

Deux avantages principaux font du double-hybride un système de choix pour étudier les interactions entre protéines. Tout d'abord, il est réalisé dans la levure, c'est-à-dire dans un organisme vivant, et donc dans des conditions plus physiologiques que les systèmes *in vitro*. Ensuite, il permet d'avoir accès à des interactions relativement faibles ($K_D > 70 \mu\text{M}$) qu'on ne peut pas saisir avec des méthodes reposant sur un faible taux de dissociation du complexe. Dans ce système, le signal analysé ($\text{His}^+ \text{LacZ}^+$) est proportionnel à la concentration des deux protéines hybrides à l'équilibre. Dans les autres techniques d'analyse d'interactions protéiques telles que la coimmunoprécipitation, la détection d'une interaction repose sur un faible taux de dissociation du complexe qui doit supporter plusieurs lavages stringents (présence de détergent) diminuant le signal, mais indispensables pour démontrer la spécificité de l'interaction. Ainsi, il est possible de détecter des interactions en double-hybride qu'on ne retrouve pas en coimmunoprécipitation (Brent et Finley, 1997).

2.4. Inconvénients du système double-hybride

Ce système très sensible, capable de détecter des interactions très faibles ou transitoires permet également d'avoir accès plus facilement à des interactions non spécifiques, ce qui constitue son principal défaut. Cette sensibilité pourrait expliquer le nombre important de ligands identifiés à l'issue du crible, notamment les ligands riches en proline du groupe 4, peu spécifiques du domaine SH3 de la fodrine. Par ailleurs, des séquences non codantes, ou en décalage de phase avec l'ADNc codant pour le domaine de transactivation de GAL4, conduisent à des peptides artificiels capables de se lier à l'appât utilisé, en l'occurrence, le domaine SH3 de la fodrine. Deux exemples illustrent ce fait : le seul partenaire du groupe 2 correspond sans doute à de l'ADN extragénique et le partenaire 282 du groupe 3 correspond à la partie 3' non codante d'une protéine. La traduction de ces séquences non codantes en phase avec l'ADNc de GAL4DA montre qu'elles codent pour des polypeptides riches en proline. Autre inconvénient, le système double-hybride est généré dans le noyau de la levure, ce qui peut être problématique lorsque l'on s'adresse à des protéines membranaires. Enfin, un ligand peut ne pas être isolé à l'issue du crible si celui-ci est toxique pour la levure.

Bien que cela ne soit pas un inconvénient du système double-hybride, notons qu'avec une banque de type « oligo dT » telle que celle que nous avons utilisée, on ne sélectionne que les parties 3' des grands transcrits, ce qui signifie que l'on peut passer à côté d'un ligand si la partie qui interagit avec l'appât est codée par la partie 5' du transcrit. Pour pallier ce défaut, il est possible d'utiliser en parallèle une banque dite *random-primed*, dans laquelle la synthèse d'ADNc est amorcée à partir d'hexanucléotides aléatoires, ce qui permet d'améliorer la complexité et la représentativité de la banque criblée, notamment dans les parties 5' des longs transcrits.

2.5. Fréquence des ADNc

Nous l'avons vu, chaque ADNc a été identifié en un ou en plusieurs exemplaires parmi les 309 clones positifs (His⁺ LacZ⁺). Cela pouvait correspondre à l'abondance des ADNc dans la banque à la condition que chacun d'eux présente une affinité identique pour le domaine SH3 de la fodrine. Mais cela pouvait aussi indiquer qu'un ADNc retrouvé dans un nombre élevé de clones possède une affinité plus forte qu'un autre ADNc retrouvé dans un nombre de clones plus restreint. Par exemple, nous avons retrouvé 34 clones possédant la partie 3' non codante d'un ADNc (famille 282) alors que l'ADNc le plus spécifique, celui codant pour la PTP-TD14, n'a été retrouvé que dans 9 clones. Le fait de retrouver un ADNc en de nombreux exemplaires ne signifie donc pas nécessairement qu'il est plus intéressant qu'un autre.

En outre, plusieurs paramètres vont jouer directement sur l'expression des gènes rapporteurs :

1. la force de l'interaction entre les deux partenaires ;
2. dans la levure, le niveau d'expression, la stabilité, la toxicité et le transport nucléaire de la protéine ligand ;
3. l'influence que chaque partenaire aura, de par l'encombrement stérique qu'il engendrera, sur l'orientation du domaine de transactivation de GAL4 et par conséquent sur l'efficacité avec laquelle celui-ci sera présenté à l'appareil de transcription.

En raison de ces différents paramètres, chaque ADNc issu d'un crible aura donc son propre effet sur l'expression des gènes rapporteurs, *HIS3* et *lacZ*. Une fois encore, un ADNc qui permettra une forte expression, par exemple du gène *lacZ*, ne sera pas forcément plus intéressant.

Tous ces paramètres sont bien entendu difficiles d'accès, *a priori*. Aussi, s'intéresser uniquement aux ligands qui généraient une expression forte des gènes rapporteurs ou choisir l'ADNc qui était le plus représenté dans le crible nous a semblé risqué et c'est la raison qui nous a poussé à identifier la totalité des ADNc présents dans les clones His⁺ LacZ⁺.

2.6. Le domaine SH3 : un appât difficile

L'affinité des domaines SH3 pour leurs ligands est faible (K_D entre 5 et 100 μM) en comparaison par exemple aux domaines SH2 capables de lier des peptides phosphorylés sur un résidu tyrosine (K_D compris entre 10 et 100 nM). Le système double-hybride est donc idéal pour détecter de telles interactions. Une interaction peu spécifique entre un domaine SH3 et son ligand peut être stabilisée par la présence d'autres domaines ou du moins par des séquences adjacentes, comme cela a été décrit notamment, par exemple, pour c-Src (Alexandropoulos et Baltimore, 1996), Abl (Cowburn *et coll.*, 1995) ou encore la phospholipase $C\gamma$ -1 (Graham *et coll.*, 1998). Le domaine SH3 que nous avons utilisé comme appât est relativement court (57 acides aminés) et est sorti de son contexte protéique normal. Rappelons qu'il est inséré dans une unité conformationnelle complète, entre les hélices B et C. Nous avons observé dans nos études d'interactions par transcription/traduction *in vitro* que les hélices localisées à proximité du domaine SH3 sont importantes pour renforcer la spécificité ou la force de l'interaction. Cependant, l'utilisation des séquences adjacentes (à savoir l'unité conformationnelle $\alpha 9$) n'a pas été possible car elles génèrent un bruit de fond élevé.

2.7. Avantages et inconvénients des interactions *in vitro*

Lorsque, à l'issue d'un crible, les ligands spécifiques ont été déterminés, il est ensuite intéressant de confirmer chacun d'entre eux par une ou plusieurs méthodes indépendantes avant de valider pleinement l'interaction *in vivo*.

La méthode que nous avons choisie pour confirmer les interactions est la technique de rétention sur une protéine de fusion GST-SH3 fodrine ou spectrine du partenaire présumé marqué avec de la [^{35}S]méthionine. Nous l'avons dit, dans cette technique, la détection de l'interaction repose sur un faible taux de dissociation du complexe ligand/SH3 qui doit résister à plusieurs lavages diminuant le signal spécifique. Il faut donc garder en mémoire, pour l'interprétation des résultats, que cette technique est moins sensible que la technique du double-hybride. Néanmoins, elle nous a permis de confirmer certaines interactions initialement observées en double-hybride.

Une autre difficulté de la méthode réside dans le fait de pouvoir amplifier, par PCR, des ADNc de grande taille (2 à 3 kpb). Afin de pallier ce défaut, nous avons développé un nouveau vecteur contenant un promoteur T7 suivi d'une séquence de Kozak entre la séquence codante pour GAL4DA et l'ADNc, ce qui permet de réaliser à la fois des interactions par le système double-hybride et de traduire *in vitro* le partenaire directement à partir du plasmide purifié. Nous avons démontré en testant l'interaction e3B1/GST-SH3_{spec} que l'insertion de la séquence promoteur T7/Kozak, d'une part modifiait peu l'interaction entre les deux partenaires et d'autre part permettait une transcription/traduction *in vitro* très efficace du partenaire (Article en préparation pour le journal *Analytical Biochemistry*). Il serait donc

particulièrement avantageux, à l'avenir, d'utiliser de tels vecteurs pour la construction de nouvelles banques car ils permettraient un gain de temps important dans les expériences d'interaction *in vitro*.

2.8. Isoformes de la fodrine

Nous avons caractérisé l'existence de deux isoformes de la chaîne α de la fodrine, produites par épissage alternatif du pré-ARNm. L'isoforme α II Σ 1 se distingue de l'isoforme α II Σ 2 par la présence d'une courte séquence de vingt acides aminés (Thr₁₀₅₃-Leu₁₀₇₂) localisée juste derrière le domaine SH3. Les deux isoformes sont produites en proportions très différentes selon le type cellulaire, ce qui suggère un rôle spécifique particulier de ces deux isoformes. Nous avons préparé des anticorps anti-(Asn₁₀₅₁-Tyr₁₀₇₄), c'est-à-dire spécifiques de l'isoforme α II Σ 1 afin d'étudier la localisation cellulaire de cette isoforme, en comparaison au marquage obtenu avec des anticorps anti-fodrine reconnaissant les deux isoformes. Malgré l'obtention de tels anticorps spécifiques, par immunotransfert, du peptide SH3- α 9(i)- α 10-(His)₆, il n'a pas été possible d'obtenir de marquage de la fodrine endogène que ce soit par immunotransfert ou par microscopie. Ceci pouvait s'expliquer par un titre trop faible du sérum. La purification des anticorps anti-(Asn₁₀₅₁-Tyr₁₀₇₄) n'a pas permis d'améliorer les résultats. Une protéine de fusion GST-(Asn₁₀₅₁-Tyr₁₀₇₄) a été utilisée pour le protocole d'immunisation du lapin. Il pourrait être intéressant d'immuniser un lapin avec le peptide correspondant aux acides aminés Thr₁₀₅₃-Leu₁₀₇₂ préalablement couplé à une protéine dite « transporteur », telle que la SAB. Par cette méthode classique, plusieurs molécules peuvent être couplées sur une seule molécule de SAB, ce qui permet généralement d'obtenir un sérum avec un meilleur titre, grâce à une meilleure présentation du peptide antigénique aux cellules du système immunitaire. Des anticorps anti-(Asn₁₀₅₁-Tyr₁₀₇₄) efficaces en microscopie confocale seraient un outil précieux pour la compréhension de la fonction de chaque isoforme. On peut imaginer que chacune d'elles pourrait avoir une localisation particulière dans la cellule, à l'instar du produit du gène β III, localisé exclusivement dans l'appareil de Golgi.

Nous avons montré par l'étude des interactions *in vitro* que les séquences adjacentes des domaines SH3 fodrine et spectrine étaient capables de renforcer les interactions avec plusieurs ligands isolés en double-hybride. D'une manière similaire à l'unité α 9, la séquence (Thr₁₀₅₃-Leu₁₀₇₂), spécifique de α II Σ 1, pourrait apporter une spécificité à l'interaction avec un ligand particulier du domaine SH3 de la fodrine selon les isoformes α II Σ 1 ou α II Σ 2. Ce pourrait être notamment le cas de la PTP-TD14 mais ce résultat demande à être confirmé.

Nous avons étudié le clivage de chaque isoforme par les calpaïnes μ et m et démontré que la séquence α II Σ 1 n'avait qu'un effet modéré sur celui-ci. Dans la recherche d'une fonction à chaque isoforme, nous envisageons de tester le comportement de chacune d'entre elles vis-à-vis de la caspase 3 qui, rappelons le, possède un site de clivage situé neuf acides aminés après le site de coupure pour les calpaïnes.

Un article regroupant l'ensemble des résultats de double-hybride et d'interaction *in vitro* est en préparation.

3. Perspectives générales

Nous avons identifié les partenaires potentiels du domaine SH3 de la fodrine par la technique du double-hybride. Afin de confirmer ou d'infirmer les interactions, ce travail a été complété pour certains partenaires par des études de liaison *in vitro*. Mais il est maintenant nécessaire de confirmer les interactions au sein de la cellule, ce qui peut être réalisé par coimmunoprécipitation et (ou) par colocalisation. L'étape la plus importante reste de définir la signification biologique de ces interactions.

En ce qui concerne la coimmunoprécipitation, dans un premier temps il est plus facile de travailler sur des lignées cellulaires surexprimant de manière stable ou transitoire un des partenaires ou les deux ensemble. De nombreuses protéines sont en effet plus ou moins exprimées en fonction de la multiplication et de la différenciation cellulaire mais également en fonction des stimuli extérieurs, ce qui accentue la difficulté de la coimmunoprécipitation, technique déjà peu aisée. Pour cela, les plasmides et les clones de cellules RCCD₁ surexprimant le domaine SH3 de la fodrine, déjà obtenus au cours de ce travail, pourront s'avérer particulièrement utiles. La technique de coimmunoprécipitation nécessite également une lyse cellulaire qui utilise des détergents pouvant déstabiliser fortement l'interaction entre le domaine SH3 et son ligand. Cette technique peut être utilisée si l'interaction entre les deux partenaires est suffisamment stable et forte pour résister aux conditions de lyse et de lavage requises. Les données obtenues dans nos expériences d'interactions *in vitro* fournissent déjà des informations sur la stabilité de ces interactions, leur comportement face à des détergents et les chances de réussite de la technique. Ces données pourront être utilisées pour établir les conditions de lyse classiques en présence de détergent. En revanche, pour les interactions plus faibles comme cela semble être le cas pour la LMPTPA, nous envisageons d'utiliser des méthodes non dissociatives telle que la perméabilisation des membranes cellulaires par la streptolysine-O, digitonine ou saponine.

Les interactions peuvent aussi être modulées par des modifications post-traductionnelles qui se produisent selon l'état d'activation de la cellule (phosphorylation). Il serait alors particulièrement intéressant de travailler avec des cellules cultivées à différents stades d'activation et de différenciation.

Il est préférable d'exprimer sur les protéines entières pour les techniques de colocalisation afin d'étudier les interactions dans un contexte « naturel » bien que cela ne soit pas *a priori* nécessaire pour la coimmunoprécipitation. En effet, certaines protéines pourraient être incluses dans des complexes

multiprotéiques indispensables à leur bon fonctionnement. Ce travail passe donc par le clonage préliminaire des ADNc complets des partenaires que nous souhaitons étudier. Ceci est actuellement en cours de réalisation pour la PTP-TD14, partenaire le plus spécifique du domaine SH3 de la fodrine mais nous envisageons également de cloner les ADNc de N-WASP, Fr1 et cbl-b.

En ce qui concerne les protéines impliquées dans les processus de polymérisation de l'actine, l'effet des domaines SH3 de la spectrine ou de la fodrine sera également étudié par reconstitution *in vitro* de la mobilité de la bactérie *Listeria monocytogenes* en collaboration avec Marie-France Carlier (CNRS UPR A 9063, Gif-sur-Yvette). Cette bactérie a en effet besoin de polymériser l'actine pour se déplacer en détournant la machinerie de polymérisation de l'actine intracellulaire.

Dans la recherche d'un éventuel partenaire intermédiaire entre le domaine SH3 de la fodrine et le canal à sodium, les partenaires du domaine SH3 de la fodrine ont été isolés à partir d'une banque de rein de rat. Cependant, les interactions présumées pourraient exister dans d'autres types cellulaires. Par exemple, la protéine WASP, homologue de N-WASP, est exprimée exclusivement dans les lignées hématopoïétiques. Par conséquent, il sera particulièrement intéressant de définir si les fonctions du domaine SH3 que nous proposons, telle que son implication dans la polymérisation de l'actine, sont présentes dans d'autres types cellulaires mais impliquant d'autres partenaires homologues. Ce travail sera réalisé sur différents types cellulaires tels que les lymphocytes ou les neutrophiles. Ces modèles pourraient même s'avérer plus adéquats pour certains partenaires comme la protéine cbl-b (particulièrement étudiée dans les lymphocytes).

Bibliographie

A

- Akiyama T, Kadowaki T, Nishida E, Kadooka T, Ogawara H, Fukami Y, Sakai H, Takaku F et Kasuga M (1986) Substrate specificities of tyrosine-specific protein kinases toward cytoskeletal proteins *in vitro*. *J Biol Chem.* **261**: 14797-14803.
- Alexandropoulos K et Baltimore D (1996) Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2- binding sites on a novel p130Cas-related protein, Sin. *Genes Dev.* **10**: 1341-1355
- Alloisio N, Morle L, Pothier B, Roux AF, Marechal J, Ducluzeau MT, Benhadji-Zouaoui Z et Delaunay J (1988) Spectrin Oran (α II/21), a new spectrin variant concerning the α II domain and causing severe elliptocytosis in the homozygous state. *Blood.* **71**: 1039-1047.
- Alloisio N, Morlé L, Maréchal J, Roux AF, Ducluzeau MT, Guetarni D, Pothier B, Baklouti F, Ghanem A, Kastally R et Delaunay J (1991) Sp $\alpha^{V/41}$: A common spectrin polymorphism at the α IV- α V domain junction. Relevance to the expression level of hereditary elliptocytosis due to α -spectrin variants located in trans. *J Clin Invest.* **87**: 2169-2177.
- Alloisio N, Dalla Venezia N, Rana A, Andrabi K, Texier P, Gilsanz F, Cartron JP, Delaunay J et Chishti AH (1993) Evidence that red blood cell protein p55 may participate in the skeleton-membrane linkage that involves protein 4.1 and glycophorin C. *Blood.* **82**: 1323-1327.
- Alper SL, Stuart-Tilley A, Simmons CF, Brown D et Drenckhahn D (1994) The fodrin-ankyrin cytoskeleton of choroid plexus preferentially colocalizes with apical (Na^+ + K^+)ATPase rather than with basolateral anion exchanger AE2. *J Clin Invest.* **93**: 1430-1438.
- Amin KM, Scarpa AL, Winkelmann JC, Curtis PJ et Forget BG (1993) The exon-intron organization of the human erythroid β -spectrin gene. *Genomics.* **18**: 118-125.

B

- Balasubramanian S et Haganir RL (1999) Characterization of phosphotyrosine containing proteins at the cholinergic synapse. *FEBS Letters.* **446**: 95-102.
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R et Fields S (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques.* **14**: 920-924.
- Beck KA, Buchanan JA, Malhotra V et Nelson WJ (1994) Golgi spectrin: identification of an erythroid β -spectrin homolog associated with the Golgi complex. *J Cell Biol.* **127**: 707-723.

- Beck KA et Nelson WJ (1996) The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine. *Am J Physiol.* **270**: C1263-70.
- Bedford MT, Reed R et Leder P (1998) WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**: 10602-10607.
- Bennett V (1990) Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev.* **70**: 1029-1065. (errata publiés dans i) *Physiol Rev.* **71**(1): avant « Table of Contents » et ii) *Physiol Rev.* **71**(4): 1193).
- Berti A, Rigacci S, Raugei G, Deglinnocenti D et Ramponi G (1994) Inhibition of cellular response to platelet-derived growth factor by low Mr phosphotyrosine protein phosphatase overexpression. *FEBS Lett.* **349**: 7-12.
- Biesova Z, Piccoli C et Wong WT (1997) Isolation and characterization of e3B1, an eps8 binding protein that regulates cell growth. *Oncogene.* **14**: 233-241.
- Birkenmeier CS, McFarland-Starr EC et Barker JE (1988) Chromosomal location of three spectrin genes: relationship to the inherited hemolytic anemias of mouse and man. *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**: 8121-8125.
- Blanco FJ, Ortiz AR et Serrano L (1997) 1H and 15N NMR assignment and solution structure of the SH3 domain of spectrin: comparison of unrefined and refined structure sets with the crystal structure. *J Biomol NMR.* **9**: 347-357.
- Bloch RJ et Morrow JS (1989) An usual β -spectrin associated with clustered acetylcholine receptors. *J Cell Biol.* **108**: 481-493.
- Bloom ML, Kaysser TM, Birkenmeier CS et Barker JE (1994) The murine mutation jaundiced is caused by replacement of an arginine with a stop codon in the mRNA encoding the ninth repeat of β -spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 10099-10103.
- Blot-Chabaud M, Laplace M, Cluzeaud F, Capurro C, Cassingéna R, Vandewalle A, Farman N et Bonvalet JP (1996) Characteristics of a rat cortical collecting duct cell line that maintains high transepithelial resistance. *Kidney Int.* **50**: 367-376.
- Bodine DM, Birkenmeier CS et Barker JE (1984) Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes. *Cell.* **37**: 721-729.
- Brent R et Ptashne M (1981) Mechanism of action of the lexA gene product. *Proc Natl Acad Sci USA.* **78**: 4204-4208.
- Brent R et Finley R (1997) Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annu Rev Genet.* **31**: 663-704.
- Bryson GL, Massa H, Trask BJ et Van Etten RL (1995) Gene structure, sequence, and chromosomal localization of the human red cell-type low-molecular-weight acid phosphotyrosyl phosphatase gene, ACP1. *Genomics.* **30**: 133-140.

- Byers TJ, Brandin E, Lue RA, Winograd E et Branton D (1992) The complete sequence of Drosophila β -spectrin reveals supra-motifs comprising eight 106-residue segments. *Proc Natl Acad Sci USA*. **89**: 6187-6191.

C

- Calvert R, Ungewickell E et Gratzer W (1980) A conformational study of human spectrin. *Eur J Biochem*. **107**: 363-367.
- Cao L, Zhang L, Ruiz-Lozano P, Yang Q, Chien KR, Graham RM et Zhou M (1998) A novel putative protein-tyrosine phosphatase contains a BRO1-like domain and suppresses Ha-ras-mediated transformation. *J Biol Chem*. **273**: 21077-21083.
- Canessa CM, Horisberger J-D et Rossier BC (1993) Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature*. **361**: 467-470.
- Chan DC, Bedford MT et Leder P (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J*. **15**: 1045-1054.
- Chang JG, Scarpa A, Eddy RL, Byers MG, Harris AS, Morrow JS, Watkins P, Shows TB et Forget BG (1993) Cloning of a portion of the chromosomal gene and cDNA for human β -fodrin, the nonerythroid form of β -spectrin. *Genomics*. **17**: 287-293.
- Chiarugi P, Cirri P, Marra F, Raugei G, Camici G, Manao G et Ramponi G (1997) LMW-PTP is a negative regulator of insulin-mediated mitotic and metabolic signalling. *Biochem Biophys Res Comm*. **238**: 676-682.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R et Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**: 9578-9582.
- Cianci CD et Morrow JS (1995) Cloning and characterization of human fetal brain alpha II spectrin. GenBank Accession number U26396.
- Cirri P, Chiarugi P, Taddei L, Raugei G, Camici G, Manao G et Ramponi G (1998) Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. *J Biol Chem* **273**: 32522-32527.
- Clark MB, Ma Y, Bloom ML, Barker JE, Zagon IS, Zimmer WE et Goodman SR (1994) Brain α erythroid spectrin: identification, compartmentalization, and β -spectrin associations. *Brain Research*. **663**: 223-
- Clark SG, Stern MJ et Horvitz HR (1992) *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature*. **356**: 340-344.
- Cowburn D, Zheng J, Xu Q et Barany G (1995) Enhanced affinities and specificities of consolidated ligands for the Src homology (SH) 3 and SH2 domains of Abelson protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*. **270**: 26738-26741.

- Cryns VL, Bergeron L, Zhu H, Li H et Yuan J (1996) Specific cleavage of α -fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1 β -converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem.* **271**: 31277-31282.

D

- Dahl SC, Geib RW, Fox MT, Edidin M et Branton D (1994) Rapid capping in α -spectrin-deficient MEL cells from mice afflicted with hereditary hemolytic anemia. *J Cell Biol.* **125**: 1057-1065.
- Davis J et Bennett V. 1990. The anion exchanger and (Na⁺+K⁺)ATPase interact with distinct sites on ankyrin in in vitro assays. *J Biol Chem.* **265**: 17252-17256.
- Davis LH et Bennett V (1994) Identification of two regions of β_E spectrin that bind to distinct sites in brain membranes. *J Biol Chem.* **269**: 4409-4416.
- Deng H, Lee JK, Goldstein LS et Branton D (1995) Drosophila development requires spectrin network formation. *J Cell Biol.* **128**: 71-79.
- DeSilva TM, Peng KC, Speicher KD et Speicher DW (1992) Analysis of human red cell spectrin tetramer (head-to-head) assembly using complementary univalent peptides. *Biochemistry.* **31**: 10872-10878.
- Devarajan P, Scaramuzzino DA et Morrow JS (1994) Ankyrin binds to two distinct cytoplasmic domains of (Na⁺,K⁺)ATPase α subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 2965-2969.
- Di Stasi AM, Gallo V, Ceccarini M et Petrucci TC (1991) Neuronal fodrin proteolysis occurs independently of excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Neuron.* **6**: 445-454.
- Doctor RB, Bennett V et Mandel LJ (1993) Degradation of spectrin and ankyrin in the ischemic rat kidney. *Am J Physiol.* **264**: C1003-13.
- Duttweiler HM (1996) A highly sensitive and non-lethal β -galactosidase plate assay for yeast. *Trends Genet.* **12**: 340-341.

E

- Ettenberg SA, Keane MM, Nau MM, Frankel M, Wang LM, Pierce JH et Lipkowitz S (1999) cbl-b inhibits epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene.* **18**: 1855-1866.

F

- Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA et Schreiber SL (1994) Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science.* **266**: 1241-1247.
- Fernández-Shaw C, Marina A, Cazorla P, Valdivieso F et Vázquez J (1997) Anti-brain spectrin immunoreactivity in Alzheimer's disease: degradation of spectrin in an animal model of cholinergic degeneration. *J Neuroimmunol.* **77**: 91-98.
- Fields S et Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature (London).* **340**, 245-246.

- Fishkind DJ, Bonder EM et Begg DA (1990) Sea urchin spectrin in oogenesis and embryogenesis: a multifunctional integrator of membrane-cytoskeletal interactions. *Dev Biol.* **142**: 453-464.
- Fournier C, Nicolas G, Gallagher PG, Dhermy D, Grandchamp B et Lecomte MC (1997) Spectrin St Claude, a splicing mutation of the human α -spectrin gene associated with severe poikilocytic anemia. *Blood.* **89**: 4584-4590.
- Fournier C (1998) Étude fonctionnelle du domaine SH3 des spectrines érythroïdes et non érythroïdes ; recherche de ligands par le système du double-hybride. Thèse d'État de l'Université Paris VII, discipline : biologie des cellules sanguines, soutenue le 6 mai 1998.
- Fowler VM et Adam EJ (1992) Spectrin redistributes to the cytosol and is phosphorylated during mitosis in cultured cells. *J Cell Biol.* **119**: 1559-1572.
- Fujimoto T, Lee K, Miwa S et Ogawa K (1991) Immunocytochemical localization of fodrin and ankyrin in bovine chromaffin cells in vitro. *J Histochem Cytochem.* **39**: 1485-1493.

G

- Gallagher PG, Weed SA, Tse WT, Benoit L, Morrow JS, Marchesi SL, Mohandas N et Forget BG (1995) Recurrent fatal hydrops fetalis associated with a nucleotide substitution in the erythrocyte β -spectrin gene. *J Clin Invest.* **95**: 1174-1182.
- Gallagher PG, Petruzzi MJ, Weed SA, Zhang Z, Marchesi SL, Mohandas N, Morrow JS et Forget BG (1997) Mutation of a highly conserved residue of β 1 spectrin associated with fatal and near-fatal neonatal hemolytic anemia. *J Clin Invest.* **99**: 267-277.
- Golemis EA et Brent R (1992) Fused protein domains inhibit DNA binding by LexA. *Mol Cell Biol.* **12**: 3006-3014.
- Goodman SR, Zimmer WE, Clark MB, Zagon IS, Barker JE et Bloom ML (1995) Brain spectrin: of mice and men. *Brain Res Bull* **36**: 593-606.
- Gorina S et Pavletich NP (1996) Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science.* **274**: 1001-1005.
- Graham LJ, Stoica BA, Shapiro M, DeBell KE, Rellahan B, Laborda J et Bonvini E (1998) Sequences surrounding the Src-homology 3 domain of phospholipase C γ -1 increase the domain's association with cbl. *Biochem Biophys Res Commun.* **249**: 537-541.
- Gregorio CC, Kubo RT, Bankert RB et Repasky EA (1992) Translocation of spectrin and protein kinase C to a cytoplasmic aggregate upon lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**: 4947-4951.
- Gregorio CC, Black JD et Repasky EA (1993) Dynamic aspects of cytoskeletal protein distribution in T lymphocytes: involvement of calcium in spectrin reorganization. *Blood Cells.* **19**: 361-371.
- Gregorio CC, Repasky EA, Fowler VM et Black JD (1994) Dynamic properties of ankyrin in T lymphocytes: colocalization with spectrin and protein kinase C β . *J Cell Biol.* **125**: 345-358.
- Greidinger EL, Miller DK, Yamin TT, Casciola-Rosen L et Rosen A (1996) Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Lett.* **390**: 299-303.

- Grimber G, Galand C, Garbarz M, Mattei MG, Cavard C, Zider A, Blanchet P, Boivin P, Briand P et Dhermy D (1992) Inherited haemolytic anaemia created by insertional inactivation of the α -spectrin gene. *Transgenic Res.* **1**: 268-274.
- Guan KL et Dixon JE (1991) Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem.* **192**: 262-267.
- Gundersen D, Orlowski J et Rodriguez-Boulan E (1991) Apical polarity of (Na⁺,K⁺)ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J Cell Biol.* **112**: 863-872.

H

- Haneji N, Nakamura T, Takio K, Yanagi K, Higashiyama H, Saito I, Noji S, Sugino H et Hayashi Y (1997) Identification of α -fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science.* **276**: 604-607.
- Harlan JE, Yoon HS, Hajduk PJ, Fesik SW (1995) Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry.* **34**: 9859-9864.
- Harris AS et Morrow JS (1988) Proteolytic processing of human brain α spectrin (fodrin): identification of a hypersensitive site. *J Neurosci.* **8**: 2640-2651.
- Harris AS et Morrow JS (1990) Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 3009-3013.
- Hayes NV, Phillips GW, Carden MJ et Baines AJ (1997) Definition of a sequence unique in β II spectrin required for its axon-specific interaction with fodaxin (A60). *J Neurochem.* **68**: 1686-1695.
- Hemming NJ, Anstee DJ, Mawby WJ, Reid ME et Tanner MJ (1994) Localization of the protein 4.1-binding site on an human erythrocyte glycoporphins C and D. *Biochem J.* **299**: 191-196. (Erratum publié dans *Biochem J.* **300**: 920)
- Hu RJ et Bennett V (1991) In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s). *J Biol Chem.* **266**: 18200-18205.
- Hu RJ, Watanabe M et Bennett V (1992) Characterization of human brain cDNA encoding the general isoform of β -spectrin. *J Biol Chem.* **267**: 18715-18722.
- Hu RJ, Moorthy S et Bennett V (1995) Expression of functional domains of β G-spectrin disrupts epithelial morphology in cultured cells. *J Cell Biol.* **128**: 1069-1080.
- Huang C, Tandon NN, Greco NJ, Ni Y, Wang T et Zhan X (1997) Proteolysis of platelet cortactin by calpain. *J Biol Chem.* **272**: 19248-19252.

I

- Iida N, Lokeshwar VB et Bourguignon LY (1994) Mapping the fodrin binding domain in CD45, a leukocyte membrane-associated tyrosine phosphatase. *J Biol Chem.* **269**: 28576-28583.

- Itoh M, Yonemura S, Nagafuchi A, Tsukita Sa et Tsukita Sh (1991) A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J Cell Biol.* **115**: 1449-1462.
- Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita Sa et Tsukita Sh (1993) The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* **121**: 491-502.

J

- Janicke RU, Ng P, Sprengart ML et Porter AG (1998) Caspase-3 is required for α -fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem.* **273**: 15540-15545.
- Jordan C, Püschel B, Koob R et Drenckhahn D (1995) Identification of a binding motif for ankyrin on the α -subunit of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. *J Biol Chem.* **270**: 29971-29975.

K

- Kadowaki T, Nishida E, Kasuga M, Akiyama T, Takaku F, Ishikawa M, Sakai H, Kathuria S et Fujita-Yamaguchi Y (1985) Phosphorylation of fodrin (nonerythroid spectrin) by the purified insulin receptor kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **127**: 493-500.
- Karinch AM, Zimmer WE et Goodman SR (1990) The identification and sequence of the actin-binding domain of human red blood cell β -spectrin. *J Biol Chem.* **265**: 11833-11840.
- Kashgarian M, Morrow JS, Foellmer HG, Mann AS, Cianci C et Ardito T (1988) $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ co-distributes with ankyrin and spectrin in renal tubular epithelial cells. *Prog Clin Biol Res.* **268B**: 245-250.
- Keane MM, Rivero-Lezcano OM, Mitchell JA, Robbins KC et Lipkowitz S (1995) Cloning and characterization of cbl-b: a SH3 binding protein with homology to the c-cbl proto-oncogene. *Oncogene.* **10**: 2367-2377.
- Kennedy SP, Warren SL, Forget BG et Morrow JS (1991) Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and nonerythroid β -spectrin. *J Cell Biol.* **115**: 267-277.
- Kennedy SP, Weed SA, Forget BG, Morrow JS (1994) A partial structural repeat forms the heterodimer self-association site of all beta-spectrins. *J Biol Chem.* **269**: 11400-11408
- Kotula L, Laury-Kleintop LD, Showe L, Sahr K, Linnenbach AJ, Forget B et Curtis PJ (1991) The exon-intron organization of the human erythrocyte α -spectrin gene. *Genomics.* **9**: 131-140.
- Kotula L., DeSilva TM, Speicher DW, Curtis PJ (1993) Functional characterization of recombinant human red cell alpha-spectrin polypeptides containing the tetramer binding site. *J Biol Chem.* **268**: 14788-14793
- Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125-8148.

L

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** : 680-685
- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröbe L, Jockusch BM, Weshland J, Gertler FB et Carlier MF (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*. **144**: 1245-1258.
- Lazarides E et Nelson WJ (1985) Expression and assembly of the erythroid membrane-skeletal proteins ankyrin (goblin) and spectrin in the morphogenesis of chicken neurons. *J Cell Biochem*. **27**: 423-441.
- Lecomte MC, Garbarz M, Gautero H, Bournier O, Galand C, Boivin P et Dherny D (1993) Molecular basis of clinical and morphological heterogeneity in hereditary elliptocytosis (HE) with spectrin α I variants. *Brit J Haematol*. **85**: 584-595.
- Lee JK, Coyne RS, Dubreuil RR, Goldstein LS et Branton D (1993) Cell shape and interaction defects in α -spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*. **123**: 1797-1809.
- Li X et Bennett V (1996) Identification of the spectrin subunit and domains required for formation of spectrin/adducin/actin complexes. *J Biol Chem*. **271**: 15695-15702.
- Lim WA, Richards FM et Fox RO (1994) Structural determinants of peptide-binding orientation and a sequence specificity in SH3 domains. *Nature*. **372**: 375-379.
- Liu SC et Palek J (1980) Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. *Nature*. **285**: 586-588.
- Lombardo CR, Rimm DL, Kennedy SP, Forget BG et Morrow JS (1993) Ankyrin independent membrane sites for non-erythroid spectrin. *Mol Biol Cell*. **4** (Suppl.), 57a.
- Lombardo CR, Weed SA, Kennedy SP, Forget BG et Morrow JS (1994a) β II-spectrin (fodrin) and β I Σ 2-spectrin (muscle) contain NH₂- and COOH-terminal membrane association domains (MAD1 and MAD2). *J Biol Chem*. **269**: 29212-29219.
- Lombardo CR, Rimm DL, Koslov E et Morrow JS (1994b) Human recombinant α -catenin binds to spectrin. *Mol Biol Cell*. **5** (Suppl.), 47a.
- Lombardo CR, Willardson BM et Low PS (1992) Localization of the protein 4.1-binding site on the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *J Biol Chem*. **267**: 9540-9546.
- Lux SE et Palek J (1995) In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP (eds) *Blood: principles and practice of hematology*. Lippincott, Philadelphia. 1701-1818.

M

- Ma Y, Zimmer WE, Riederer BM, Bloom ML, Barker JE, Goodman SR et Goodman SMR (1993) The complete amino acid sequence for brain β -spectrin (β -fodrin): relationship to globin sequences. *Brain Res Molec Brain Res*. **18**: 87-99. Errata publiés dans *Brain Res Molec Brain Res* (1993) **20**: 179, (1994) **21**: 181 et (1995) **30**:176].

- MacDonald RI, Musacchio A, Holmgren RA et Saraste M (1994) Invariant tryptophan at a shielded site promotes folding of the conformational unit of spectrin *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 1299-1303.
- Macias MJ, Musacchio A, Ponstingl H, Nilges M, Saraste M et Oschkinat H (1994) Structure of the pleckstrin homology domain from β -spectrin. *Nature*. **369**: 675-677.
- Malchiodi-Albedi F, Ceccarini M, Winkelmann JC, Morrow JS et Petrucci TC (1993) The 270 kDa splice variant of erythrocyte β -spectrin (β I Σ 2) segregates in vivo and in vitro to specific domains of cerebellar neurons. *J Cell Sci*. **106**: 67-78.
- Manno S, Takakuwa Y, Nagao K et Mohandas N (1995) Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by β -spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem*. **270**: 5659-5665.
- Marchesi VT et Steers E Jr (1968) Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science*. **159**: 203-204.
- Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC et Green DR (1995) Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem*. **270**: 6425-6428.
- McDonald FJ, Welsh MJ (1995) Binding of the proline-rich region of the epithelial Na⁺ channel to SH3 domains and its association with specific cellular proteins. *Biochem J*. **312**: 491-497.
- McKeown C, Praitis V et Austin J (1998) *sma-1* encodes a β H-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis. *Development*. **125**: 2087-2098.
- McMahon AP, Giebelhaus DH, Champion JE, Bailes JA, Lacey S, Carritt B, Henchman SK et Moon RT (1987) cDNA cloning, sequencing and chromosome mapping of a non-erythroid spectrin, human α -fodrin. *Differentiation*. **34**: 68-78. (erratum publié dans *Differentiation*. **34** :241).
- Merilainen J, Palovuori R, Sormunen R, Wasenius VM et Lehto VP (1993) Binding of the α -fodrin SH3 domain to the leading lamellae of locomoting chicken fibroblasts. *J Cell Sci*. **105**: 647-654.
- Michaud D, Guillet G, Rogers PA et Charest PM (1991) Identification of a 220 kDa membrane-associated plant cell protein immunologically related to human β -spectrin. *FEBS Lett*. **294**: 77-80.
- Miki H, Miura K et Takenawa T (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependant manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*. **15**: 5326-5335.
- Miki H, Sasaki T, Takai Y et Takenawa T (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*. **391** : 93-96.
- Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Moon RT et McMahon AP (1990) Generation of diversity in nonerythroid spectrins. Multiple polypeptides are predicted by sequence analysis of cDNAs encompassing the coding region of human nonerythroid α -spectrin. *J Biol Chem*. **265**: 4427-4433.

- Morrow JS, Cianci CD, Ardito T, Mann AS et Kashgarian M (1989) Ankyrin links fodrin to the α -subunit of (Na⁺,K⁺)ATPase in Madin-Darby canine kidney cells and in intact renal tubule cells. *J Cell Biol.* **108**: 455-465.
- Mussachio A, Noble MEM, Pauptit R, Wierenga RK et Saraste M (1992) Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature.* **359**: 851-855.

N

- Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB et Wang KK (1996) Non-erythroid α -spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 β -converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J.* **319**: 683-690.
- Nelson WJ et Veshnock PJ (1986) Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol.* **103**: 1751-1765.
- Nelson WJ et Veshnock PJ (1987) Ankyrin binding to (Na⁺,K⁺)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells. *Nature.* **328**: 533-536.
- Nelson WJ et Hammerton RW (1989) A membrane-cytoskeletal complex containing (Na⁺,K⁺)ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity. *J Cell Biol.* **108**: 893-902.
- Nelson WJ, Shore EM, Wang AZ et Hammerton RW (1990) Identification of a membrane-cytoskeletal complex containing the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin), ankyrin, and fodrin in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial cells. *J Cell Biol.* **110**: 349-357.
- Nilges M, Macias MJ, O'Donoghue SI et Oschkinat H (1997) Automated NOESY interpretation with ambiguous distance restraints: the refined NMR solution structure of the pleckstrin homology domain from β -spectrin. *J Molec Biol.* **269**: 408-422.

O

- Ohta S, Mineta T, Kimoto M et Tabuchi K (1997) Differential display cloning of a novel rat cDNA (RNB6) that shows high expression in the neonatal brain revealed a member of ENa/VASP family. *Biochem Biophys Res Comm.* **237**: 307-312.

P

- Pantazatos DP et MacDonald RI (1997) Site-directed mutagenesis of either the highly conserved Trp-22 or the moderately conserved Trp-95 to a large, hydrophobic residue reduces the thermodynamic stability of a spectrin repeating unit. *J Biol Chem.* **272**: 21052-21059.
- Parry DA, Dixon TW et Cohen C (1992) Analysis of the three- α -helix motif in the spectrin superfamily of proteins. *Biophys J.* **61**: 858-867.
- Pascual J, Pfuhl M, Rivas G, Pastore A et Saraste M (1996) The spectrin repeat folds into a three-helix bundle in solution. *FEBS Lett.* **383**: 201-207.

- Pascual J, Castresana J et Saraste M (1997a) Evolution of the spectrin repeat. *Bioessays*. **19**: 811-817.
- Pascual J, Pfuhl M, Walther D, Saraste M et Nilges M (1997b) Solution structure of the spectrin repeat: a left-handed antiparallel triple-helical coiled-coil. *J Molec Biol*. **273**: 740-751.
- Pédroni S, Lecomte MC, Gautero H et Dhermy D (1993) Heterogeneous phosphorylation of erythrocyte spectrin β chain in intact cells. *Biochem J*. **294**: 841-846.
- Perrin D et Aunis D (1985) Reorganization of α -fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature*. **315**: 589-592.
- Perrin D, Langley OK et Aunis D (1987) Anti-alpha-fodrin inhibits secretion from permeabilized chromaffin cells. *Nature*. **326**: 498-501.
- Piepenhagen PA, Peters LL, Lux SE et Nelson WJ (1995) Differential expression of (Na⁺,K⁺)ATPase, ankyrin, fodrin, and E-cadherin along the kidney nephron. *Cell Physiol*. **38**: C1417-C1432.
- Pirozzi G, McConnell SJ, Uveges AJ, Carter JM, Sparks AB, Kay BK et Fowlkes DM (1997) Identification of novel human WW domain-containing proteins by cloning of ligand targets. *J Biol Chem*. **272**: 14611-14616.
- Pollard TD (1984) Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from *Acanthamoeba* that shares antigenic determinants with vertebrate spectrins. *J Cell Biol*. **99**: 1970-1980.
- Pollerberg GE, Burridge K, Krebs KE, Goodman SR et Schachner M (1987) The 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res*. **250**: 227-236.
- Prchal JT, Papayannopoulou T et Yoon SH (1990) Patterns of spectrin transcripts in erythroid and nonerythroid cells. *J Cell Physiol*. **144**: 287-294.
- Prehoda KE, Lee DJ et Wendell AL (1999) Structure of the Enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell*. **97**: 471-480.

R

- Ralston GB et Dunbar JC (1979) Salt and temperature-dependent conformation changes in spectrin from human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*. **579**: 20-30.
- Ralston G, Cronin T et Branton D (1996) Self-association of spectrin's repeating segments. *Biochemistry*. **35**: 5257-5263.
- Randon J, Boulanger L, Marechal J, Garbarz M, Vallier A, Ribeiro L, Tamagnini G, Dhermy D et Delaunay J (1994) A variant of spectrin low-expression allele α LELY carrying a hereditary elliptocytosis mutation in codon 28. *Brit J Haematol*. **88**: 534-540.
- Ray FA et Nickoloff JA (1992) Site-specific mutagenesis of almost any plasmid using a PCR-based version of unique site elimination. *Biotechniques*. **13**: 342-346.
- Riederer BM, Zagon IS et Goodman SR (1986) Brain spectrin(240/235) and brain spectrin(240/235E): two distinct spectrin subtypes with different locations within mammalian neural cells. *J Cell Biol*. **102**: 2088-2097.

- Riederer BM, Zagon IS et Goodman SR (1987) Brain spectrin(240/235) and brain spectrin(240/235E): differential expression during mouse brain development. *J Neurosci.* **7**: 864-874.
- Rizzolo LJ et Zhou S (1995) The distribution of (Na⁺+K⁺)ATPase e and 5A11 antigen in apical microvilli of the retinal pigment epithelium is unrelated to α -spectrin. *J Cell Sci.* **108**: 3623-3633.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T et Takenawa T (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependant signals to actin assembly. *Cell.* **97**: 221-231.
- Romero F, Dargemont C, Pozo F, Reeves WH, Camonis J, Gisselbrecht S et Fischer S (1996) p95vav associates with the nuclear protein Ku-70. *Mol Cell Biol.* **16**: 37-44.
- Rotin D, Bar-Sagi D, O'Brodvich H, Merilainen J, Lehto VP, Canessa CM, Rossier BC et Downey GP (1994) An SH3 binding region in the epithelial Na⁺ channel (α rENaC) mediates its localization at the apical membrane. *EMBO J.* **13**: 4440-4450.

S

- Sahr KE, Laurila P, Kotula L, Scarpa AL, Coupal E, Leto TL, Linnenbach AJ, Winkelmann JC, Speicher DW et Marchesi VT (1990) The complete cDNA and polypeptide sequences of human erythroid α -spectrin. *J Biol Chem.* **265**: 4434-4443.
- Sambrook J, Fritsch EF et Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scoles DR, Huynh DP, Morcos PA, Coulsell ER, Robinson NG, Tamanoi F et Pulst SM (1998) Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with β II-spectrin. *Nat Genet.* **18**: 354-359.
- Seubert P, Baudry M, Dudek S et Lynch G (1987) Calmodulin stimulates the degradation of brain spectrin by calpain. *Synapse.* **1**: 20-24.
- Seubert P, Peterson C, Vanderklish P, Cotman C et Lynch G (1990) Increased spectrin proteolysis in the brindled mouse brain. *Neurosci Lett.* **108**: 303-308.
- Shotton DM, Burke BE et Branton D (1979) The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. *J Molec Biol.* **131**: 303-329.
- Siegel NJ, Devarajan P et Van Why S (1994) Renal cell injury: metabolic and structural alterations. *Pediatr Res.* **36**:129-136.
- Siman R, Baudry M et Lynch G (1984) Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci USA.* **81**: 3572-3576.
- Smith PR, Saccomani G, Joe EH, Angelides KJ et Benos DJ (1991) Amiloride-sensitive sodium channel is linked to the cytoskeleton in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**: 6971-6975.
- Sormunen R, Paakko P, Palovuori R, Soini Y et Lehto VP (1994) Fodrin and actin in the normal, metaplastic, and dysplastic respiratory epithelium and in lung carcinoma. *Am J Resp Cell Mol Biol.* **11**: 75-84.
- Sormunen R, Eskelinen S et Leong ASY (1997) Fodrin immunolocalization in epithelial tumors. *Applied Immunohistochemistry.* **5**: 179-184.

- Speicher DW, Morrow JS, Knowles WJ et Marchesi VT (1980) Identification of proteolytically resistant domains of human erythrocyte spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **77**: 5673-5677.
- Speicher DW et Marchesi VT (1982) Spectrin domains: proteolytic susceptibility as a probe of protein structure. *J Cell Biochem*. **18**: 479-492.
- Speicher DW et Marchesi VT (1984) Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. *Nature*. **311**: 177-180.
- Speicher DW, Weglarz L et DeSilva TM (1992) Properties of human red cell spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of an essential nucleation site. *J Biol Chem*. **267**: 14775-14782.
- Speicher DW, DeSilva TM, Speicher KD, Ursitti JA, Hembach P et Weglarz L (1993) Location of the human red cell spectrin tetramer binding site and detection of a related "closed" hairpin loop dimer using proteolytic footprinting. *J Biol Chem*. **268**: 4227-4235.
- Stabach PR, Cianci CD, Glantz SB, Zhang Z et Morrow JS (1997) Site-directed mutagenesis of α II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry*. **36**: 57-65.
- Stankewich MC, Tse WT, Peters LL, Ch'ng Y, John KM, Stabach PR, Devarajan P, Morrow JS et Lux SE (1998) A widely expressed β III spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**: 14158-14163.

T

- Tailor P, Gilman J, Williams S et Mustelin T (1999) A novel isoform of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase, LMPTP-C, arising from alternative mRNA splicing. *Eur J Biochem*. **262**: 277-282.
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M et Tada M (1998) Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. **273**: 12725-12731.
- Trave G, Lacombe PJ, Pfuhl M, Saraste M et Pastore A (1995) Molecular mechanism of the calcium-induced conformational change in the spectrin EF-hands. *Embo J*. **14**: 4922-4931.
- Tse WT, Lecomte MC, Costa FF, Garbarz M, Feo C, Boivin P, Dhermy D et Forget BG (1990) Point mutation in the β -spectrin gene associated with α I/74 hereditary elliptocytosis. Implications for the mechanism of spectrin dimer self-association. *J Clin Invest*. **86**: 909-916.
- Tsukamoto T et Nigam SK (1997) Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly. *J Biol Chem*. **272**: 16133-16139.
- Tuominen H, Sormunen R et Kallioinen M (1996) Non-erythroid spectrin (fodrin) in cutaneous tumours: diminished in cell membranes, increased in the cytoplasm. *Brit J Dermatol*. **135**: 576-580.

U

- Ungewickell E et Gratzer W (1978) Self-association of human spectrin. A thermodynamic and kinetic study. *Eur J Biochem*. **88**: 379-385.

- Ursitti JA, Pumpllin DW, Wade JB et Bloch RJ (1991) Ultrastructure of the human erythrocyte cytoskeleton and its attachment to the membrane. *Cell Motil Cytoskeleton*. **19**: 227-243.
- Ursitti JA, Kotula L, DeSilva TM, Curtis PJ et Speicher DW (1996) Mapping the human erythrocyte β -spectrin dimer initiation site using recombinant peptides and correlation of its phasing with the α -actinin dimer site. *J Biol Chem*. **271**: 6636-6644.

V

- Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH et Orrenius S (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem*. **271**: 31075-31085.
- Viel A et Branton D (1994) Interchain binding at the tail end of the Drosophila spectrin molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 10839-10843.
- Vojtek AB, Hollenberg SM et Cooper JA (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. **74**: 205-214.
- Vybiral T, Winkelmann JC, Roberts R, Joe E, Casey DL, Williams JK et Epstein HF (1992) Human cardiac and skeletal muscle spectrins: differential expression and localization. *Cell Motil Cytoskeleton*. **21**: 293-304.

W

- Wandersee NJ, Lee JC, Kaysser TM, Bronson RT et Barker JE (1998) Hematopoietic cells from α -spectrin-deficient mice are sufficient to induce thrombotic events in hematopoietically ablated recipients. *Blood*. **92**: 4856-4863.
- Wang C, Kong SK et Wang JH (1988) Characterization of fodrin phosphorylation by spleen protein tyrosine kinase. *Biochemistry*. **27**: 1254-1260.
- Wang DS, Shaw R, Winkelmann et Shaw G (1994) Binding of PH domains of β -adrenergic receptor kinase and β -spectrin to WD40/ β -transducin repeat containing regions of the β -subunit of trimeric G-proteins. *Biochem Biophys Res Comm*. **203**: 29-35.
- Wang DS et Shaw G (1995) The association of the C-terminal region of β 1 Σ 2 spectrin to brain membranes is mediated by a pH domain, does not require membrane proteins, and coincides with a inositol-1,4,5 triphosphate binding site. *Biochem Biophys Res Comm*. **217**: 608-615.
- Wasserman S (1998) FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol*. **8**: 111-115.
- Watanabe T, Tsuchida T, Kanda N, Mori K, Hayashi Y et Tamaki K (1999) Anti- α -fodrin antibodies in Sjogren syndrome and lupus erythematus. *Arch Dermatol*. **135**: 535-539.
- Wechsler A et Teichberg VI (1998) Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *EMBO J*. **17**: 3931-3939.
- Weng Z, Rickles RJ, Feng S, Richard S, Shaw AS, Schreiber SL et Brugge JS (1995) Structure-function analysis of SH3 domains: SH3 binding specificity altered by single amino acid substitutions. *Mol Cell Biol*. **15**: 5627-5634.

- Wilmotte R, Marechal J, Morle L, Baklouti F, Philippe N, Kastally R, Kotula L, Delaunay J et Alloisio N (1993) Low expression allele α LELY of red cell spectrin is associated with mutations in exon 40 (α V/41 polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. *J Clin Invest.* **91**: 2091-2096.
- Wilson R, Ainscough R, Anderson K, Baynes C, Berks M, Bonfield J, Burton J, Connell M, Copsey T, Cooper J et al (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature.* **368**: 32-38.
- Winkelmann JC, Chang JG, Tse WT, Scarpa AL, Marchesi VT et Forget BG (1990a) Full-length sequence of the cDNA for human erythroid β -spectrin. *J Biol Chem.* **265**: 11827-11832.
- Winkelmann JC, Costa FF, Linzie BL et Forget BG (1990b) β spectrin in human skeletal muscle. Tissue-specific differential processing of 3' β spectrin pre-mRNA generates a β spectrin isoform with a unique carboxyl terminus. *J Biol Chem.* **265**: 20449-20454.
- Winkelmann JC et Forget BG (1993) Erythroid and nonerythroid spectrins. *Blood.* **81**: 3173-3185.
- Winograd E, Hume D et Branton D (1991) Phasing the conformational unit of spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**: 10788-10791.

X

- Xu Y, Prabhakaran M, Johnson ME et Fung LW (1990) Secondary structure prediction for the spectrin 106-amino acid segment, and a proposed model for tertiary structure. *J Biomol Struct Dyn.* **8**: 55-62.

Y

- Yan Y, Winograd E, Viel A, Cronin T, Harrison SC et Branton D (1993) Crystal structure of the repetitive segments of spectrin. *Science.* **262**: 2027-2030.
- Yoon HS, Hajduk PJ, Petros AM, Olejniczak ET, Meadows RP et Fesik SW (1994) Solution structure of a pleckstrin-homology domain. *Nature.* **369**: 672-677.
- Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW et Schreiber SL (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell.* **76**: 933-945.
- Yu J, Fischman DA et Steck TL (1973) Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct.* **1**: 233-248.

Z

- Zhang P, Talluri S, Deng H, Branton D et Wagner G (1995) Solution structure of the pleckstrin homology domain of *Drosophila* β -spectrin. *Structure.* **3**: 1185-1195.

- Ziemnicka-Kotula D, Xu J, Gu H, Potempska A, Kim KS, Jenkins EC, Trenkner E et Kotula L (1998) Identification of a candidate human spectrin Src homology 3 domain-binding protein suggests a general mechanism of association of tyrosine kinases with the spectrin-based membrane skeleton. *J Biol Chem.* **273**: 13681-13692.
- Zuckerman JB, Chen X, Jacobs JD, Hu B, Kleyman TR et Smith PR (1999) Association of the epithelial sodium channel with Apx and α -spectrin in A6 renal epithelial cells. *J Biol Chem.* **274**: 23286-23295.

Index des Abréviations

α rENaC	<i>alpha subunit of the rat epithelial sodiul channel</i>
β ME	β -mercaptoéthanol
μ g	microgramme
μ l	microlitre
μ M	micromolaire
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AEBSF	4-(2-aminoéthyle)-benzènesulfonyle fluorure
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénine 5'-triphosphate
BET	bromure d'éthidium
Da	dalton
DA	domaine de transactivation
dATP	déoxy-adénosine triphosphate
dCTP	déoxy-cytidine triphosphate
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
dGTP	déoxy-guanosine triphosphate
DLA	domaine de liaison à l'ADN
dNTP	désoxyribonucléotide-5'-triphosphate
DO	densité optique
DO-L	milieu <i>drop out</i> sans leucine
DO-W	milieu <i>drop out</i> sans tryptophane
DO-WL	milieu <i>drop out</i> sans tryptophane et leucine
DO-WLH	milieu <i>drop out</i> sans tryptophane, leucine et histidine
DTT	DL-dithiothreitol
dTTP	déoxy-thymidine triphosphate
EDTA	éthylène diamine tétra-acétate
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EH	elliptocytose héréditaire
Fod	fodrine
GSH	glutathion
GST	<i>glutathion S-transferase</i>
GTP	guanosine triphosphate
IPTG	iso-propyl β -D-thiogalactopyranoside
kDa	kilo dalton
kpb	kilo paire de base

LELY	<i>low expression lyon</i>
LMPTP	<i>low molecular weight PTP</i>
M	molaire
MAD1	<i>membrane association domain 1</i>
MAD2	<i>membrane association domain 2</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
nM	nanomolaire
ONPG	ortho-nitrophenyl β -D-galactopyranoside
pb	paire de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	polyéthylène glycol
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PMSF	phényle méthyle sulfonyle fluoride
PTP	phospho-tyrosine phosphatase
PVDF	polyvinylidène difluorure
RMN	résonance magnétique nucléaire
SAB	sérum albumine bovine
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
Spec	spectrine
SSC	saline sodium citrate
SSPE	saline sodium phosphate EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
YPDA	<i>yeast peptone dextrose adenine</i>

Table des Figures

Figure 1 Représentation schématique de la membrane érythrocytaire et du squelette membranaire	12
Figure 2 Séquence en acides aminés de la chaîne $\alpha I\Sigma 1$	19
Figure 3 Structure trihélicoïdale des unités répétitives de la spectrine.....	21
Figure 4 Représentation des différents domaines et sites présents sur les chaînes α	23
Figure 5 Représentation des différents domaines et sites présents sur les chaînes β	24
Figure 6 Structure du domaine SH3 de la chaîne αII (fodrine)	28
Figure 7 Nomenclature des peptides SH3 utilisés	49
Figure 8 Test d'interaction par conjugaison	65
Figure 9 Localisation des amorces pGAD793-S et promT7-AS sur le plasmide pGAD-3S2X	69
Figure 10 Schéma du site de tétramérisation de la spectrine.....	76
Figure 11 Séquence intron-exon de la région caractéristique des isoformes $\alpha I\Sigma 1$ et $\alpha I\Sigma 2$	80
Figure 12 Distribution tissulaire ou cellulaire des isoformes $\alpha I\Sigma 1$ et $\alpha I\Sigma 2$	82
Figure 13 Étude du clivage des peptides SH3 fodrine par la calpaïne-m.....	84
Figure 14 Caractérisation des anticorps purifiés anti- $\alpha I\Sigma 1$	86
Figure 15 Vérification de la surexpression du peptide SH3- $\alpha 9$ -FLAG sur les clones résistants au G418.....	88
Figure 16 Mesure de la résistance transépithéliale (R_T).....	89
Figure 17 Immunoprécipitation du peptide SH3- $\alpha 9$ -FLAG.....	92
Figure 18 Étude de l'interaction entre $\alpha rENaC$ et le domaine SH3 de la fodrine par rétention d'un lysat cellulaire sur colonne d'affinité.....	93
Figure 19 Étude de l'interaction entre $\alpha rENaC$ et le domaine SH3 de la fodrine à l'aide de peptides recombinants.....	95
Figure 20 Crible d'une banque d'expression d'ADNc de rein de rat par la technique du double-hybride en utilisant le domaine SH3 de la fodrine comme appât ..	97
Figure 21 Vérification par immunotransfert de l'expression, dans la levure, du peptide LexA-SH3 _{fod}	99
Figure 22 Exemple de l'analyse des clones $Trp^+ Leu^+ His^+$ par expression du deuxième gène rapporteur LacZ.....	101
Figure 23 Digestion des ADNc par AluI et MboI	102
Figure 24 Stratégies employées pour l'identification des clones $Leu^+ Trp^+ His^+ LacZ^+$	104

Figure 25	<i>Analyse des clones Leu⁺ Trp⁺ His⁺ LacZ⁺ par hybridation avec une sonde marquée au [α-³²P]dCTP.....</i>	105
Figure 26	<i>Comparaison des domaines SH3 utilisés pour le test de spécificité et localisation des mutations</i>	110
Figure 27	<i>Exemple de test de spécificité par conjugaison.....</i>	111
Figure 28	<i>Interaction in vitro entre le domaine SH3 fodrine et les ligands.....</i>	121
Figure 29	<i>Spécificité de l'interaction entre la LMPTPA et le domaine SH3 fodrine.....</i>	126
Figure 30	<i>Recherche d'une région nécessaire et suffisante de la LMPTPA permettant l'interaction avec le domaine SH3 de la fodrine</i>	127
Figure 31	<i>Étude de l'interaction entre la LMPTPA et le domaine SH3 de la fodrine à l'aide de peptides recombinants.....</i>	129
Figure 32	<i>Isoformes de e3B1 produites par épissage alternatif (Ziennicka-Kotula et coll., 1998) et position des amorces utilisées par PCR.</i>	133
Figure 33	<i>Représentation schématique de l'interaction des hélices A et B de la chaîne β et de l'hélice C de la chaîne α.....</i>	138

Publications

relatives à ce travail

Article 1

Spectrin self-association site: characterization and study of β -spectrin mutations associated with hereditary elliptocytosis

Gaël NICOLAS*, Sophie PEDRONI*, Catherine FOURNIER*, Huguette GAUTERO*, Constantin CRAESCU†, Didier DHERMY* and M. Christine LECOMTE¹*

*INSERM U409, Faculté de Médecine Bichat, 75870 Paris cedex 18, France, and †INSERM U350, Institut Curie, 91405 Orsay cedex, France

Most of hereditary elliptocytosis (HE) cases are related to a spectrin dimer (SpD) self-association defect. The severity of haemolysis is correlated with the extent of the SpD self-association defect, which itself depends on the location of the mutation regarding the tetramerization site. This site is presumed to involve the first C helix of the α chain and the last two helices, A and B, of the β chain to reconstitute a triple helical structure (A, B and C), as observed along spectrin. Using recombinant peptides, we demonstrated that the first C helix of the α chain and the last two helices of the β chain alone are not sufficient to establish interactions, which only occurred when a complete triple-helical repeat was added to each partner. One adjacent

repeat is necessary to stabilize the conformation of both N- and C-terminal structures directly involved in the interaction site and is sufficient to generate a binding affinity similar to that observed in the native molecule. Producing peptides carrying a β^{HE} mutation, we reproduced the tetramerization defect as observed in patients. Therefore, the β^{W2024R} and β^{W2061R} mutations, which replace the invariant tryptophan and a residue located in the hydrophobic core, respectively, affect α - β interactions considerably. In contrast, the β^{A2013V} mutation, which modifies a residue located outside any presumed interacting regions, has a minor effect on the interaction.

INTRODUCTION

Hereditary elliptocytosis (HE) is a haemolytic disease related to defects within the erythrocyte membrane skeleton. HE is a heterogeneous disorder in terms of clinical severity, red-cell-morphology abnormalities and underlying molecular defects. Its clinical presentation ranges from an asymptomatic condition to fatal hydrops fetalis, with intermediate phenotypes such as mild HE showing compensated haemolysis and severe haemolytic anaemia, characterized by red-cell fragmentation (hereditary pyropoikilocytosis) [1,2]. HE results from mutations in the genes encoding the spectrin α and β chains and protein 4.1. These proteins (together with actin) are the major components of the erythrocyte skeleton, the complex protein network responsible for the characteristic shape and the unique physical properties of red cells, such as deformability and remarkable stability to shear stresses.

Spectrin is composed of two elongated subunits, an α and a β chain (280 000 and 246 000 Da, respectively), which are non-covalently associated side-by-side in an antiparallel orientation to form heterodimers (spectrin dimers, SpDs). Involving each α -chain N-terminus and each β -chain C-terminus, SpDs self-associate head-to-head to form tetramers that constitute the long flexible filaments of the network. SpD self-association is crucial in maintaining the stability and the integrity of the cell, as clearly pointed out by studies on HE. In almost all cases of HE caused by a spectrin molecular defect, there is a more-or-less pronounced deficiency in SpD self-association. Under such conditions, the severity of haemolysis depends on the extent of the spectrin self-association defect [2]. The same interaction has also been demonstrated to be critical for normal development in *Drosophila* [3].

Each spectrin chain is mainly made up of a succession of repeating segments flanked by non-consensus structures [4–6]: 22 repeats in the α chain and 17 in the β chain. The repeating units,

which are about 106 amino acids long, show low sequence identity (roughly 20%), but some residues are highly conserved, notably leucine and tryptophan at positions 26 and 45 of the repeats, respectively. As first proposed by Speicher and Marchesi [4], and recently confirmed by crystallographic and NMR data on a repeating unit of *Drosophila* α spectrin [7] and chicken brain α spectrin [8], the repeating motifs are folded in a triple-helical coiled-coil structure made up of helices A, B and C. Previous CD studies and analyses of protease sensitivity of *Drosophila* and human α -spectrin recombinant peptides have led to determination of the phasing of the native folded structure: the beginning of the stable conformational unit is shifted 20–30 residues toward the C-terminal end relative to the originally suggested alignment of the repeat-unit sequences [9,10]. Thus the conformational unit begins around the invariant leucine at position 26 in the repeat sequence and continues up to the same residue of the following repeat, involving helices A and B of one repeat unit and helix C of the following repeat. The crystallographic studies suggest the presence of a long helix C–A rather than two separate helices C and A, this long helix making the link between two triple-helical bundles.

According to the phasing and the triple-helical structure of the motif, the N-terminal end of the α chain begins with an isolated C helix ($\alpha 1$), whereas the β chain ends in an incomplete structure ($\beta 17$), consisting of helices A and B, followed by an unfolded segment called domain III. It has been proposed that the two A and B helices of the last repeat $\beta 17$ interact with the first C helix of the α chain to constitute a triple-helical structure similar to the repeats along the remainder of spectrin molecule (Figure 1) [11,12].

This model was first inferred from the relationship between the severity of the spectrin self-association defect and the location of the underlying mutations found in HE. Most amino acid substitutions located in the helices that were presumed to be involved in the self-association site are related to more severe

spectrin self-association defects than those located outside these helices. Shortened β -chain variants truncated at the C-terminal end with partial or complete deletion of the final helix B cannot interact with the N-terminus of the α chain [13,14]. This model was reinforced by studies involving partial or complete deletions of these helices from large recombinant peptides corresponding to the ends of the α and β chains. Loss of the first 16 residues of the α chain decreased its binding affinity to the β chain by about 50% [12]. Further truncations of recombinant peptides encompassing the α I domain, by deleting the 27, 30 or 49 residues, totally abolished detectable head-to-head association with the complementary β subunit [10]. In a similar way, deletions of the two last helices of the β chain led to a loss of binding to the α partner [15].

These data demonstrated the involvement of these three helices in the dimer-dimer contact site but did not indicate whether they alone are sufficient for binding. To determine whether the three helices compose the complete self-association site and to better define the bounds of this site, we have chosen to express several recombinant peptides encompassing different parts of the β -chain C-terminal domain and the α -chain N-terminal domain. We have tested their ability to associate with their respective partners and with SpDs. We have defined the minimum lengths of peptides required to generate the strong interaction observed in the native molecule and we have also determined the dissociation constant for the interaction of univalent peptides.

It is now well established that the severity of HE related to α^{HE} mutations depends on two parameters: (i) the location of the HE mutation in relation to the tetramerization site; and (ii) the proportion of mutated spectrin α chain present in the membrane, because the expression of the α^{HE} allele can be modulated by the presence *in trans* of a low-expression α allele, such as the α^{LELY} allele [16].

In HE arising from mis-sense β mutations, the clinical heterogeneity is also related to the severity of the spectrin self-association defect. Although all known mutations are located within the two helices in the self-association site, their effect on this function is variable. Two parameters, such as the nature of the substitution and the location of the mutation, could affect this function. To address this question, we have reproduced three previously defined β^{HE} mutations using site-directed mutagenesis on the recombinant peptides and we have analysed their effect on the interaction between the β -chain C-terminus and the α -chain N-terminus.

EXPERIMENTAL

Construction of the spectrin peptide expression plasmids

To identify the minimum length of peptides required in the tetramerization site, several recombinant peptides encompassing different parts of the C-terminal region of the β chain and of the N-terminal extremity of the α chain were expressed as glutathione S-transferase (GST) fusion proteins in *Escherichia coli* from the plasmid pGEX-2T (Pharmacia-Biotech) and the plasmid pGEX-KG [17].

The DNA fragments were obtained by PCR amplification of human spectrin cDNA clones (β 29 and α B6 clones were generous gifts from B. Forget, Yale University, NH, U.S.A.), using either *Taq* polymerase (Gibco-BRL) or Vent polymerase (Biolabs) with the primers as shown in Table 1.

For the four α -spectrin constructs cloned into pGEX-2T plasmid, the upstream primer contained a *Bam*HI restriction site, whereas the downstream primer contained a stop codon followed by an *Eco*R1 restriction site. The four α -spectrin constructs, α 1–50 (containing the first C helix), α 1–85 (helix

C–A), α 1–124 (helices C–A and B) and α 1–154 (first C helix followed by a triple-helical repeat) encode the first 50 (6.7 kDa), 85 (10.6 kDa), 124 (15.2 kDa) and 154 (18.3 kDa) residues of the spectrin α chain, respectively (Figure 1).

Concerning the β -spectrin constructs cloned in pGEX-KG vector, the 5'-end primer has an *Eco*R1 restriction site, whereas the 3'-end primer contained a stop codon, immediately followed by a *Hind*III restriction site.

The β -spectrin construct β 17C, from residue R2004 to Y2137 (15.9 kDa), consists of the last two A and B helices of the β chain, followed by the non-homologous C-terminal end; this corresponds to a partial fragment of repeat β 17 and complete domain III (Figure 1). The β -spectrin construct β 17, from residue R2004 to E2083 (10 kDa), contains only the last two A and B helices and corresponds to the β 17C peptide without the domain III. The β -spectrin construct β 16–17C, from residue Q1898 to Y2137 (28.7 kDa), and the β -spectrin construct β 16–17, from residue Q1898 to E2083 (22.8 kDa), correspond to the β 17C and β 17 peptides, including the last complete triple-helical repeat, respectively.

The purified PCR-amplified cDNAs were sequentially or simultaneously cut with the appropriate enzymes (Gibco-BRL) and directionally cloned into the restricted vector using standard techniques. *E. coli* strain JM109 (Stratagène) and strain OMPT–, a protease deficient strain (a generous gift from J. M. Clément, Institut Pasteur, Paris, France) were transformed by pGEX-2T and pGEX-KG plasmids, respectively. Transformant colonies were screened by peptide expression after induction by isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG, Appligène; 0.5 mM). Then the appropriate candidates were expanded for sequencing using Sequenase 2 (United States Biochemical Corp.) to confirm the fidelity of the construct. Because of residual polylinker sequences in the plasmid, the α -spectrin peptides have two additional residues (G and S) at the N-terminal end after thrombin cleavage and the β -spectrin peptides have the additional residues GSP-GISGGGGGI at the N-terminal end, as verified by micro-sequencing.

Site-directed mutagenesis

Mutations were introduced in the β -spectrin cDNA cloned in the pGEX-KG plasmids according to the site-directed mutagenesis method known as long primer-unique-site elimination mutagenesis [18] and modified as previously described [19]. The template target plasmid containing the cloned insert corresponding to the β 16–17C construct was amplified using two kinds of mutant primers: (i) the selection primer (sense primer) eliminates the unique *Bam*HI site by converting it to a *Kpn*I site (see bold sequence in Table 1); and (ii) the other primers (reversed primers) contain the desired mutations (Table 1).

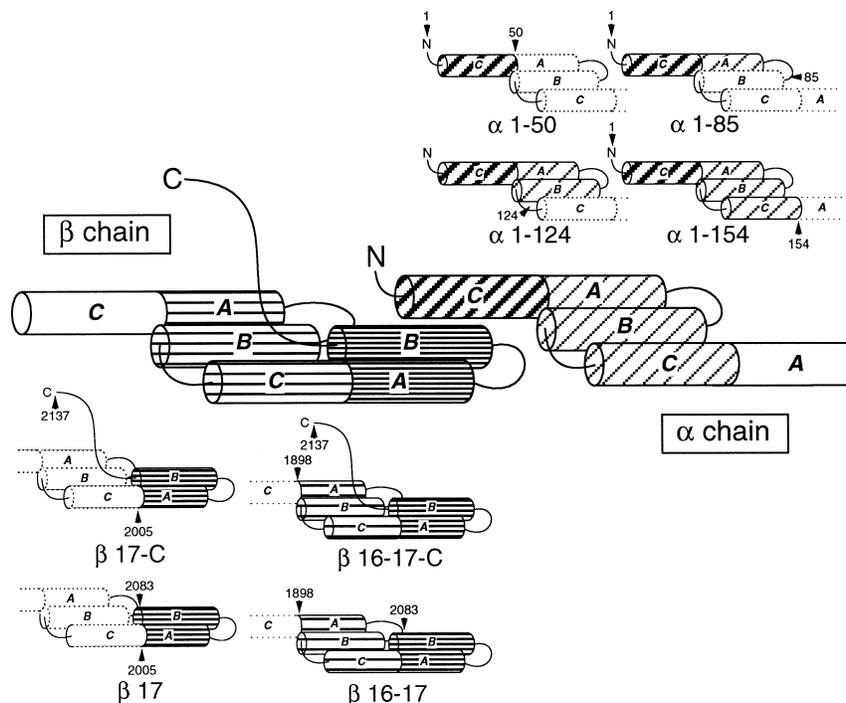
Expression and purification of recombinant peptides

Cells were grown at 37 °C in Terrific Broth medium containing ampicillin (100 μ g/ml). Overnight cultures were diluted (1:10) in Terrific Broth and were grown to an attenuation of 0.8–0.9 at 600 nm, and diluted again (4:5) prior to induction with 0.5 mM IPTG. Growth was continued for 1.5–2.5 h according to the stability of the recombinant peptide. After centrifugation, the bacterial pellets were frozen and stored at –20 °C. Frozen cells from 1 litre of culture were resuspended in 25–50 ml of 20 mM phosphate buffer (pH 7.3)/150 mM NaCl/0.5% Triton X100 containing 1 mM EDTA, 0.5 mM AEBSF [4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride] or PMSF, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin, 100 Units/ml aprotinin and 1 mM β -mercaptoethanol, and lysed by sonication. The expressed GST-spectrin fusion

Table 1 Design of recombinant α - and β -spectrin tetramerization-site peptides

Bold text indicates mutations within the primers. See text for more details.

Peptides	Amino acids	5' Primer	3' Primer
β 16–17C	1898–2137	5' G GGAAATTCAGCTAGTGGACACGGCGGAT 3'	5' GGAAGCTTTTACTAGTAGGGGTGAGAGGG 3'
β 16–17	1898–2083	5' G GGAAATTCAGCTAGTGGACACGGCGGAT 3'	5' GGAAGCTTTTACTACTCTGCAATCTGGCG 3'
β 17C	2005–2137	5' G GGAAATTCGGCTCCGCATGTTGCTGGAG 3'	5' GGAAGCTTTTACTAGTAGGGGTGAGAGGG 3'
β 17	2005–2083	5' G GGAAATTCGGCTCCGCATGTTGCTGGAG 3'	5' GGAAGCTTTTACTACTCTGCAATCTGGCG 3'
α 1–50	1–50	5' G GGGATCCGAGCAATTTCCAAAGGAAAC 3'	5' GGGAAATTCATCCTCAAGCTTCTGACCC 3'
α 1–85	1–85	5' G GGGATCCGAGCAATTTCCAAAGGAAAC 3'	5' GGGAAATTCCTTATTAGTTGGGTCTTCATAGCTCT 3'
α 1–124	1–124	5' G GGGATCCGAGCAATTTCCAAAGGAAAC 3'	5' GGGAAATTCCTTAGCAGAATGACCCATGGTAA 3'
α 1–154	1–154	5' G GGGATCCGAGCAATTTCCAAAGGAAAC 3'	5' GGGAAATTCCTTACAACCTGGTCACCCCTTCTC 3'
α -UR2	152–259	5' G GGGATCCAGTTGCTGCGGGCCCTGAA 3'	5' GGGAAATTCCTTAATTGGACAGAGCTTTCTG 3'
β 16–17C	A2023V	5' GATCTGGTTCGCGTGGT A CCCCGGGAATTTCCG 3'	5' GGGCAATCAGCCACACCTCAGCCACAGAG 3'
β 16–17C	W2024R	5' GATCTGGTTCGCGTGGT A CCCCGGGAATTTCCG 3'	5' CTGGGCAATCAGCCTCGCCTCAGCCACAG 3'
β 16–17C	W2061R	5' GATCTGGTTCGCGTGGT A CCCCGGGAATTTCCG 3'	5' CGCTCTGCCCTGCTGGCCGTG 3'

**Figure 1** Models of the self-association site and of the recombinant peptides used in this study

The positions of residues corresponding to the beginning and end of each recombinant peptide are indicated by arrows.

proteins were affinity purified on a glutathione–Sepharose column (Pharmacia-Biotech). The spectrin peptides were cleaved from the carrier protein by thrombin digestion on the affinity column. Spectrin peptides were purified to homogeneity by anionic exchange chromatography either on Mono Q or on Resource Q columns (Pharmacia-Biotech).

All the peptides were highly expressed in bacteria, but they

differed in their solubility and stability. The α peptides (α 1–50, α 1–85 and α 1–124) and the β peptides (β 17C and β 17 peptides) were less soluble and stable than α 1–154, β 16–17C and β 16–17 peptides, which contain a complete triple-helical repeat. The β 17C and β 16–17C fusion peptides, which contain the non-homologous part of the C-terminal end of the β chain, were susceptible to proteolysis. To reduce insolubility and proteolysis

of the less-stable peptides, expression was performed at 25–30 °C instead of 37 °C, and the β 16–17C and β 17C peptides were expressed in a protease-deficient strain, OMPT–.

After thrombin cleavage of fusion proteins immobilized on the glutathione–Sepharose Cl-4B affinity column, the α 1–50, α 1–85 and α 1–154 recombinant peptides were highly purified and had an apparent molecular mass in gel electrophoresis that was in agreement with the calculated value. The α 1–124 peptide was proteolysed during thrombin cleavage and consequently was not available for further investigation. Subsequent anion-exchange chromatography of the α 1–154 peptide revealed elution of a predominant peak and other, minor, peaks. The α 1–50 and α 1–85 peptides were poorly eluted from the anion-exchange column, even at high salt concentration. Thus, both these peptides were used after the affinity column without any further purification steps.

The β 17 and β 17C peptides were highly unstable after thrombin cleavage. The β 16–17 peptide, and particularly the β 16–17C peptide containing domain III, required subsequent anion-exchange chromatography to eliminate proteolytic products.

As previously observed [17], the series of glycine residues near the thrombin cleavage site, introduced in the fusion protein by the plasmid pGEX-KG, allowed almost complete cleavage (95–100%) compared with that achieved with fusion proteins expressed from the plasmid pGEX-2T (50–75%).

Binding assays

As indicated in the Figure legends, various mixtures of recombinant peptides in the form of fusion proteins, isolated peptides or ^{125}I -labelled peptides were incubated in isotonic buffer (150 mM NaCl/20 mM Tris, pH 7.4) at 0 °C for at least 4 h. Free and bound species were analysed following three different procedures. (i) When α -spectrin peptides were mixed with β -spectrin peptides as GST-fusion proteins, bound and free α -spectrin species were separated by centrifugation after adding glutathione agarose beads. After three successive centrifugations and washes, pellets containing bound ligands were analysed by SDS/PAGE [20]. (ii) Interactions between α - and β -spectrin peptides, free of GST, were analysed by rapid non-denaturing electrophoresis (15 min) at 4 °C using a Phast System (Pharmacia-Biotech). When one partner was ^{125}I -labelled, Coomassie Blue-stained bands were excised from the gel and quantified by γ -radiation counting (Beckman 7000 γ counter). Peptides were radiolabelled with Na^{125}I (Amersham) by the chloramine T method.

CD spectroscopy

The far-UV CD spectra were recorded on a Jasco 700 spectropolarimeter in 0.1 or 0.2 cm quartz cells at 20 °C. The protein concentration was determined by UV absorption at 280 nm, using the known molar extinction coefficient of the Trp, Tyr and Cys residues in the sequence. The spectra were obtained as an average of 10 runs and were corrected for the contribution of the buffer. The final CD data are shown as mean residue molar ellipticity in units of degrees $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

Other procedures

Native spectrin dimers were extracted from human erythrocyte membrane by incubation at 37 °C in a low ionic-strength buffer and dimer–tetramer formation was followed by non-denaturing electrophoresis as described previously [21].

SDS/PAGE was performed either as described by Laemmli [20] or by using a Phast system. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

Western blots were performed from Phast gels on PVDF membranes using diffusion blotting. Recombinant polypeptides were detected by rabbit polyclonal antibodies directed against either α - or β -spectrin chains. Blots were incubated with the peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin antibodies from goat and developed using Nitro Blue Tetrazolium as substrate [22].

Protein concentrations were determined by absorbance at 280 nm using extinction coefficients calculated from sequences.

RESULTS

CD studies

A coherent analysis of specific intermolecular interactions between biomolecules requires minimal information on the

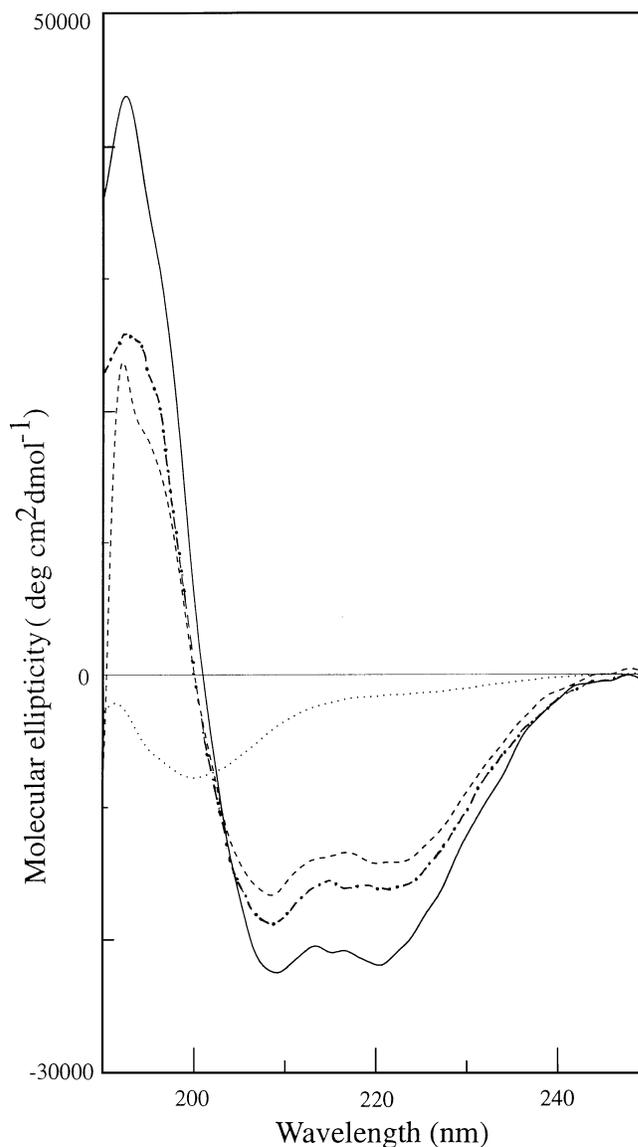


Figure 2 Far-UV spectra of some of the recombinant polypeptides in the present study

The spectra were obtained at 20 °C, in Tris buffer (5 mM), pH 8.5, containing EDTA (0.2 mM) and β -mercaptoethanol (0.2 mM). Dotted line, α 1–50; continuous line, α 1–154; broken line, β 16–17C; and dash-and-dot line, β 16–17.

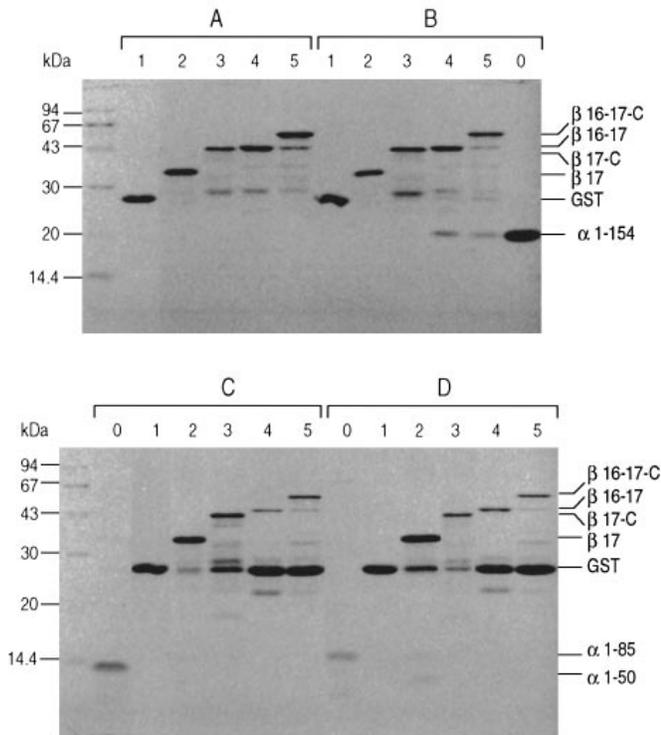


Figure 3 SDS/PAGE analysis of α - and β -spectrin recombinant peptides involved in the spectrin self-association site

GST and β -spectrin GST-fusion peptides (10–15 μ M) were incubated overnight at 0–4 $^{\circ}$ C in the absence of α recombinant peptides (A), or in the presence of each of the following spectrin α peptides (25–30 μ M): α 1–154 (B); α 1–50 (C); and α 1–85 (D). Unbound α peptides were eliminated by adding glutathione–agarose beads. The washed pellets were analysed by SDS/PAGE on a 14% acrylamide gel. Lanes 0 of (B), (C) and (D) correspond to isolated spectrin α peptides. Lane 1, GST; lane 2, β 17 fusion peptide; lane 3, β 17C fusion peptide; lane 4, β 16–17 fusion peptide; lane 5, β 17–16C fusion peptide.

structure content and stability of the molecules in the free state. For this aim, CD spectroscopy is generally used as a convenient method to evaluate the secondary structure of polypeptides. Figure 2 shows the far-UV CD spectra of some of the protein fragments used in the present study. The α 1–154 peptide gives a CD spectrum with all the characteristics of a highly helical polypeptide: two negative bands at 222 nm and 208 nm and a positive one at 192 nm [23]. A simple evaluation, using the molar ellipticity at 222 nm, gives a helical content of about 68%, a value that is somewhat lower than what could be predicted from the comparison with the crystallographic three-dimensional structure of the repetitive segment of spectrin (80%) [7]. Similarly, the protein fragments derived from the sequence of the β chain (β 16–17 and β 16–17C) have a high content of α -helix secondary structure. In contrast, the smaller polypeptide α 1–50 gives a small ellipticity and spectral features suggesting a random-coil structure. In the presence of 2,2,2-trifluoroethanol (30% v/v), a co-solvent which decreases the solvent polarity, the CD spectrum indicates the stabilization of some elements (about 15%) of helical structure (results not shown).

Determination of the peptides involved in the tetramerization site

It was previously shown [24] that polypeptides from the N-terminus of the α chain can readily associate with β -spectrin monomers at low temperature (4 $^{\circ}$ C) in contrast with the self-

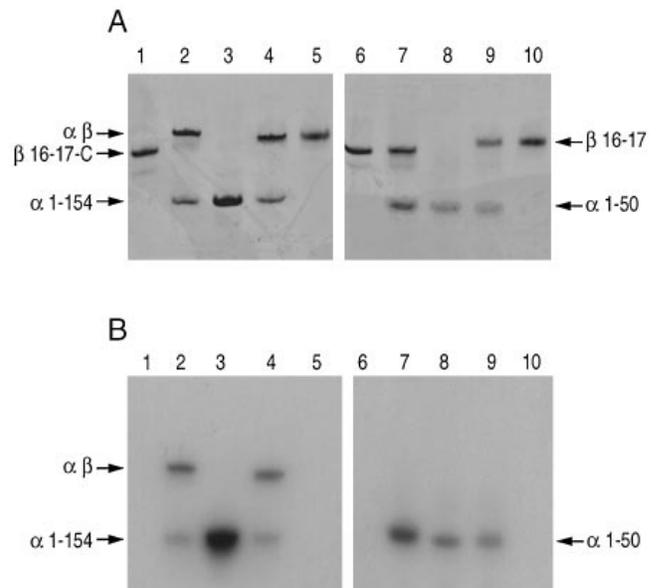


Figure 4 Analysis of spectrin peptides involved in the tetramerization site by non-denaturing electrophoresis

β 16–17 and β 16–17C peptides (approx. 10 μ M) were incubated with 125 I-labelled α 1–154 and α 1–50 peptides (10 μ M and 15 μ M, respectively) for 4 h at 0–4 $^{\circ}$ C and analysed by rapid non-denaturing gel-electrophoresis (15 min) at 4 $^{\circ}$ C using a Phast system (12.5% acrylamide gel). For this purpose, 6 μ l of each sample was loaded on the gel. (A) Coomassie Blue-stained gels. (B) Autoradiograms: lanes 1 and 6, β 16–17C peptide (15 μ M); lane 2, mixture of β 16–17C and α 1–154 at 10 μ M; lane 3, α 1–154 at 30 μ M; lane 4, mixture of β 16–17 and α 1–154 at 10 μ M; lanes 5 and 10, β 16–17 at 15 μ M; lane 7, mixture of β 16–17C and α 1–50 at 10 and 30 μ M, respectively; lane 8, α 1–50 at 15 μ M; lane 9, mixture of β 16–17 and α 1–50 at 10 and 15 μ M, respectively. The presence of α – β peptide complexes is indicated by arrows.

association of native SpD, which is infinitesimally slow under these conditions. The different recombinant peptides were therefore tested for their ability to associate with their respective partners at 0 $^{\circ}$ C in isotonic solution.

In a first approach, each β -spectrin peptide as a GST-fusion protein (10–15 μ M) was incubated with each of the different purified α -spectrin peptides, devoid of GST (25–30 μ M), and pelleted after attachment to glutathione–Sepharose beads (Figure 3). A significant proportion of α 1–154 peptide was found in the pellet with the β 16–17 and β 16–17C fusion peptides (Figure 3B, lanes 4 and 5, respectively) whereas no detectable amount of α 1–154 peptide was pelleted with the β 17 and β 17C fusion proteins (Figure 3B, lanes 2 and 3, respectively). No traces of α 1–50 and α 1–85 peptides were observed in the pellets after incubation with any of the four β -spectrin-fusion peptides (Figures 3C and 3D). GST immobilized on beads did not bind any of the α -spectrin peptides (lanes 1 of Figures 3B, 3C and 3D).

Direct interactions between α - and β -spectrin peptides, devoid of GST, were analysed by rapid non-denaturing gel electrophoresis. In this alternative approach, binding assays were performed between the four isolated β -spectrin peptides and two α 1–50 and α 1–154 125 I-labelled α -spectrin peptides. As shown in Figure 4, the α 1–50 peptide (lane 8), the α 1–154 peptide (lane 3) and the β 16–17 peptide (lanes 5 and 10) migrated in a short band, and the β 16–17C peptide (lanes 1 and 6) migrated in two bands. Only a fraction of the β 17 and β 17C peptides entered into the gel and migrated in several diffuse bands (results not shown).

Compared with the electrophoretic pattern of each isolated

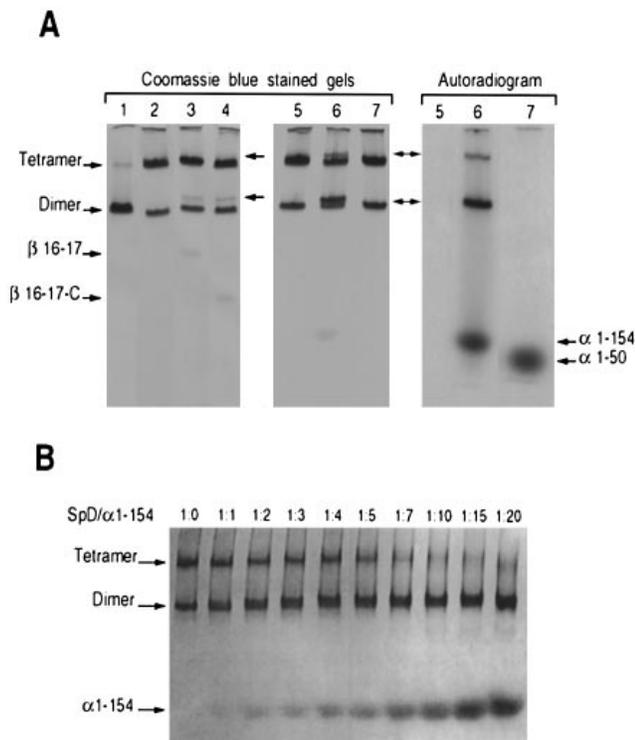


Figure 5 Interaction of α and β peptides with intact SpDs analysed by non-denaturing gel electrophoresis

(A) Spectrin dimers ($2 \mu\text{M}$; lane 1) were incubated for 4 h at 30°C , either alone (lanes 2 and 5), or in the presence of recombinant peptides: β 16-17 ($2 \mu\text{M}$; lane 3); β 16-17C ($2 \mu\text{M}$; lane 4); ^{125}I -labelled α 1-154 ($4 \mu\text{M}$; lane 6); and ^{125}I -labelled α 1-50 ($4 \mu\text{M}$; lane 7). The α 1-154, β 16-17 and β 16-17C peptides bound extensively to SpDs and to a lesser extent to spectrin tetramers, with the appearance of two new species (indicated by arrows). (B) SpDs ($2 \mu\text{M}$) were incubated with increasing amounts of α 1-154 peptide (molar ratio from 1:1 to 1:20).

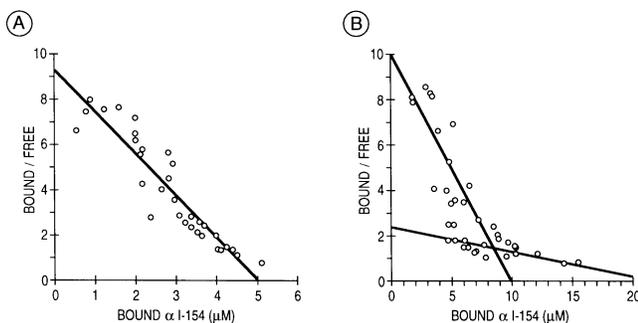


Figure 6 Scatchard representation of the α - β peptide interactions

β 16-17C peptide ($5 \mu\text{M}$; A) and β 16-17 peptide ($10 \mu\text{M}$; B) were incubated with increasing amounts of ^{125}I -labelled α 1-154 peptide. Free and bound species were separated and analysed by non-denaturing gel electrophoresis. The measured K_d was $0.9 \mu\text{M}$ for the interaction between β 16-17C and α 1-154 peptides. Scatchard analysis of the binding between α 1-154 and β 16-17 revealed two slopes (K_d approx. 1 and $7.5 \mu\text{M}$, respectively).

species, an additional band was only observed in the mixture of the α 1-154 and β 16-17C peptides, with a concomitant decrease in free species (Figure 4A, lane 2). This new band was radioactive (Figure 4B, lane 2) and was recognized by antibodies directed against either α spectrin or β spectrin (results not shown),

demonstrating that it corresponds to an α (1-154)- β (16-17C) complex. After electrophoretic separation of the mixture containing the α 1-154 and β 16-17 peptides (Figure 4A, lane 4), the free α 1-154 peptide decreased with no appearance of an additional band. Autoradiograms revealed the presence of an additional labelled band co-migrating with the β 16-17 peptide (Figure 4B, lane 4), showing that association of the two peptides had indeed occurred. We confirmed that the α (1-154)- β (16-17) complex has the same electrophoretic mobility as the free β 16-17 peptide by immunoblots (results not shown). We were unable to demonstrate an interaction between the α 1-154 peptide and either the β 17 or β 17C peptides, because both of these were unstable. Similar results were obtained when β species were used in the form of fusion proteins instead of isolated peptides.

Incubation of the α 1-50 peptide with either the β 16-17C or β 16-17 peptides led to no detectable association, even after 48 h (Figure 4, lanes 7-9).

Association of recombinant peptides with dimers

The head-to-head interactions of SpDs that lead to formation of a series of oligomers, tetramer, hexamer and so on, are based on the involvement of every α and β chain of the dimers. Therefore, the tetramer formation results from two α - β interactions. The isolated peptides α 1-50, α 1-154, β 16-17C and β 16-17 were tested for their ability to bind to native SpD and to compete against tetramer formation after incubation for 4 h at 30°C (Figure 5). When the concentrations of the peptides α 1-154, β 16-17C and β 16-17 were in the same range as the SpD concentration, they bound to SpD, and to a lesser extent to tetramers, with the appearance of two new species (Figure 5A). These new species were radiolabelled when labelled recombinant peptides were used in the experiment (Figure 5A). When the peptide concentration was increased and present in molar excess, the formation of tetramers was decreased with a concomitant increase in the new species migrating behind the SpD (Figure 5B). The species, which migrate just behind the dimers, correspond to the binding of one molecule of recombinant peptide to its respective partner in the SpD molecule: either an α peptide with the C-terminal end of a β chain or a β peptide with the N-terminal end of α chain. In these complexes, SpD-peptide, one binding site of SpD is involved in an interaction with the recombinant peptide, the other one remains free and can interact with one native SpD molecule to form tetramers. Therefore, the new species migrating behind the tetramers corresponded to the interaction between the SpD-peptide complex and native SpDs. The higher the recombinant peptide concentration, the greater the SpD-peptide formation and the lower the concentration of free SpD. As the SpD-peptide complex cannot interact with another SpD-peptide complex, and the free SpD concentration is decreased, the number of tetramers that form decreases.

The α 1-50 peptide did not show any detectable interaction with native SpDs or tetramers.

Determination of the association constants

The kinetics of the interaction between α 1-154 and either β 16-17C or β 16-17 peptides was analysed. ^{125}I -Labelled α 1-154 peptide at $10 \mu\text{M}$ was incubated with equimolar amounts of either β 16-17C or β 16-17 peptides for different times, and the species present in the mixture were analysed by non-denaturing gel electrophoresis. The interaction was fast, since between 65 and 85% of the complex had formed after a 5 min incubation and equilibrium was reached after 3-4 h. No detectable redistribution between the free and associated species occurred during the short time of electrophoresis (15 min).

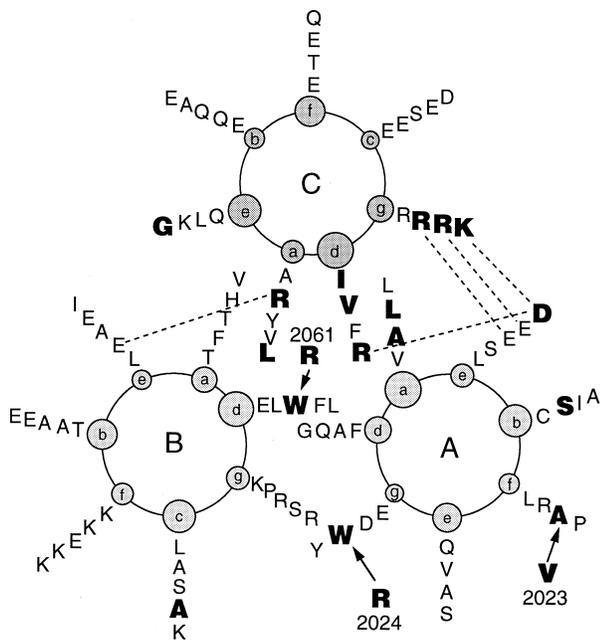


Figure 7 Axial helical projection of the SpD self-association site, based on crystallographic data of a *Drosophila* spectrin repeat [7]

Wheels A and B correspond to A and B helices of the incomplete $\beta 17$ repeat, and wheel C corresponds to the first C helix of spectrin α chain. The heptad positions (a–g) are shown by circles. Residues that are mutated in HE are shown in bold. The three β^{HE} mutations reproduced by directed mutagenesis are indicated by arrows: A2023V, W2024R and W2061R.

Association constants for binding of $\alpha 1$ –154 (0.5–25 μM) to $\beta 16$ –17C or $\beta 16$ –17 peptides have been determined from the equilibrium of two peptide preparations. $\beta 16$ –17C or $\beta 16$ –17 peptides (at 5 or 10 μM) were incubated for 20 h with increasing amounts of ^{125}I -labelled $\alpha 1$ –154 peptide. All determinations were in duplicate. The $\alpha 1$ –154 peptide interacted with the $\beta 16$ –17C peptide with a K_d value (\pm S.D.) of $0.9 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ($n = 4$) (Figure 6A). Concerning the interaction between the $\alpha 1$ –154 peptide and the $\beta 16$ –17 peptide, missing the non-homologous C-terminal end of the β chain, a Scatchard plot of the results suggested two binding components, one corresponding to a K_d value of $1.09 \pm 0.16 \mu\text{M}$ ($n = 3$), the other to a K_d value of $7.45 \pm 1.8 \mu\text{M}$ ($n = 3$).

Analysis of three β^{HE} mutations on the head-to-head α – β interaction

Three natural β^{HE} mutations discovered in different HE kindreds (A2023V, W2024R and W2061R) were reproduced using directed mutagenesis in the $\beta 16$ –17C peptide. These mutations are located within either the last A helix or the last B helix (Figure 7). The mutated peptides were tested for their ability as free peptides (15 μM) to interact with the $\alpha 1$ –154 peptide (up to 40 μM). Saturation curves (Figure 8A) revealed that the A2023V mutant peptide was able to bind to the $\alpha 1$ –154 peptide, in a range quite similar to the wild-type, since the K_d value, as determined by the Scatchard plot (Figure 8B) using the Prism software[®] programme (Graph Pad[®], San Diego, U.S.A.) was 8 μM . In contrast, the W2024R mutant peptide showed no ability to interact with the $\alpha 1$ –154 peptide, even in a 1:3 molar ratio, and the W2061R mutant peptide had an intermediate binding ability. The K_d values estimated from the Scatchard plot (Figures 8C and 8D)

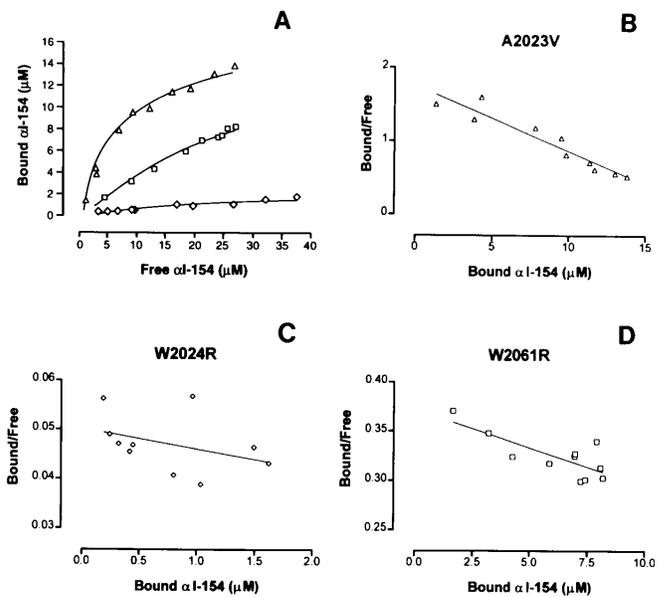


Figure 8 Interaction of β^{HE} mutant peptides with $\alpha 1$ –154 peptide

(A) Saturation curves. β^{HE} mutant peptides (15 μM) [(Δ) A2023V, (\diamond) W2024R and (\square) W2061R] were incubated with increasing amounts of ^{125}I -labelled $\alpha 1$ –154 peptide. (B), (C) and (D) Scatchard representations of the $\alpha 1$ –154 peptide interaction with the β^{HE} mutant peptides.

were higher than 100 μM (the K_d was 240 μM and 130 μM for the W2024R and W2061R mutant peptides, respectively).

DISCUSSION

Self-association of SpDs to tetramers is a crucial process for erythrocyte-membrane stability, as clearly demonstrated in HE states in which this function is defective. It is clear that the tetramerization process involves the last two A and B helices of the C-terminal end of the β -spectrin chain and the first C helix at the N-terminal end of α -spectrin chain. In this report, we have demonstrated that these helices alone are insufficient for the interaction. The peptide $\alpha 1$ –50, containing the first C helix of the α chain did not manifest any ability to interact with complementary β partners in the form of either recombinant peptides, at 0 $^\circ\text{C}$, or SpDs, at 30 $^\circ\text{C}$. As previously demonstrated [10,12], deletion of the first 45 residues of the α chain abolished binding of the α chain to the β chain. Thus, the first 50 residues, although required for binding, are apparently insufficient for binding to a β partner. The lack of binding could be related to the lack of folding, as indicated by CD studies. The complete helix C–A has no more binding capacity than the first part of the helix. Stable folding and strong interactions only occurred when the C helix was followed by a complete triple-helical repeat ($\alpha 1$ –154 peptide). This $\alpha 1$ –154 peptide was able to bind to native spectrin and to compete for the self-association site, and therefore contains a functional dimer-binding site. Similar conclusions can be drawn for the β -spectrin end: the last two A and B helices of the β -chain end ($\beta 17$ and $\beta 17\text{C}$ peptides) are unstable and insufficient to establish interactions with the α -spectrin partners; binding only occurred when a complete triple-helical repeat was added (peptides $\beta 16$ –17 and $\beta 16$ –17C). Thus, one adjacent repeat is necessary to stabilize the conformation of both N- and C-terminal

structures directly involved in the interaction site, and is sufficient to generate a binding affinity similar to that of the native molecule (K_d , 1 μM) [24]. In agreement with previous work from Kennedy et al. [15], we found that the non-homologous end of the β chain, i.e. the random domain III, is not required for the interaction with the N-terminal end of the α chain. The β 16–17 peptide binds strongly to the α 1–154 peptide, as well as to SpDs or tetramers, but the two limbs observed in the Scatchard plot for the β 16–17 peptide could suggest the presence of two populations, one with a fully active conformation, like the equivalent peptide with domain III, the other with a lower affinity. Domain III could stabilize the structure of either the last two A and B helices or the triple-helical structure occurring during the interaction.

In the self-association site as defined, several point mutations leading to HE have been located in the first C helix of the α chain, as well as in the last two A and B helices of the β chain. Clinical heterogeneity of HE, as reflected by the variable extent of haemolysis, appears to be related to the severity of the spectrin self-association impairment [21]. Concerning α -spectrin gene mutations, the extent of the spectrin self-association defect depends on two parameters: (i) the location of the mutation in relation to the self-association site; and (ii) the proportion of mutated HE spectrin α chain recruited to the membrane which, in turn, depends on the presence *in trans* (or *cis*) of low-expression α alleles, such as the α^{LELY} allele [16]. Conversely, in HE related to β -spectrin mutations, no low-expressed β -spectrin allele has been described so far and differences in severity as observed within the same α -spectrin HE kindred were not found in β -spectrin HE kindreds. Thus, the clinical heterogeneity of β -spectrin HE stemming from point mutations raises the question of whether a clear relationship exists between the self-association defect and the nature and position of the mutated residue. To address this question, three natural β -spectrin mutations found in different HE kindreds, were reproduced by directed mutagenesis in the self-association site. The A2023V mutation (spectrin^{Paris}) [25] was described in two related patients with fully asymptomatic HE, associated with a minor self-association defect (roughly 13% of SpD in the membrane compared with a normal value of 4%). The W2024R mutation (spectrin^{Linguerre}) [25] was found in two related patients with mild HE, associated with 30% of SpD in the membrane. The W2061R mutation (spectrin^{Cotonou}) [26] was described in a patient with mild HE with 24% of SpD in the membrane. Our studies *in vitro* of the interaction between α - and β -mutated recombinant peptides reproduced well the self-association defects observed in the HE patients. The replacement of either Trp-2061 or Trp-2024 affected considerably the α - β association, giving a K_d of 100 μM (normal value, 1 μM). In contrast, the mutation A2023V affected the interaction to a lesser extent (K_d approx. 8 μM).

In an attempt to understand better the relation between the nature and location of the mutated residues and impairment of the self-association process, Figure 7 shows the self-association site based on the crystallographic data for the *Drosophila* spectrin α 14 repeat [7]. Each of the three helices exhibits the heptad repeat pattern found in extended coiled-coil α -helical structures when the positions are conventionally labelled a–g; the residues at positions a and d are generally hydrophobic and lie inside the three-helix bundle. Electrostatic interactions also appear to stabilize the structure, and external interchain salt bridges are often formed by charged residues at positions e and g. All the mutated residues described so far in HE are indicated in bold in Figure 7. The amino acids that are particularly affected are in positions a, d, e and g. These correspond to regions seen to be involved in either hydrophobic or electrostatic interactions. The

results suggest that these positions could be crucial for the interaction between the three helices and, consequently, for the tetramer formation. The two mutations studied *in vitro* in this report and that strongly affect the binding are located in the presumed interaction site. The first, the W2061R mutation, affects a residue located within the hydrophobic core. The second, which seems to abolish the interaction, replaces the invariant Trp-2024 with arginine (W2024R). This tryptophan is highly conserved throughout the repeats of erythroid and non-erythroid spectrins, as well as in other spectrin family members (such as dystrophin and α -actinin). Our results indicate the crucial nature of this invariant tryptophan and confirm its contribution to formation of the triple-helical structure, as has been suggested [7,27]. The third mutation, A2023V, is conservative and modifies a residue located outside any presumed region of interaction. Its modest effect on self association could be related either to the kind of the mutation (conservative) or to its location. We have observed another similar conservative mutation, V31A, in an asymptomatic HE (Garbarz, M. and Dhermy, D. unpublished work), also presenting a modest defect on the tetramer formation (7.5% of SpD in the membrane for a control value of 2.5%). Although this mutation is located in the C helix of the spectrin α chain, at a d position in the hydrophobic core, the SpD self-association defect is moderate, suggesting that in this case the kind of mutation determines the reduced deleterious effect.

Taken together, our results showed the molecular basis of a direct correlation between the severity of both the self-association defect and the clinical expression in HE caused by β^{HE} point mutations, and the location and nature of the β -spectrin mutation.

REFERENCES

- Palek, J. and Jarolim, P. (1993) *Semin. Hematol.* **30**, 249–283
- Lux, S. E. and Palek, J. (1995) in *Blood: principles and practice of hematology* (Handin, R. I., Lux, S. E. and Stossel, T. P., eds.), pp. 1701–1818, Lippincott Co., Philadelphia
- Deng, H. Y., Lee, J. K., Goldstein, L. S. B. and Branton, D. (1995) *J. Cell Biol.* **128**, 71–79
- Speicher, D. W. and Marchesi, V. T. (1984) *Nature (London)* **311**, 177–180
- Sahr, K. E., Laurila, P., Kotula, L., Scarpa, A. L., Coupal, E., Leto, T. L., Linnebach, A. J., Winkelmann, J. C., Speicher, D. W., Marchesi, V. T., Curtis, P. J. and Forget, B. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4434–4443
- Winkelmann, J. C., Chang, J. G., Tse, W. T., Scarpa, A. L., Marchesi, V. T. and Forget, B. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11827–11832
- Yan, Y., Winograd, E., Viel, A., Harrison, S. C. and Branton, D. (1993) *Science* **262**, 2027–2030
- Pascual, J., Pfuhl, M., Rivas, G., Pastore, A. and Saraste, M. (1996) *FEBS Lett.* **383**, 201–207
- Winograd, E., Hume, D. and Branton, D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 10788–10791
- Kotula, L., DeSilva, T. M., Speicher, D. W. and Curtis, P. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14788–14793
- Tse, W. T., Lecomte, M. C., Costa, F. F., Garbarz, M., Feo, C., Boivin, P., Dhermy, D. and Forget, B. G. (1990) *J. Clin. Invest.* **86**, 909–916
- Speicher, D. W., DeSilva, T. M., Speicher, K. D., Ursitti, J. A., Hembach, P. and Weglarz, L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4227–4235
- Lecomte, M. C., Gautero, H., Garbarz, M., Boivin, P. and Dhermy, D. (1990) *Br. J. Haematol.* **76**, 406–413
- Pothier, B., Alloisio, N., Marechal, J., Morle, L., Ducluzeau, M. T., Caldani, C., Philippe, N. and Delaunay, J. (1990) *Blood* **75**, 2061–2069
- Kennedy, S. P., Weed, S. A., Forget, B. G. and Morrow, J. S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11400–11408
- Wilmotte, R., Maréchal, J., Morlé, L., Baklouti, F., Philippe, N., Kastally, R., Kotula, L., Delaunay, J. and Alloisio, N. (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 2091–2096
- Guan, K. L. and Dixon, J. E. (1991) *Anal. Biochem.* **192**, 262–267
- Ray, F. A. and Nickoloff, J. A. (1992) *BioTechniques* **13**, 342–348
- Nicolas, G., Pedroni, S., Fournier, C., Gautero, H. and Lecomte, M. C. (1997) *BioTechniques* **22**, 430–434

-
- 20 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680–685
- 21 Lecomte, M. C., Garbarz, M., Gautero, H., Bournier, O., Galand, C., Boivin, P. and Dhermy, D. (1993) *Br. J. Haematol.* **85**, 584–595
- 22 Taketa, K. (1987) *Electrophoresis* **8**, 409–414
- 23 Johnson, Jr., C. W. (1990) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **7**, 205–214
- 24 De Silva, T. M., Peng, K. E., Speicher, K. D. and Speicher, D. W. (1992) *Biochemistry* **31**, 10872–10878
- 25 Parquet, N., Devaux, I., Boulanger, L., Galand, C., Boivin, P., Lecomte, M. C., Dhermy, D. and Garbarz, M. (1994) *Blood* **84**, 303–308
- 26 Glele-Kakai, C., Garbarz, M., Lecomte, M. C., Leborgne, S., Galand, C., Bournier, O., Devaux, I., Gautero, H., Zohoun, I., Gallagher, P. G., Forget, B. G. and Dhermy, D. (1996) *Br. J. Haematol.* **95**, 57–66
- 27 MacDonald, R. I., Musacchio, A., Holmgren, R. A. and Saraste, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1299–1303
-

Received 10 September 1997/23 January 1998; accepted 10 February 1998

Article 2

M.C. Lecomte · G. Nicolas · D. Dhermy · J.C. Pinder
W.B. Gratzer

Properties of normal and mutant polypeptide fragments from the dimer self-association sites of human red cell spectrin

Received: 10 August 1998 / Revised version: 13 October 1998 / Accepted: 13 October 1998

Abstract We have examined the properties and interactions of expressed polypeptide fragments from the N-terminus of the α -chain and the C-terminus of the β -chain of human erythroid spectrin. Each polypeptide comprises one complete structural repeating unit, together with the incomplete repeat that interacts with its partner when spectrin tetramers are formed. The shared repeat thus generated is made up of two helices from the C-terminal part of the β -chain and one helix from the N-terminus of the α -chain. Three mutant β -chain fragments with amino acid substitutions in the incomplete terminal repeat were also studied. The α - and β -chain fragments were both substantially monomeric, as shown by sedimentation equilibrium. Circular dichroism analysis and thermal denaturation profiles revealed that the complete repeat present in each fragment had entered the stable tertiary fold. Unexpectedly, the conformational stability of the folded β -chain repeat was found to be grossly perturbed by the mutations, all of them well beyond its C-terminal boundary; possible explanations for this phenomenon are considered. Sedimentation equilibrium showed that in equimolar mixtures the wild-type α - and β -chain peptides formed a 1:1 complex. Mixing curves, observed by circular dichroism, revealed that association was accompanied by an increase in α -helicity. From continuous-variation profiles an association constant in the range $1\text{--}2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ was inferred. The association was unaffected by the apparently unstructured anionic tail of 54 residues, found at the C-terminus of the spectrin β -chain. Of the three mutations in the β -chain fragment, one (an Ala \rightarrow Val replacement in the A helix segment of the incomplete repeat) had a relatively small effect on the association with the α -chain fragment, whereas Trp \rightarrow Arg mu-

tations in the A and in the remote B helix segments were much more deleterious. These observations are consistent with the relative severities of the haemolytic conditions associated with the mutations.

Key words Spectrin · Self-association · Erythrocyte · Hereditary elliptocytosis

Introduction

The red cell membrane cytoskeleton, on which the mechanical properties of the membrane depend, has the form of a roughly hexagonal lattice composed of spectrin tetramers, extending between junctions made up of short actin filaments and a number of associated proteins (reviewed by Bennett 1990). The spectrin tetramers are formed from two antiparallel $\alpha\beta$ heterodimers, linked head-to-head. Both spectrin chains consist largely of a series of degenerate repeating units of about 106 residues, each with the conformation of an irregular three-stranded α -helical coiled-coil (Yan et al. 1993; Pascual et al. 1997). Successive repeats are united by a single long helix, its N-terminal half forming the third helix of one repeat and its C-terminal half the first helix of the next. At the N-terminus of the α -chain and the C-terminus of the β -chain there are incomplete repeats, comprising one and two strands respectively of the three-helix bundle. It was conjectured that to form a tetramer the spectrin dimers might associate by forming a complete repeat, and there is now compelling evidence that this is indeed the case (DeSilva et al. 1992; Kotula et al. 1993). The β -chain C-terminus also carries a strongly anionic tail of 54 residues, the sequence of which is unrelated to the repeat motif.

The dimer self-association sites are the locus of many mutations, which give rise to hereditary elliptocytosis, a form of haemolytic anaemia with severity varying between mild and lethal (Lux and Palek 1995). In these genetic variants the formation of tetramers is to a greater or lesser degree inhibited and the continuity of the membrane cyto-

M.C. Lecomte · G. Nicolas · D. Dhermy
INSERM U409, Faculté de Médecine Bichat,
F-75870 Paris Cedex 18, France

J.C. Pinder · W.B. Gratzer (✉)
Medical Research Council Muscle and Cell Motility Unit,
Randall Institute, King's College, 26–29 Drury Lane,
London WC2B 5RL, UK
e-mail: wbg@helios.rai.kcl.ac.uk

skeletal network is accordingly lost. Wild-type peptides of sufficient length from the N-terminus of the spectrin α -chain and the C-terminus of the β -chain associate with one another (Kotula et al. 1993; Nicolas et al. 1998). We have expressed such fragments, as well as others with amino acid substitutions in the incomplete C-terminal repeat of the β -chain, found in subjects with hereditary elliptocytosis. Here we examine the conformational characteristics of the fragments and their relation to the association between the α - and β -chains of normal and the mutant spectrins.

Materials and methods

Spectrin fragments

Cloning, expression and purification of the spectrin fragments have been described elsewhere (Nicolas et al. 1998). The following fragments were studied in association assays: (1) α_s (short α), consisting of residues 1–50 of α -spectrin, comprising the N-terminal C helix; (2) α_l (long α), consisting of residues 1–154 of α -spectrin, i.e. the N-terminal C helix and the first complete repeat thereafter; (3) β_s (short β), containing residues 1898–2083, i.e. the incomplete final repeat, consisting of helices A and B, together with the complete preceding repeat; (4) β_l (long β), comprising residues 1898–2137 and corresponding therefore to β_s , together with the attached anionic C-terminal tail of 54 residues, the sequence of which is unrelated to those of the rod repeats. We examined in addition three mutants of β_l , found in cases of hereditary elliptocytosis, with the substitutions Ala2023→Val, Trp2024→Arg and Trp2061→Arg.

Sedimentation equilibrium

Sedimentation equilibrium analysis was performed in a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge. Solution columns of ca. 2 mm were centrifuged to equilibrium (ca. 28 h) at 10 °C at a rotor speed of 18 000 r.p.m. The solvent was 0.1 M sodium chloride, 20 mM sodium phosphate, pH 7.6. The solution was scanned at 280 nm. The speed was then increased to 42 000 r.p.m. and sedimentation was continued until meniscus depletion had been attained. The solution column was scanned again to determine whether there was any absorbance contribution from non-sedimentable material. Partial specific volumes were calculated from the amino acid compositions. Because of the high state of purity of the preparations, as judged by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, single samples showing evidence of polydispersity were taken to contain only the monomer (of known molecular weight and in all cases the predominant species) and aggregates thereof. To fit the equilibrium distribution the aggregated form was arbitrarily treated as a single component, since in no instance could a satisfactory fit be achieved with an isodesmic model. Equimolar mixtures of α and β fragments were an-

alysed in the first place with the assumption that three components of known molecular weight (the two monomers and the heterodimer) were the only species present in the system. Thus the equilibrium distribution was fitted to the following equation, assuming ideal solution conditions:

$$A_r = A_{m,\alpha} \exp [M_\alpha(1-\phi_\alpha\rho)\lambda(r^2-r_m^2)] \\ + A_{m,\beta} \exp [M_\beta(1-\phi_\beta\rho)\lambda(r^2-r_m^2)] \\ + K'A_{m,\alpha}A_{m,\beta} \exp [(M_\alpha + M_\beta)(1-\phi_{\alpha\beta}\rho)\lambda(r^2-r_m^2)] + E$$

where A_r is the protein concentration (in absorbance units) at a distance r from the centre of rotation and $A_{m,\alpha}$ and $A_{m,\beta}$ those of free α and β monomers at the radius r_m of the meniscus, M_α and M_β the molecular weights of the monomers (18 300 and 28 700, respectively) and ϕ_α and ϕ_β their partial specific volumes (calculated to be 0.733 and 0.735 ml g⁻¹, respectively) and $\phi_{\alpha\beta}$ that of the complex (taken as 0.734 ml g⁻¹); ρ is the solvent density, $\lambda \equiv \omega^2/2RT$, with ω the angular velocity, R the gas constant and T the absolute temperature, and E is the non-sedimenting background absorbance, if any, after meniscus depletion. K' is the association constant in absorbance units of concentration. The molecular weight of the dimer is taken as the sum of those of its constituents. K' is related to the molar association constant, K_a , by the factor $\varepsilon_\alpha\varepsilon_\beta/(\varepsilon_\alpha+\varepsilon_\beta)$, where ε_α and ε_β are the molar absorptivities of the α and β monomers, calculated from the amino acid compositions (Perkins 1986), and that of the dimer is taken to be their sum. A closer approximation to the equilibrium mixture takes into account the fraction of aggregated material seen in the equilibrium sedimentation distribution of the β_l fragment by itself. If this is again approximated as a single component with the molecular weight derived from the sedimentation equilibrium of the fragment, a further term can be added to the above equation, of the form $A_{m,agg} \exp[M_{agg}(1-\phi_\beta\rho)\lambda(r^2-r_m^2)]$; here M_{agg} is the molecular weight of the aggregate and $A_{m,agg}$ its meniscus concentration, calculated from the proportion inferred to be present.

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were measured in a Jobin-Yvon CD6 instrument in cells of 0.2–2 mm path-length. For spectra from 185 to 250 nm the solvent was 20 mM sodium phosphate, pH 7.6, but for most purposes the spectra were scanned from 200 to 250 nm in 0.1 M sodium chloride, 20 mM sodium phosphate, pH 7.6. The content of α -helix was estimated from the molar residue ellipticity at the extremum at 222 nm, taking a value of $-36\,000$ deg cm² dmol⁻¹ for a fully helical chain (Greenfield and Fasman 1969). Conformations were also analysed by the routine of Provencher and Glöckner (1981). Polypeptide concentrations were determined from absorption spectra, using calculated molar absorptivities as before.

Thermal denaturation profiles were obtained by following the change in ellipticity at 222 nm as a function of temperature. To observe the association between α - and β -spectrin fragments and establish its stoichiometry, the el-

lpticities of mixtures of varying molar ratios of the two components were measured at constant total molar concentration. Mixtures were left about 30 min to equilibrate and equilibrium was in fact reached in a considerably shorter time. The results were expressed as constant-variation plots (Job plots).

Results

Association states of isolated polypeptides

The spectrin fragments used in this study are depicted schematically in Fig. 1. All preparations were pure, as judged by SDS-gel electrophoresis. Onset of turbidity in the solution and loss of material on centrifugation indicated that the short α fragment, α_s , comprising only a C helix of the three-helix bundle that characterises the structural repeat, is highly aggregated and polydisperse. In sedimentation equilibrium the large α fragment, α_l , by contrast appeared essentially monodisperse (Fig. 2A), with a molecular weight of about 19 700, only slightly higher than the calculated value. Another preparation could best be fitted by including a small fraction of aggregated material. Assuming the theoretical value for the monomer molecular weight, the distribution in this case could be fitted within experimental error by an admixture of 3% by weight of a species of M_r 210 000. At all events, it is clear that the α_l fragment is very largely monomeric.

The β -chain fragments both gave evidence of some aggregation. Fig. 2B shows the equilibrium distribution of a β_l preparation, used in the mixing experiments depicted below. This cannot be fitted to a single ideal solute distribution. The meniscus molecular weight is close to the calculated value of 28 700, and to fit the entire distribution a single second component was introduced. A good fit is obtained by addition of 17% by weight of a species of molecular weight 83 800 (Fig. 2B). This is necessarily arbitrary,

but establishes the presence (or formation in the course of the sedimentation experiment) in these preparations of aggregates.

It follows from the above results that the single migrating band observed in polyacrylamide gel electrophoresis of the α - or β -chain fragments in the absence of denaturant (Nicolas et al. 1998) corresponds to the monomer and not to a dimer of the type formed by some folded (Yan et al. 1993; Ralston et al. 1996) or unfolded (MacDonald et al. 1994) spectrin repeats. It further follows that the mutant β -chain fragments (Fig. 1), which migrate identically to the wild-type in electrophoresis, are likewise monomers, rather than dimers.

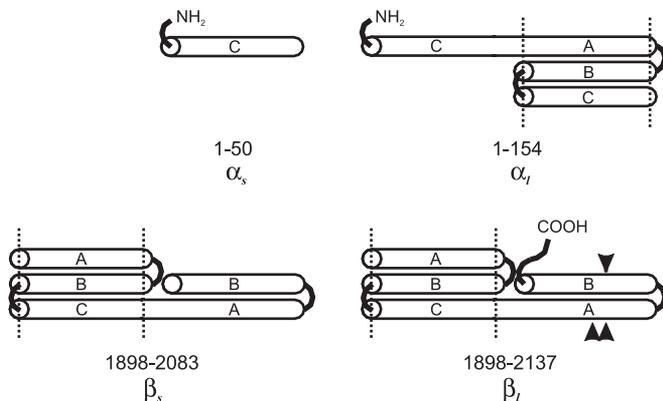


Fig. 1 Schematic representation of spectrin fragments used in this study. A complete repeat consists of three helices, designated **A**, **B** and **C** (Yan et al. 1993). The α - and β -chain fragments associate by forming a complete repeat from the incomplete repeats in the two chains

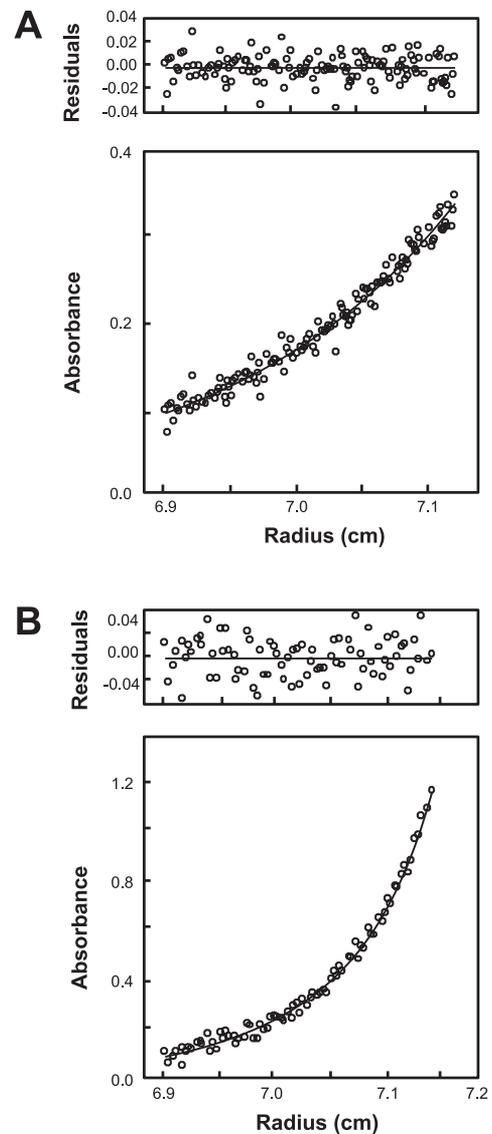


Fig. 2A, B Analytical equilibrium sedimentation of **A** the α -chain fragment, α_l , showing fit to a monomer of the theoretical molecular weight with 3% by weight of an aggregate of nominal molecular weight 210 000; **B** the β -chain fragment, β_l , showing fit to a monomer of the theoretical molecular weight with 17% of aggregated material of nominal molecular weight, 83 000. Upper panels show the residuals of the calculated fit. See text for conditions

Table 1 Conformation and stability of spectrin α - and β -chain fragments

Fragment	$[\theta]_{222}^a$	Percent α -helix ^b	T_m ($^{\circ}\text{C}$) ^c
α_1	-24 300	68	53
β_s	-22 500	63	60
β_1^{wt}	-19 000	53	62.5
$\beta_1^{\text{Ala2023}\rightarrow\text{Val}}$	-18 100	50	60.5
$\beta_1^{\text{Trp2061}\rightarrow\text{Arg}}$	-17 900	50	57.5
$\beta_1^{\text{Trp2024}\rightarrow\text{Arg}}$	-16 700	46	46.5
α_s^d	-1 600	—	—

^a Molar residue ellipticity at 222 nm ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) (SEM values are ca. ± 1500 throughout)

^b Taking the molar residue ellipticity for a fully α -helical chain as $-36\,000 \text{ deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ (Greenfield and Fasman 1969)

^c Inflection point of cooperative phase of thermal denaturation profile

^d Circular dichroism spectrum shows largely β -sheet structure

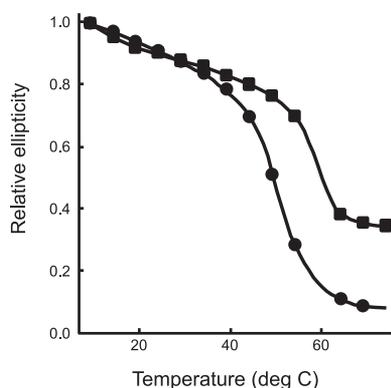


Fig. 3 Thermal denaturation profiles of spectrin α - and β -chain fragments, measured by the circular dichroism (CD) change at 222 nm: α_1 (●) and β_s (■)

Conformation and stability of the fragments

Estimates of the α -helix contents of the fragments, based on the molar residue ellipticity at 222 nm (Greenfield and Fasman 1969) are given in Table 1. Somewhat higher values emerged from the multicomponent analysis of Provencher and Glöckner (1981), but where the α -helicity is high and β -structure is absent it is unlikely that this procedure is more reliable. For these polypeptides, moreover, as for intact native spectrin, it returned a significant proportion of β -structure and was therefore rejected. The CD spectrum of the short α fragment, α_s , was that of a typical β -sheet, which is consistent with the observed aggregated state. All other fragments showed α -helicity in the range 50–70%. These values are typical of spectrin fragments with incompletely formed tertiary structure (Winograd et al. 1991; Kotula et al. 1993). All three mutant β_1 fragments showed degrees of folding that were comparable to or slightly less than that of the wild-type (Table 1).

Figure 3 shows thermal unfolding profiles of the α_1 and β_s fragments, which reveal that both contain a coopera-

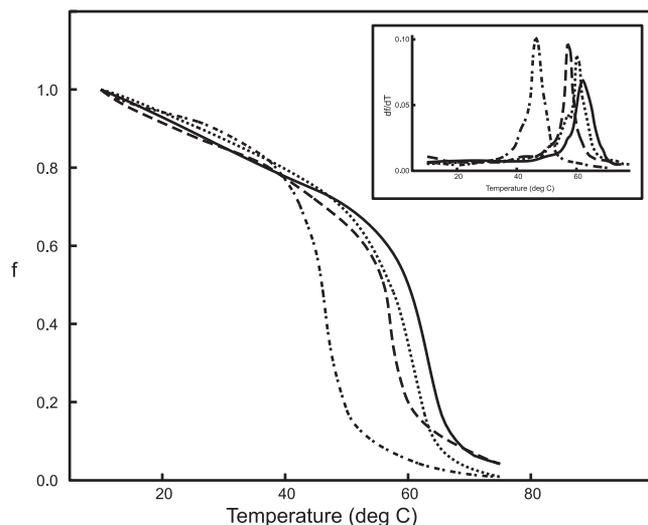


Fig. 4 Thermal denaturation profiles of wild-type and mutant β_1 fragments: wild-type (—); Ala(2023) \rightarrow Val (---); Trp(2024) \rightarrow Arg (-.-.-); Trp(2061) \rightarrow Arg (.....). The fraction, f , of the structured state at temperature T is taken as $(\theta_T - \theta_U)/(\theta_{10} - \theta_U)$, where θ_T , θ_{10} and θ_U represent the ellipticities at 222 nm at T $^{\circ}\text{C}$, 10 $^{\circ}\text{C}$ and in the thermally unfolded state. Inset: derivative denaturation profiles (symbols as above)

tively melting structural element, corresponding presumably to the complete repeat present in each. A similar cooperative transition was apparent in the unfolding of a dystrophin repeat, closely resembling those of spectrin (Kahana et al. 1994; Kahana and Gratzner 1995), whereas sequences that did not encompass a complete repeating unit gave broad unfolding profiles with little cooperativity (Kahana and Gratzner 1995). Figure 4 shows a set of denaturation curves for β_1 and its three mutants, all of which display similar cooperativity and can therefore be inferred to contain a folded repeat; this is emphasised by the appearance of the derivative plots (Fig. 4, inset). Below the cooperative transition the almost linear fall in ellipticity with increasing temperature can be taken to reflect the progressive unfolding of secondary structure in the incomplete repeat. An unexpected observation, however, was the reduction in thermal stability of the complete repeat engendered by the mutations, all of them outside the repeat boundary. The largest effect, a reduction in the denaturation mid-point of 16 $^{\circ}\text{C}$, was caused by the Trp2024 \rightarrow Arg substitution.

Association between α - and β -chain fragments

Equilibrium sedimentation of an equimolar mixture of α_1 and β_1 fragments showed that these associate with one another (Fig. 5). The molecular weight is close to the calculated value for the dimer of 47 000. A satisfactory fit to the relation for a 1:1 association of two species of molecular weight 18 300 and 28 700 can be obtained; the fit, especially near the bottom of the cell, is improved by including an admixture of unreactive aggregated material in the proportion expected from the sedimentation equilibrium of

the isolated β -chain peptide, but the error minimum is too shallow to allow a definitive evaluation of the equilibrium constant. However, as Fig. 5 shows, the association constant at 10 °C lies between 10^6 and 10^7 M^{-1} , with a nominal best fit in the range $2\text{--}4 \times 10^6$ M^{-1} .

Analyses of the association of the α_1 with the β_s and β_1 fragments were performed by continuous-variation plots of the CD at 222 nm. An equimolar mixture of α_1 and β_1 , for instance, showed an increased ellipticity over the sum of the ellipticities of the monomers which, as Fig. 6 reveals, reflects an increase in α -helicity, with a concomitant loss of random coil. The small deviation between the experimental and calculated curves in the region of the 208-nm extremum is consistent with the slightly reduced ratio between the ellipticities at 208 and 222 nm characteristic of the coiled-coil state of the α -helix (Lau et al. 1984; Monera et al. 1996). At the total concentration of the two components in the experiment of Fig. 6 (8.7 μ M) the increase in helix content was 12–15%, corresponding to some 14–18 residues entering the helical state.

Continuous-variation plots are shown in Fig. 7. The stoichiometry in some experiments deviated perceptibly from equimolar, with an equivalence point closer to a mol fraction of the β fragment of 0.6 than 0.5. This is consistent with the presence of some aggregated chains in the β fragment preparations, as observed in sedimentation equilibrium, which may thus not enter into complexes. The association constant can be estimated from the difference between the observed ellipticity and the value for the fully associated complex. We could not approach this state directly by CD. However, CD data are available for folded single repeats of spectrins (Winograd et al. 1991; Kotula et al. 1993; Menhart et al. 1996; DeSilva et al. 1997; Pantazatos and MacDonald 1997) and the second spectrin-like repeat of human dystrophin, which is highly homologous to the erythroid spectrin repeats (Calvert et al. 1996). These give an average value for the molar residue ellipticity at 222 nm of $-27\,500 \pm 1600$ $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ (six different repeats). [A value shown by MacDonald et al. (1994) is much lower and was omitted]. A comparison with experimental ellipticities at the equivalence point then gives the degree of association and hence an association constant. Within the considerable error of this procedure, our results gave association constants in the range $1\text{--}2 \times 10^6$ M^{-1} .

A continuous-variation plot with the highly aggregated α_s fragment showed vestigial interaction with β_1 , with only a small increase in ellipticity at 222 nm (not shown). An attempt to overcome the effect of aggregation by mixing the fragments in 6 M guanidinium chloride and dialysing out the denaturant was unsuccessful. Probably therefore a complemented repeating unit needs to be stabilised by folded complete repeats on either side.

The mutant β_1 fragments were examined and, in equimolar mixtures with α_1 , the variant Ala2023 \rightarrow Val showed a distinct increase in α -helicity, smaller by about 40% than that generated by the wild-type fragment at the same concentration. The corresponding association constant is thus lower by a factor of about 5. The remaining mutants, Trp2024 \rightarrow Arg and Trp2061 \rightarrow Arg, by contrast, gave no

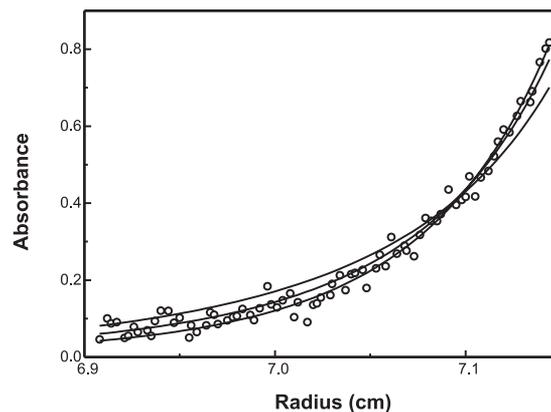


Fig. 5 Analytical equilibrium sedimentation of a 1:1 mixture of the fragments examined separately in Fig. 2, showing association. The analysis includes the presence of 10% by weight of an aggregated species of nominal molecular weight 84 000 (Fig. 2B), which does not participate in the equilibrium. The curves are calculated for association constants of 10^5 , 10^6 and 10^7 M^{-1} . The error minimum is too shallow to allow precise determination of the best fit, which lies between $K_a = 10^6$ and 10^7 M^{-1} ($\chi^2 = 7.4 \times 10^{-4}$ and 7.1×10^{-4} , respectively, and around 6.4×10^{-4} for $K_a = 2\text{--}4 \times 10^6$ M^{-1})

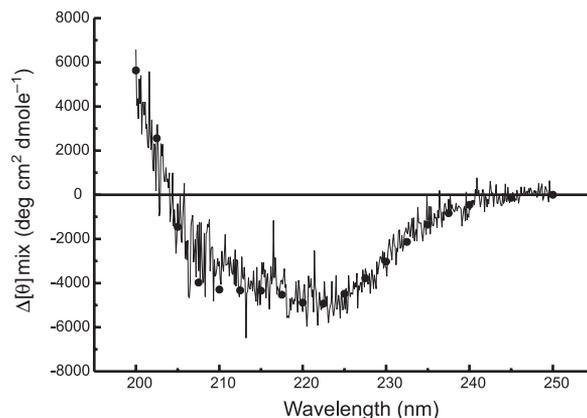


Fig. 6 CD difference spectrum between an equimolar mixture of α_1 and β_1 fragments (at a total concentration of 8.7 μ M) and the sum of the separate components before mixing. The points are calculated for the transition of 14 residues from random coil to α -helix

measurable increase in ellipticity on mixing with α_1 , and thus did not enter into a complex to any extent discernible by this technique in this concentration range.

Discussion

The CD spectra, together with the thermal unfolding profiles, show that the complete repeat, present in both the α - and β -chain fragments, entered the stable tertiary fold. This is to be expected on the basis of earlier data. Moreover, because the first turn of the α -helix of a repeat packs into the three-helix bundle constituting the contiguous preceding repeat (Yan et al. 1993; Cross et al. 1990), an extension of

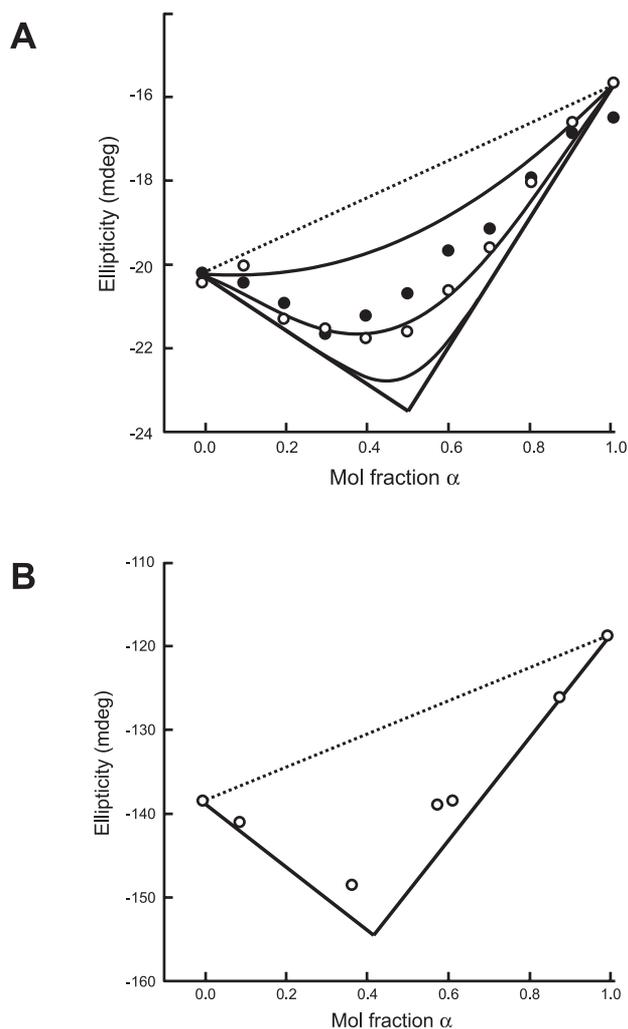


Fig. 7A, B Continuous-variation plots. **A** Complex formation between α_1 and β_1 spectrin fragments at $8.7 \mu\text{M}$ at 10°C (\circ) and 20°C (\bullet). *Full straight lines* represent mixing with 100% complex formation (infinite association constant) and *broken lines* mixing with no complex formation. The curves are calculated for association constants (*top to bottom*) of 10^5 , 10^6 and 10^7M^{-1} . **B** Complex formation between α_1 and β_2 fragments at $66 \mu\text{M}$ and 10°C (\circ)

the sequence by some residues on the C-terminal side increases the stability of the structure significantly (Calvert et al. 1996). The same explanation probably applies to the elevated stability of two contiguous spectrin repeats, relative to an isolated repeat (Menhart et al. 1996).

The large influence on conformational stability of an amino acid replacement far from the C-terminal boundary of the complete repeat (Fig. 1) is entirely unexpected, on the other hand. An estimate of the effects of the mutations on the folding free energy can be made. Becktel and Schellman (1987) have shown that for a relatively small perturbation of thermal stability by a mutation the free energy change, $\delta(\Delta G)$, can be determined without knowledge of ΔC_p . This depends on the fact that over a sufficiently narrow temperature range the curves relating Gibbs free energy to temperature lie nearly enough parallel. It then fol-

lows that $\delta(\Delta G) = \Delta T_m(\Delta H(\text{wt})/T_m(\text{wt}))$, where T_m is the denaturation mid-point, at which $\Delta G = 0$, ΔT_m the change in T_m caused by the mutation, and $\Delta H(\text{wt})$ and $T_m(\text{wt})$ the enthalpy of unfolding and the denaturation mid-point respectively of the wild-type protein. $\Delta H(\text{wt})$ can be determined from a van't Hoff plot over the denaturation range. For this purpose the equilibrium constant for unfolding is found at each temperature from the ratio of the integrated areas of the derivative curves (Fig. 4, inset) above and below that temperature, i.e.

$$K = \int_0^T (d\theta/dT) dT / \int_T^\infty (d\theta/dT) dT.$$

The resulting van't Hoff plots (not shown) were linear within experimental error, except in the case of the mutant Ala2023→Val, which showed some curvature towards lower temperatures; they gave standard enthalpies in the range 29–32 kcal mol⁻¹. The reductions in folding free energies at $T_m(\text{wt})$ relative to the wild-type polypeptide were 0.5, 1.4 and 0.2 kcal mol⁻¹ for mutants Trp2061→Arg, Trp2024→Arg and Ala2023→Val, respectively.

The effect of mutations outside the folding unit on the stability of its tertiary structure in the fragment is the more unexpected because the mutated residues are in a largely unstructured appendage. A possible basis for the effect is that the unfolded state is stabilised by intra-chain interactions, rather than that the folded state is destabilised by weakened interactions. However, there is evidence that, in the native state of the spectrin rod, cooperativity may prevail over large distances, for the association between dimers is impaired by mutations up to eight repeats removed from the association site. (Data are summarised by Lux and Palek 1995.) It is also possible that in the spectrin dimer a local perturbation of the rod conformation disrupts the lateral association of the α - and β -chains, so that the excluded volume available to the association sites at the chain ends is increased. The melting profiles of the fragments (Fig. 4), especially of mutant Trp2024→Arg, suggest at all events that such mutations could cause partial unfolding of the critical region of the rod domain at physiological temperature. Such an effect could lead to a change in the elastomeric properties of the spectrin tetramer or its partial dissociation into dimers, as indicated.

The helical segments of incomplete repeats are clearly partly or largely in the randomly coiled conformation until they associate with their complementary partial repeat. The increase in α -helicity on association of the α - and β -chain fragments allowed us to follow the formation of 1:1 complexes. The long and short β -chain fragments behaved indistinguishably from one another, showing that the anionic C-terminal tail of the β -chain neither participates in nor weakens the association of spectrin dimers to tetramers. Comparison of the measured helicities of the long and the short β -chain fragment indicates that this segment is unstructured. Its function remains unclear.

Our results confirm that terminal fragments of the spectrin α - and β -chains will associate with each other in a 1:1 complex, in a manner analogous to the self-association of intact spectrin heterodimers. This agrees with the results

of Speicher and co-workers (DeSilva et al. 1992; Kotula et al. 1993) and our own recent data (Nicolas et al. 1998). The association is rapid, without the large activation energy that characterises the dimer-tetramer equilibrium of intact spectrin. The estimated association constants are within the range reported in the earlier study, based on gel electrophoretic analysis (Nicolas et al. 1998), which depends on separation of the associated from the unassociated chains. The interacting fragments are themselves monomeric (but for some aggregated material, especially in the β fragment preparations), and do not form the homodimers observed by Yan et al. (1993) and Ralston et al. (1996) to be generated by a repeat of *Drosophila* spectrin. Correctly phased and folded single repeats of spectrin (MacDonald et al. 1994; Pascual et al. 1996; DeSilva et al. 1997) and of dystrophin (Calvert et al. 1996) were also monomeric. MacDonald et al. (1994) found, however, that two chicken brain spectrin repeats, which were not in the correct phasing and were therefore not folded, formed dimers or trimers in solution. The incomplete repeat elements, present in addition to the folded repeat in our fragments, did not induce such self-association.

The β -chain mutations all reduced the extent of association with the α -chain fragment, as observed before (Nicolas et al. 1998). The effect was least for mutation Ala2023→Val, with a diminution in negative free energy of heterodimer formation at 10 °C of ca. 1 kcal mol⁻¹ relative to the wild-type peptide (corresponding to an approximately fivefold reduction in association constant). The relative destabilisation of the heterodimer engendered by the mutations is consistent with the fraction of spectrin dimer present in the cells of the affected patients and with the severity of the haemolytic condition. Thus the mutations Trp2061→Arg and Trp2024→Arg cause elliptocytosis with a significant haemolytic anaemia, while the substitution Ala2023→Val gives rise to half the amount of dimer caused by the other two mutations and an asymptomatic elliptocytosis (Parquet et al. 1994; Glele-kakai et al. 1996).

Trp2024 is highly conserved throughout the spectrin superfamily. Its position in the structure (Yan et al. 1993) gives little indication of its function, but its replacement even by phenylalanine has a considerable effect on the stability of the fold (Pantazatos and MacDonald 1997). Examination of the crystal structure led to the inference that the insertion of arginine in this position (residue 17 in the **A** helix) could introduce a repulsion between the cationic charge and that of the arginine at **B21** (Pascual et al. 1997). The replacement of Ala2023 by valine (residue **A18**) should have no effect on any interactions in the tertiary fold, since this residue lies on the outside of the helix bundle. In the third mutant, Trp2061 at **B18** is replaced in position **d** of the heptad hydrophobic repeat by arginine. An inspection of the model reveals no obvious unfavourable interactions, and in fact the same position is occupied by charged residues [histidine in the peptide studied by Yan et al. (1993)] in many of the spectrin repeats. Several aspects of the structure-stability relations in spectrin and its analogues thus remain unresolved.

Acknowledgements We are grateful to the British Council and the Alliance Française for support under the Alliance project scheme.

References

- Becktel WJ, Schellman JA (1987) Protein stability curves. *Biopolymers* 26: 1859–1877
- Bennett V (1990) Spectrin-based membrane skeleton – a multipotential adapter between plasma-membrane and cytoplasm. *Physiol Rev* 70: 1029–1065
- Calvert R, Kahana E, Gratzer WB (1996) Stability of the dystrophin rod domain fold: evidence for nested repeating units. *Biophys J* 71: 1605–1610
- Cross RA, Stewart M, Kendrick-Jones J (1990) Structural predictions for the central domain of dystrophin. *FEBS Lett* 262: 87–92
- DeSilva TM, Peng K-C, Speicher KD, Speicher DW (1992) Analysis of human red cell spectrin tetramer (head-to-head) assembly using complementary univalent peptides. *Biochemistry* 31: 10872–10878
- DeSilva TM, Harper SL, Kotula L, Hensley P, Curtis PJ, Otvos L, Speicher DW (1997) Physical properties of a single-motif erythrocyte spectrin peptide: a highly stable independently folded unit. *Biochemistry* 36: 3991–3997
- Glele-kakai C, Garbarz M, Lecomte MC, Leborgne S, Galand C, Bournier O, Devaux I, Gautero H, Zohoun I, Gallagher PG, Forget, BG, Dhery D (1996) Epidemiologic studies of spectrin mutants related to hereditary elliptocytosis and spectrin polymorphisms in Benin. *Br J Haematol* 95: 57–66
- Greenfield N, Fasman GD (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 8: 4108–4116
- Kahana E, Gratzer WB (1995) Minimum folding unit of dystrophin rod domain. *Biochemistry* 34: 8110–8114
- Kahana E, Marsh PJ, Henry AJ, Way M, Gratzer WB (1994) Conformation and phasing of dystrophin structural repeats. *J Mol Biol* 235: 1271–1277
- Kotula L, DeSilva TM, Speicher DW, Curtis PJ (1993) Functional characterization of recombinant human red cell α -spectrin polypeptides containing the tetramer binding site. *J Biol Chem* 268: 14788–14793
- Lau SYM, Taneja AK, Hodges RS (1984) Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded α -helical coiled coils. *J Biol Chem* 259: 13253–13261
- Lux SE, Palek J (1995) In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP (eds) *Blood: principles and practice of hematology*. Lippincott, Philadelphia, pp 1701–1818
- MacDonald RI, Musacchio A, Holmgren RA, Saraste M (1994) Invariant tryptophan at a shielded site promotes folding of the conformational unit of spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1299–1303
- Menhart N, Mitchell T, Lusitani D, Tapouzian N, Fung LW-M (1996) Peptides with more than one 106-amino acid sequence motif are needed to mimic the structural stability of spectrin. *J Biol Chem* 271: 30410–30416
- Monera OD, Sönnichsen FD, Hicks L, Kay CM, Hodges RS (1996) The relative positions of alanine residues in the hydrophobic core control the formation of two-stranded or four-stranded α -helical coiled-coils. *Protein Eng* 9: 353–363
- Nicolas G, Pedroni S, Fournier C, Gautero H, Craescu G, Dhery D, Lecomte MC (1998) The spectrin self-association site: characterization and study of β -spectrin mutations associated with hereditary elliptocytosis. *Biochem J* 332: 81–89
- Pantazatos DP, MacDonald RI (1997) Site-directed mutagenesis of either the highly conserved Trp-22 or the moderately conserved Trp-95 to a large hydrophobic residue reduces the thermodynamic stability of a spectrin repeating unit. *J Biol Chem* 272: 21052–21059

- Parquet N, Devaux I, Boulanger L, Galand C, Boivin P, Lecomte MC, Dhermy D, Garbarz M (1994) Identification of three novel spectrin α 1/74 mutations in hereditary elliptocytosis: further support for a triple-stranded folding unit model of the spectrin heterodimer contact site. *Blood* 84: 303–308
- Pascual J, Pfuhl M, Rivas G, Pastore A, Saraste M (1996) The spectrin repeat folds into a three-helix bundle in solution. *FEBS Lett* 383: 201–207
- Pascual J, Pfuhl M, Walther D, Saraste M, Nilgas M (1997) Solution structure of the spectrin repeat: a left-handed antiparallel triple-helical coiled-coil. *J Mol Biol* 273: 740–751
- Perkins SJ (1986) Protein volumes and hydration effects. The calculation of partial specific volumes, neutron scattering matchpoints and 280-nm absorption coefficients for proteins and glycoproteins from amino acid sequences. *Eur J Biochem* 158: 169–180
- Provencher SW, Glöckner J (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20: 33–37
- Ralston GB, Cronin TJ, Branton D (1996) Self-association of spectrin repeating segments. *Biochemistry* 35: 5257–5263
- Winograd E, Hume D, Branton D (1991) Phasing the conformational unit of spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10788–10791
- Yan Y, Winograd E, Viel A, Cronin T, Harrison SC, Branton D (1993) Crystal structure of repetitive unit of spectrin. *Science* 262: 2027–2030

Article 3

roducing undesired mutations during the preparation of the vector, can negatively affect the frequency of gene targeting in ES cells (13).

In summary, the method described here offers an attractive alternative for the preparation of replacement vectors for gene targeting. This protocol can be used to perform site-directed mutagenesis in long genomic sequences cloned into plasmids with the highest degree of fidelity of DNA replication. This method provides also an approach for correcting mutations on long PCR products.

REFERENCES

1. **Ansaldi, M., M. Lepelletier and V. Mejean.** 1996. Site-specific mutagenesis by using an accurate recombinant polymerase chain reaction method. *Anal. Biochem.* 234:110-111.
2. **Barnes, W.M.** 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2216-2220.
3. **De Togni, P., D. Davidson, C. O'Brien and S.C. Manolagas.** 1995. Isolation and interim characterization of the gene encoding the murine vitamin D receptor from an embryonic stem cell library. *J. Bone Miner. Res.* 10:S392.
4. **Deng, C. and M.R. Capecchi.** 1992. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell. Biol.* 12:3365-3371.
5. **Deng, W.P. and J.A. Nickoloff.** 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200:81-88.
6. **Du, Z., D.A. Regier and R.C. Desrosiers.** 1995. Improved recombinant PCR mutagenesis procedure that uses alkaline-denatured plasmid template. *BioTechniques* 18:376-378.
7. **Gatlin, J., L.H. Campbell, M.G. Schmidt and S.J. Arrigo.** 1995. Direct-rapid (DR) mutagenesis of large plasmids using PCR. *BioTechniques* 19:559-564.
8. **Hasty, P., J. Rivera-Perez and A. Bradley.** 1991. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 11:5586-5591.
9. **Jones, D.H. and B.H. Howard.** 1991. A rapid method for recombination and site-specific mutagenesis by placing homologous ends on DNA using polymerase chain reaction. *BioTechniques* 10:62-66.
10. **Koller, B.H. and O. Smithies.** 1992. Altering genes in animals by gene targeting. *Annu. Rev. Immunol.* 10:705-730.
11. **Lundberg, K.S., D.D. Shoemaker, M.W. Adams, J.M. Short, J.A. Sorge and E.J. Mathur.** 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108:1-6.
12. **Mangeldorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umehono, B. Blumberg, P. Kastner et al.** 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
13. **Riele, H.T., E.R. Maandag and A. Berns.** 1992. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5128-5132.

We thank Douglas Davidson for his technical help and James Hardin and Karen D'Arezzo for critical reading of the manuscript. Address correspondence to Pietro De Togni, Arkansas Cancer Research Center, 4301 West Markham, Slot 753, Little Rock, AR 72205, USA. Internet: ppdetogni@acrc.uams.edu

Received 25 April 1996; accepted 18 July 1996.

Pietro De Togni
*University of Arkansas for
Medical Sciences and
VA Medical Center
Little Rock, AR, USA*

Method of Site-Directed Mutagenesis Using Long Primer-Unique Site Elimination and Exonuclease III

BioTechniques 22:430-434 (March 1997)

Site-directed mutagenesis of DNA is a widely used approach for studying gene regulation and protein structure and function (2). In the last few years, numerous methods have been developed using polymerase chain reaction (PCR), generating a mutant fragment from a double-stranded DNA template and mismatched oligonucleotides.

Among these recently developed strategies, the method called long primer-unique site elimination (LP-USE) mutagenesis (4) provides rapid and efficient means to introduce specific mutations into any double-stranded plasmid that contains a unique non-essential restriction site and the desired cloned gene. The principle of this method consists first of generating long primer (LP) by PCR with two mutated synthetic oligonucleotides: (i) the selection mutagenic primer is directed to a unique nonessential restriction site of the plasmid and introduces a mutation, which eliminates the enzyme recognition sequence; (ii) the target mutagenic primer is complementary to the cloned gene and carries the desired mutation. The PCR products are annealed to single-stranded target DNA and used as primers for second-strand synthesis. Thus, PCR products function as long primers with linked mutations. Following transformation in *E. coli* strain BMH 71-18 *mutS* (a mismatch repair deficient strain, which increases the probability of co-segregation of both mutations) (7) and growth, plasmids are purified and digested with the restriction enzyme, the site of which has been eliminated by the selection mutagenic primer. As reported by Conley and Saunders (1), linearized plasmids transform 100-1000 times less than circular plasmids. So, plasmids with a mutation in this unique restriction site are preferentially recovered by this procedure since they are not linearized by enzymatic digestion and therefore

Table 1. Effect of Exonuclease III on Transformation Efficiency of Circular and Linearized Plasmids

Exonuclease III Digestion	<i>Bam</i> HI Digestion	
	No	Yes
no	(100%)	(0.8%–1.7%)
yes	(100%)	(0.2%–0.4%)

Transformation have been performed using 50 ng of plasmids.
100% corresponds to an efficiency transformation of $2\text{--}4 \times 10^6$ transformants per μg of plasmids.

transform *E. coli* more efficiently than linear nonmutated plasmids.

However, the frequency of nonmutant plasmid recovery can be high. It could be related to either an incomplete digestion by the selection restriction enzyme or transformation of linear wild-type plasmids, especially if they are in high proportion compared to mutated circular plasmids. According to the protocol, there will be at least 50% of wild-type plasmids after the first transformation in *E. coli* strain BMH 71-18 *mutS*. This proportion may be higher than 50% because not all plasmid molecules anneal with LPs even with a high LP-to-plasmid ratio. So, to be very efficient, this method may require two rounds of selection with plasmid preparation, digestion and transformation (requiring at least 24 h). To avoid a second round of selection, we have introduced a simple step, which can eliminate the wild-type plasmids by treatment with exonuclease III. This enzyme catalyzes the stepwise removal of mononucleotides from recessed or blunt 3' hydroxy termini of double-stranded DNA. However, protruding 3' termini are resistant to the activity of the exonuclease III (6). Thus, the chosen restriction enzyme must generate blunt or recessed 3' termini. The exonuclease III step is introduced just after plasmid digestion by the selection restriction enzyme. The exonuclease III step has been tested in our studies on the effects of mutations on spectrin self-association.

LP-USE mutagenesis was mainly performed as described by Ray and Nickoloff (4) and in the Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA). The mutant long-primer was obtained by PCR using as target template the plasmid pGEX-KG (3), in which an insert coding for residues 1899–2137

of the spectrin β chain had been introduced. This plasmid was amplified using two kinds of mutant primers: (i) the selection primer (forward primer), GG-TTCCGCGTGGTACCCCGGAATTCC, eliminated the unique *Bam*HI site present in the pGEX-KG plasmid by converting it into a *Kpn*I site (underlying sequence); (ii) the other primers (backward primers) contained the desired mutations that we wanted to introduce into spectrin peptides. Oligonucleotide primers were synthesized, purified and phosphorylated at the 5' termini by Genset (Paris, France). Long primers containing both mutations were obtained in 30 cycles PCR with *Taq* DNA Polymerase (Appligene, Illkirch, France) using standard conditions recommended by the manufacturer. Approximately 1–5 pmol of PCR products, purified with the JETpure™ Kit (Genomed/Bioprobe® Systems, Montreuil-sous-Bois, France), were mixed with about 0.020–0.025 pmol of target plasmid, purified with the JETprep™ Kit (Genomed/Bioprobe Systems), in a solution containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂ and 50 mM NaCl, in a final volume of 20 μL . Samples were boiled to 100°C for 3 min in order to denature the plasmid and PCR products. Then, samples were quickly cooled to 4°C for 5 min. Annealing of PCR products with plasmid was performed at room temperature for 30 min. Second-strand synthesis and ligation were performed simultaneously by adding the following components: 3 μL of a solution containing 5 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) in Tris-HCl, pH 7.5, 3 U of T4 DNA Polymerase (New England Biolabs/Ozyme, Montigny le Bretonneux, France), 1000 U of T4 DNA ligase (2000 U/ μL ; New England Biolabs/Ozyme) and 5.5 μL of water. Synthesis was performed for 30 min at 37°C.

Benchmarks

Reactions were stopped by adding 3 μ L of 0.25% sodium dodecyl sulfate and 5 mM EDTA, pH 8.0 and incubating at 65°C for 5 min. The newly synthesized plasmids were digested with *Bam*HI (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) and used to transform *E. coli* strain BMH 71-18 *mutS* (CLONTECH) bacteria in presence of CaCl₂ (5). After overnight growth in 20 mL of Terrific Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) with 0.1 mg/L ampicillin, plasmids were purified by the JETprep Kit from 2 mL of the culture. Two micrograms of plasmids were completely digested with *Bam*HI using conditions recommended by Life Technologies. Exonuclease III (Life Technologies) digestion was performed with 65 U of enzyme at 37°C in a solution containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂ and 100 mM NaCl in a final volume of 41 μ L for 15 min before second transformation in *E. coli* strain

DH5 α TM (Life Technologies) or JM109 (Stratagene/Ozyme, Montigny le Bretonneux, France). The effect of exonuclease III on the yield of transformation was first tested on wild-type plasmids.

We observed that linearized plasmids after *Bam*HI digestion were 60–125 times less efficient than circular plasmids (Table 1). After treatment of linearized plasmids by exonuclease

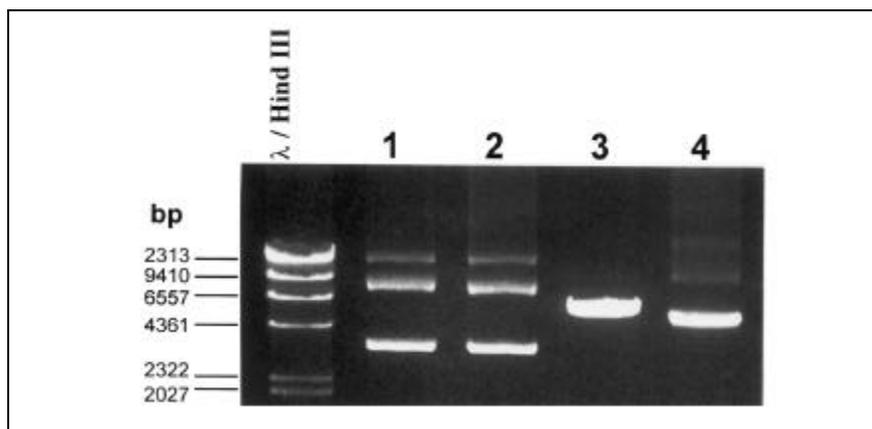


Figure 1. Agarose (1% wt/vol) gel electrophoresis of circular and linear plasmids treated or not treated with exonuclease III. Circular plasmid (lanes 1 and 2) was linearized with *Bam*HI (lanes 3 and 4) and treated (lanes 2 and 4) or not treated (lanes 1 and 3) with exonuclease III as described in the text.

III for 15 min, the transformation efficiency went down and was roughly four times lower than that observed without exonuclease III treatment. Similar treatment of circular plasmid by exonuclease III did not affect the efficiency of transformation, since a similar number of clones was obtained with or without exonuclease III treatment (Table 1). Concurrently, the plasmid digestion by exonuclease III was monitored by electrophoresis on an agarose gel (Figure 1). Exonuclease III had no effect on circular plasmids, whereas *Bam*HI-digested plasmids were completely degraded in 15 min. These data suggest that the exonuclease III is able to eliminate all the wild linearized plasmids after *Bam*HI treatment, preserving the mutant circular plasmids resistant to *Bam*HI digestion.

The effect of exonuclease III was tested in six different experiments designed to introduce mutations in spectrin peptides. Mutant plasmids were prepared as described above. After the first transformation in *E. coli* strain BMH 71-18 *mutS*, purified plasmids were treated with *Bam*HI. While one half was directly used to transform *E. coli* strains such as DH5 α or JM109, the other half was treated with exonuclease III before transformation. When plasmids were digested only with *Bam*HI before the second transformation, between 1500 and 2500 clones were obtained in each experiment. When plasmids were submitted to exonuclease III after *Bam*HI digestion, only between 25 to 800 clones were obtained. Three to eleven clones of each experiment were checked for the presence of either *Bam*HI or *Kpn*I site. Without exonuclease III treatment, 9 out of 43 (21%) were digested by *Kpn*I (Life Technologies) and resistant to *Bam*HI, whereas the other 34 clones were sensitive to *Bam*HI and resistant to *Kpn*I. These data indicate that 21% of the bacteria contain the mutant plasmid. After exonuclease III treatment, 35 clones out of 36 (97%) were digested by *Kpn*I and were resistant to *Bam*HI, demonstrating the efficiency of exonuclease III in the selection of mutant plasmids. According to the principle of the LP-USE mutagenesis method, both mutations must be associated with each other. Even if this asso-

ciation has already been demonstrated (4), we have verified the presence of the second mutation in 12 samples, either by sequencing or by digestion when this new mutation created or deleted a restriction site. In all tested cases, the desired mutation was present and associated with the *Bam*HI \rightarrow *Kpn*I mutation.

So, the exonuclease III treatment in-

duced in the site-directed mutagenesis method called LP-USE mutagenesis is a single step requiring short time (only 15 min digestion). This step eliminates most wild-type plasmids and greatly enriches mutant plasmids to allow just one round of selection. Besides, exonuclease III treatment is not LP-USE-specific, but could be useful for standard USE as well.

Benchmarks

REFERENCES

1. **Conley, E.C. and J.R. Saunders.** 1984. Recombination-dependent recircularization of linearized pBR322 plasmid DNA following transformation of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 194:211-218.
2. **Deng, W.P. and J.A. Nickoloff.** 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200:81-88.
3. **Guan, K.L. and J.E. Dixon.** 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.* 192:262-267.
4. **Ray, F.A. and J.A. Nickoloff.** 1992. Site-specific mutagenesis of almost any plasmid using a PCR-based version of unique site elimination. *BioTechniques* 13:342-348.
5. **Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
6. **Weiss, B.** 1976. Endonuclease II of *Escherichia coli* is exonuclease III. *J. Biol. Chem.* 251:1896-1901.
7. **Zell, R. and H.-J. Fritz.** 1987. DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* countering the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* 6:1809-1815.

Address correspondence to Gaël Nicolas, INSERM U409, Faculté de Médecine Bichat, BP416-75870 Paris Cedex 18, France. Internet: gnicolas@infobiogen.fr

Received 18 December 1995; accepted 7 August 1996.

G. Nicolas, S. Pedroni, C. Fournier, H. Gautero and M.-C. Lecomte

INSERM U409
Faculté de Médecine
Xavier Bichat
Paris, France

Scanning Mutagenesis to Localize DNA-Protein Interactions

BioTechniques 22:434-436 (March 1997)

Transcription, which plays an important role in the control of gene expression during cellular differentiation, is regulated by specific interactions between DNA sequences and the proteins that bind to them. In recent years, use-

ful techniques have been developed to characterize the interactions of transcription factors with their cognate DNA binding sites. We developed a novel technique, which we call scanning mutagenesis in the electrophoretic mobility shift assay (SMEMSA), that combines scanning mutagenesis with the electrophoretic mobility shift assay (EMSA). This approach can be used to localize sites of protein-DNA interactions and to correlate protein binding with functional assays of DNA elements.

CD18 (β_2 leukocyte integrin) is

transcriptionally regulated during myeloid differentiation (4). The 79 nucleotide (nt) CD18 minimal promoter, which regulates its leukocyte-specific and myeloid-inducible activity (3), contains three binding sites for *ets*-related transcription factors. Two *ets* factors, PU.1 and GABP α , bind to this region of the promoter and cooperate to increase CD18 transcription. Together, these *ets* factors are sufficient to activate CD18 in otherwise non-permissive, non-hematopoietic cells. Although PU.1 and GABP α functionally cooperate, conventional EMSA with

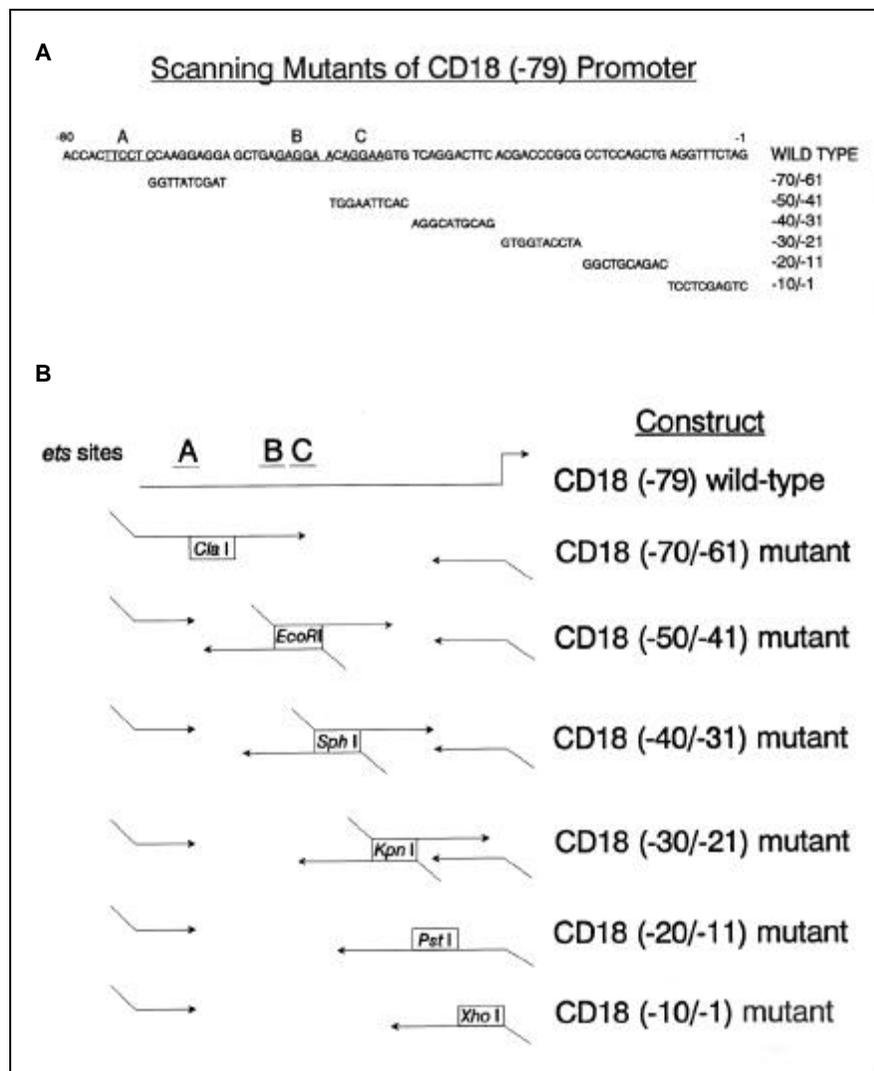


Figure 1. (A) Scanning mutants of the CD18 (-79) promoter. The sequence of the entire wild-type CD18 (-79) promoter and the individual mutagenized regions are indicated. Horizontal bars labeled A, B and C indicate the location of the three *ets* sites in the CD18 minimal promoter. (B) The strategy for PCR-based scanning mutagenesis of the CD18 minimal promoter is schematized. The orientation and length of the arrows represent the oligonucleotides that were used in the PCRs. The -50/-41, -40/-31 and -30/-21 constructs required two separate PCRs whose products were ligated by means of the common mutagenizing restriction site.

Collaboration à d'autres publications

- Catherine M. Fournier, Gaël Nicolas, Patrick G. Gallagher, Didier Dhermy, Bernard Grandchamp et Marie-Christine Lecomte (1997) Spectrin St Claude, a splicing mutation of the human α -spectrin gene associated with severe poikilocytic anemia. *Blood*. **89** : 4584-4590.
- Luca Galluzzi, M. Paiardini, M. Magnani, Gaël Nicolas, Marie-Christine Lecomte, S. Harper et DW Speicher (1999) cDNA sequence of the human erythroid α -spectrin: identification of a base deletion in the sequence database. *Blood*. **93** : 2421-2422.

Résumé

Les spectrines, protéines liant l'actine, sont des constituants majeurs du squelette membranaire, réseau multiprotéique localisé sous la membrane plasmique. Érythroïdes ou non érythroïdes (dans ce cas, on les appelle fodrines), les spectrines ont un rôle structural important dans la membrane comme cela a déjà été démontré, pour la spectrine, dans le globule rouge. Elles sont constituées de deux longues chaînes α et β associées côte à côte en tétramères $(\alpha\beta)_2$ qui forment les longs filaments du réseau. Chacune des chaînes est composée par la répétition de segments homologues, 22 pour α et 17 pour β . Ces segments sont constitués de trois hélices α (hélices A, B et C) repliées sur elles-mêmes. Cette succession de structures trihélicoïdales est parfois interrompue par un domaine particulier comme le domaine SH3 (*Src Homology 3*) présent au milieu de la chaîne α .

Les tétramères $(\alpha\beta)_2$ de spectrine constituent les filaments du squelette membranaire. L'interaction tête-à-tête de deux dimères $\alpha\beta$ implique les extrémités NH_2 de la chaîne α et COOH de la chaîne β . D'une part la sévérité du défaut d'auto-association et la localisation des mutations associées à celui-ci et d'autre part, les séquences en acides aminés des extrémités impliquées dans le site d'auto-association ont permis de proposer un modèle : la première hélice C isolée de la chaîne α pourrait s'associer aux deux dernières hélices A et B de la chaîne β pour reconstituer une unité conformationnelle trihélicoïdale semblable à celles observées le long de la molécule. Un défaut dans la formation du tétramère est le support moléculaire le plus fréquemment observé dans les érythrocytoses héréditaires (HE). À l'aide de peptides recombinants, nous avons défini, sur les deux chaînes, les régions nécessaires et suffisantes possédant les caractéristiques pleinement fonctionnelles du site de tétramérisation. Nous avons ensuite, par mutagenèse dirigée, reproduit le lien entre la présence de mutations HE localisées dans les hélices A ou B et le défaut d'auto-association observé dans les globules rouges de patients HE.

La présence d'un domaine SH3 localisé au milieu de la chaîne α confère probablement aux spectrines des fonctions autres que le maintien et la stabilité de la membrane. Les SH3, petits domaines protéiques, participent aux interactions protéine/protéine. Le seul partenaire connu du domaine SH3 de la fodrine était la sous-unité α du canal sodium sensible à l'amiloride (ENaC) mais la fonction de ce complexe n'était pas encore caractérisée. À l'aide de différentes méthodes, nous avons remis en cause l'interaction directe entre ENaC et le SH3 de la fodrine. La fonction de ce domaine SH3 étant liée à la nature de son ligand, nous avons donc recherché les partenaires putatifs du domaine SH3 de la fodrine par la technique du double-hybride. 29 partenaires ont été identifiés, regroupés en 19 familles et 10 clones isolés. La spécificité des interactions a été étudiée à la fois par double-hybride, à l'aide de mutants du domaine SH3 de la fodrine produits par mutagenèse dirigée. Les interactions vis-à-vis d'autres domaines SH3 (spectrine ou une protéine de levure non relatée Scd2) ont été également analysées. Enfin, la spécificité de certains partenaires a été confirmée par des études d'interactions *in vitro*.

Deux des protéines les plus spécifiques du domaine SH3 de la fodrine sont des protéines tyrosine-phosphatase PTP. La première est l'isoforme A de PTP de faible poids moléculaire (LMPTPA) mais l'interaction n'a pas été confirmée *in vitro*. La deuxième, TD14, est une nouvelle PTP dont la seule fonction connue est d'inhiber la formation des foyers tumoraux des cellules surexprimant l'oncogène *Ha-ras*. Ces PTP pourraient soit déphosphoryler la fodrine, soit être recrutées sous la membrane pour déphosphoryler une autre cible.

Nous avons également identifié trois partenaires (N-WASP, Evi et une protéine de la famille des formines) suggérant que les domaines SH3 des spectrines pourraient être impliqués dans les processus de polymérisation de l'actine liés à la mobilité ou la différenciation cellulaire.

Mot clés : spectrine, fodrine, tétramérisation, SH3, double-hybride, polymérisation de l'actine



Tyrosine Phosphorylation Regulates Alpha II Spectrin Cleavage by Calpain

Gaël Nicolas,¹ Catherine M. Fournier,¹ Colette Galand,¹ Laurence Malbert-Colas,¹ Odile Bournier,¹ Yolande Kroviarski,¹ Monique Bourgeois,¹ Jacques H. Camonis,² Didier Dhermy,¹ Bernard Grandchamp,¹ and Marie-Christine Lecomte^{1*}

INSERM U409, Faculté de Médecine Xavier Bichat-Association Claude Bernard,¹ and INSERM U248, Institut Curie,² Paris, France

Received 26 November 2001/Accepted 1 February 2002

Spectrins, components of the membrane skeleton, are implicated in various cellular functions. Understanding the diversity of these functions requires better characterization of the interacting domains of spectrins, such as the SH3 domain. Yeast two-hybrid screening of a kidney cDNA library revealed that the SH3 domain of α II-spectrin binds specifically isoform A of low-molecular-weight phosphotyrosine phosphatase (LMW-PTP). The α II-spectrin SH3 domain does not interact with LMW-PTP B or C nor does LMW-PTP A interact with the α I-spectrin SH3 domain. The interaction of spectrin with LMW-PTP A led us to look for a tyrosine-phosphorylated residue in α II-spectrin. Western blotting showed that α II-spectrin is tyrosine phosphorylated *in vivo*. Using mutagenesis on recombinant peptides, we identified the residue Y1176 located in the calpain cleavage site of α II-spectrin, near the SH3 domain, as an *in vitro* substrate for Src kinase and LMW-PTP A. This Y1176 residue is also an *in vivo* target for kinases and phosphatases in COS cells. Phosphorylation of this residue decreases spectrin sensitivity to calpain *in vitro*. Similarly, the presence of phosphatase inhibitors in cell culture is associated with the absence of spectrin cleavage products. This suggests that the Y1176 phosphorylation state could modulate spectrin cleavage by calpain and may play an important role during membrane skeleton remodeling.

First identified at the intracellular surface of the erythrocyte plasma membrane, spectrins (Sp) are now known to be the central components of the membrane skeleton, a ubiquitous and complex spectrin-actin scaffold located under the lipid bilayer of metazoan animal cells (for review, see references 4 and 21). Numerous studies on red cells, particularly those in hereditary hemolytic anemia, have clearly established the organization of the erythrocyte skeleton and its importance in maintaining erythrocyte shape, stability, and deformability. Spectrins are giant extended flexible molecules composed of two subunits (α I and β I in red cells) which intertwine to form $\alpha\beta$ heterodimers. Spectrin exists as elongated tetramers resulting from self-association of $\alpha\beta$ heterodimers. Sp tetramers constitute the filaments of the lattice, the nodes of which are crossed-linked by short actin filaments. This spectrin-based skeleton is bound to various transmembrane proteins through two connecting proteins, ankyrin and protein 4.1.

In nonerythroid mammal cells, α (α I and α II) and β (β I and β V) chains are encoded by two and five genes, respectively, each of these genes producing several isoforms by alternative splicing. Despite this diversity, all Sp chains present the same structural organization mainly made up of a succession of triple-helical repeat units, 22 for α chains and 17 for β chains except β V, which has 30 repeats. These units are characteristic of spectrin family members. They are about 106 amino acids long and folded in a coiled-coil structure made up of three

helices (A, B, and C). Beside these repeat units, spectrin isoforms can also contain several interacting domains, such as SH3 domain, EF hands, PH domains, and binding domains for ankyrin, actin, protein 4.1, and calmodulin.

In nonerythroid cells, spectrin isoforms are not evenly distributed at the plasma membrane. Spectrins are also present in the Golgi apparatus, in cytoplasmic vesicles (16, 41), and in the nucleus (31). Several mechanisms appear to control spectrin dynamic distribution at the protein level, such as serine phosphorylation (19) and proteolysis by calpain and caspase. Spectrin binds Ca^{2+} and calmodulin which regulate spectrin binding to the membrane (43).

The multiple physiological functions attributed to spectrins are related to both their cellular locations and the nature of proteins that interact with them. Spectrins and the spectrin-based skeleton are considered to participate in the formation and maintenance of specialized plasma membrane domains in epithelial cells (17), in neurons (5), and in striated muscle cells (7, 22, 33). They are considered to stabilize integral membrane proteins, to reduce their endocytic rate, and to confer resiliency and durability on the membrane itself. Recent studies also suggest that spectrin may play a role in membrane protein sorting, vesicle trafficking (3), endocytosis (27), and neurite outgrowth (22, 38, 46). The recent description of spectrin mutations in quivering mice that manifest auditory and motor neuropathies (35) confirms their important functions in the maintenance of specialized subcellular domains.

The involvement of spectrins in many diverse physiological processes can be explained by their modular structure that combines numerous protein-interacting domains in a number of different isoforms. One approach for obtaining insight into

* Corresponding author. Mailing address: INSERM 409, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, BP416, 75870 Paris Cedex 18, France. Phone: (33) 01 44 85 63 45. Fax: (33) (1) 01 42 26 46 24. E-mail: lecomte@bichat.inserm.fr.

the function(s) of spectrins is to define the proteins interacting with its domains in specific cell types. We have focused our study on a particular domain of 350 residues located within the middle part of the α II-spectrin. This area contains two repeat units (α 9 and α 10) together with several additional sequences. These additional sequences include (i) an SH3 domain, (ii) a calmodulin binding site, and (iii) two cleavage sites for proteases, such as calpains and caspase 3.

SH3 domains are 60-amino-acid-long sequences that are present in many signaling and cytoskeletal proteins. Despite the modest sequence homology, the three-dimensional structure is well conserved. They mediate protein interactions by binding short proline-rich sequences bearing the consensus motif PXXP, where X is any amino acid. The α II-Sp SH3 domain is highly conserved between species, with 100% identity between birds and mammals, suggesting important and conserved functions.

The protein E3B1, a substrate for tyrosine kinase, has been identified as a ligand for the α I-Sp SH3 domain (51) but no partner has been clearly defined for the α II-Sp SH3 domain. Using the yeast two-hybrid system, we identified isoform A of low-molecular-weight phosphotyrosine phosphatase (LMW-PTP) as a specific partner for the α II-Sp SH3 domain. As not reported previously to our knowledge, we demonstrated that α II-Sp was tyrosine phosphorylated in cells. We identified one tyrosine residue (Y1176) that is phosphorylated and dephosphorylated in vivo. This residue is located in the specific calpain cleavage site, near the SH3 domain, and is an in vitro substrate for two tyrosine kinases of the Src family, Src and Lck, and for the isoform A of LMW-PTP. Phosphorylation of this residue antagonizes calpain proteolytic activity. LMW-PTP A can dephosphorylate phosphotyrosine 1176 and so modulate spectrin susceptibility to calpain.

MATERIALS AND METHODS

Construction of rat kidney cDNA libraries for yeast two-hybrid screening. RNAs were isolated from adult male rat kidney (Sprague Dawley) by using the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (12). First-strand cDNA synthesis was performed on 4.5- μ g polyadenylated RNAs (twice purified on an oligo(dT) column [Pharmacia, Uppsala, Sweden]) using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase in the presence of 50-base oligonucleotide primers [including the *Xho*I restriction site and an 18-base poly(dT) sequence] and a nucleotide mixture containing 5-methyl dCTP. After second-strand synthesis by DNA polymerase I (Pol I) in the presence of RNase H, double-stranded cDNA uneven termini were filled with *Pfu* DNA polymerase. *Eco*RI adapters (phosphorylated 9-mer and dephosphorylated 13-mer nucleotides, cDNA synthesis kit; Stratagene) were bound to cDNAs by T4 DNA ligase (Gibco-BRL, Life Technologies). After phosphorylation and *Xho*I digestion, cDNAs were size fractionated on a Sepharose CL2B column. The cDNAs (above 600 bp) were introduced directionally as *Eco*RI-*Xho*I fragments into a modified version of plasmid pGAD GH, which includes a longer multiple cloning site. After electrotransformation of the DH10B strain (Gibco BRL, Life Technologies) with recombinant plasmids, 2.7×10^6 independent clones were obtained (with insert sizes ranging from 600 to 4,200 bp, with a mean value of 1,250 bp) and 2% of the clones were empty clones.

Screening of spectrin SH3 domain-binding proteins by yeast two-hybrid system. The sequence encoding the α II-Sp SH3 domain (E970 to P1026) was amplified with primers GGGGGATCCGGGAGCTGGTCTTG and GGAAT TCTAGGGTCCAATTTCTCAC containing the *Bam*HI and *Eco*RI sites (underlined), respectively, and cloned to the C terminus of the LEX A DNA-binding domain into pLEX10 (generous gift from J. H. Camonis). Overnight culture of the yeast strain L40 established with the α II-Sp SH3-pLEX plasmid on selective medium lacking tryptophan (DO-W) was diluted to 5×10^6 cells/ml and grown for 3 h to 10^7 cells/ml before transfection with 100 μ g of cDNA library plasmids. Transformation efficiency was estimated by dilution spreading on me-

dium lacking tryptophan and leucine (DO-WL). As the bait did not induce background, His⁺ clones were selected on medium lacking tryptophan, leucine, and histidine (DO-WLH) after 3 to 4 days of growth at 30°C. Expression of β -galactosidase was estimated on filter and liquid assays using X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) and *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) as substrates, respectively. Recombinant pGAD was recovered from His⁺LacZ⁺ yeasts and selected after transformation of an HB101 *Escherichia coli* strain grown on a selective medium lacking leucine.

Sequences were obtained from PCR-amplified products (forward primer, CGATGATGAAGATACCCCACC, and reverse primer, promT7-TAATAC GACTACTATAGGGCGA) and were subsequently submitted to BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Analysis of interaction specificity using yeast mating strategy. The L40 yeast strain was transfected with pGAD plasmids containing different LMW-PTP inserts (full-length sequence, residues 1 to 158, and partial sequences, residues M1 to T78, Q33 to T78, and Q33 to H158) obtained with the following primers (cloning sites are underlined): forward M1, GGGGGGAATTCAGATGGCG GAACAGGCTACC; forward Q33, GGGGGGAATTCAAAACATCTCAGAGA ATTGGAG; reverse H158, GGGGGCTCGAGCCTCAGTGGGCCTTCTCCA AG; and reverse T78, GGGGGCTCGAGTCCAGTAACTCTGCCGGCAAC.

Transfected L40 cells were mated with the complementary yeast strains AMR70 established with different SH3 baits cloned in pLEX: mutant α II-Sp SH3, α I-Sp SH3 (residues 980 to 1036), and full-length SCD2 (11). Mutations of α II-Sp SH3 were introduced as previously described (34) by using the forward primer pLex-*Bam*HI-*Kpn*I, which alters the unique *Bam*HI site into a *Kpn*I site (underlined): selection primer, CGACTGGCTGGAATTCGGT ACCGAGCTGGTCTTGGCT, and reverse primers containing mutations (in bold), GAGAAGAGTCCCGAGCGGTCACATGAAGAAG, ACTCAAC AGCACAACGAGGATTGGTGAAAGT, and CGTCAGGGTTTTGTG CTGGCTCGTACGTGAAG, for introduction of the E985A, K1002E, and P1017L mutations, respectively.

Expression and purification of recombinant peptides. Sequences corresponding to α II-Sp SH3 (E970 to P1026), α I-Sp SH3 (A970 to Q1055 cDNA amplified with primers containing cloning sites (underlined) GGGGATCCGCTGCAC CAGTGGAGGGAGT and GGGGAATTCCTGGGTGATGTTTCTGGCT), α II-Sp SH3- α 9- α 10 (D885 to L1229, GGGCCATGCACTGGAGGACTCTC TGCAG and GGGGGATCCCAAGAGCTGGCTCCGTTTC), and LMW-PTP (1 to 157) were PCR amplified with *Pfu* polymerase from different sources (rat kidney cells, human lymphocytes, and reticulocytes). After digestion with appropriate restriction enzymes, amplification products were cloned either into *Bam*HI/*Eco*RI-linearized pGEX-2T plasmid (Pharmacia) for glutathione S-transferase (GST) fusion peptides or into *Nco*I/*Bam*HI-linearized pQE-60 plasmid (Qiagen) for His₆-tagged peptides. The Y1176E mutation was introduced as described above with the reverse primer containing mutations (in bold), CTGTGCAAC AACAGGAAGTGGAGGGCATGATGCCAGGGATGA. GST-fusion peptides were expressed in *E. coli* strains JM109 (Promega) or ompT⁻ (a protease deficient strain) while His₆-tagged peptides were expressed in strain M15. After induction with 0.5 to 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) for 3 h at 37°C, cells were lysed by sonication in Triton X-100-phosphate-buffered saline (PBS) buffer containing antiproteases (10 μ g of aprotinin/ml, 10 μ g of leupeptin/ml, 10 μ g of pepstatin/ml, and 1 mM PMSF). His₆-tagged peptides were purified on nickel-agarose beads according to the instructions of Qiagen. GST-fusion proteins were purified on a glutathione-Sepharose column according to the instructions of Amersham Pharmacia Biotech. Proteins were further purified by anion-exchange chromatography on a Resource Q column (Amersham Pharmacia Biotech) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)–1 mM β -ME–1 mM EDTA with a linear gradient of NaCl.

Transfection and cell culture. Sequences corresponding to the wild type and Y1176E mutant SH3- α 9- α 10 were amplified (forward primer, CCCGGATC CACATGGACCTGGAGGACTCTCTGCAGG containing the *Bam*HI site [underlined]; reverse primer containing the FLAG sequence [bold] and an *Eco*RI site [underlined], CCCGAATTCATTGTGCATCGTCATCTTTGTAGTC CAAGAGCTGGCTCCGTTCCCTC from pQE60 constructs and introduced into the pcDNA 3 plasmid). COS cells were grown in Dulbecco minimal essential medium containing 10% serum and transfected using Lipofectamine as recommended by the manufacturer (Invitrogen). RCCD1 cells were grown on collagen-coated plastic dishes as previously described (8). When indicated, pervanadate solution was added at 0.1 mM to culture medium 30 min before cell scraping.

Immunoprecipitation and immunoblotting. Polyclonal antibodies were obtained after the immunization of rabbits (Eurogentec) with GST fusion protein (GST-LMW-PTP A and GST-Sp α II SH3 domain) and purification by affinity chromatography (HiTrap; Amersham Pharmacia Biotech) using the central regions (residues 33 to 78) of LMW-PTP A and SH3- α 9- α 10-His₆ peptides, re-

spectively, as the affinity matrix. After washing, cells were lysed as previously described (14) for 20 min on ice in radioimmunoprecipitation (RIPA) lysis buffer containing antiproteases and 1 mM orthovanadate when cells were preincubated with pervanadate. Immunoprecipitations with anti-FLAG M2-Agarose Affinity gel (Sigma) were performed on RIPA supernatants (1 ml). Immunoprecipitations with immune serum directed against Sp α II/ β II (generous gift from B. Geny, Paris, France) were performed on RIPA supernatants precleared with normal rabbit serum (50 μ l) and protein-G Agarose (Sigma).

Samples were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose. Immunoblots were blocked in PBS buffer containing 1.5% bovine serum albumin. After washing with PBS buffer containing 0.1% Tween 20–0.1% bovine serum albumin, immunoblots were probed either with a horseradish peroxidase-conjugated phosphotyrosine antibody (PY99) (Santa Cruz Biotechnology) or with affinity-purified immunoglobulin G (IgG) directed against the α II-Sp-SH3 domain or the LMW-PTP A and then with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase. Blots were developed with the SuperSignal West Pico chemiluminescence's substrate (Pierce). If necessary, blots were stripped with Restore buffer (Pierce) and then blocked and probed again.

In vitro interactions and cross-linking experiments. In vitro interactions were performed at 4°C with 10 μ g of immobilized recombinant peptides (either on Sepharose 4B glutathione beads or on nickel beads) and recombinant peptides free of GST (purified after thrombin cleavage) in 20 mM HEPES (pH 7.9), 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.01 to 0.2% Nonidet NP-40, and anti-proteases. After extensive washings, bound proteins were analyzed by SDS-PAGE. Cross-linking between LMW-PTP (1 to 10 μ M) and different SH3 peptides (1 to 10 μ M) was performed with bifunctional reagent disuccinimidyl suberate (DSS) (Pierce) at 1 mM and analyzed by SDS-PAGE.

Kinase, phosphatase, and calpain assays. Phosphorylation of spectrin recombinant peptides was performed using Src and Lck kinases (Upstate Biotechnology) in the presence of [γ - 32 P]ATP as recommended by the manufacturer, but without O vanadate. Samples were resolved by SDS-PAGE. The amount of radioactivity incorporated was determined by Instant Imager (Packard). Recombinant LMW-PTP activity was estimated in acetate buffer at pH 5.5 on *para*-nitrophenylphosphate (pNPP) by colorimetric assay (at 410 nm) and on phosphorecombinant peptides by Instant Imager after separation on SDS-PAGE. μ -Calpain activity (Chemicon) was studied with SH3 α 9- α 10-His₆ recombinant peptides in 100 to 150 mM NaCl–25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in the presence of 500 μ M Ca²⁺ and 50 μ M calmodulin. Native and cleaved products were evaluated from Coomassie blue-stained gels by densitometry scanning.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of rat LMW-PTP A has been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number AF171072.

RESULTS

Looking for partners: the α II-Sp SH3 domain can recruit low-molecular-weight phosphotyrosine phosphatase. We looked for putative partners of the α II-Sp SH3 domain from a rat kidney cDNA library by using the yeast two-hybrid system with the α II-Sp SH3 domain (residues E970 to P1026) fused to the DNA binding domain of LexA. Then, 309 clones having the Leu⁺/Trp⁺/His⁺/LacZ⁺ phenotype were selected from 1.3 \times 10⁷ transformants. Seventy-eight out of 309 clones were found to encode isoform A of LMW-PTP. These 78 clones exhibited a weak β -galactosidase activity on both filter and liquid assays. These clones were derived from numerous independent RNA molecules as their sequence displayed different 5' and 3' ends; however, all of them contained at least the full-length coding sequence with insert sizes larger than 1,500 nucleotides (nt).

α II-Sp SH3 domain interacted specifically with isoform A of LMW-PTP. In mammals, the single LMW-PTP gene codes for three distinct isoforms, A, B, and C (10, 45). Isoforms A and B result from splicing of two alternative exons coding for residues 41 to 74 out of 158 residues, while isoform C does not contain this sequence (Fig. 1A). As LMW-PTP B and C had not been selected by the α II-Sp SH3 bait, their presence was checked in the library by analysis of the size of PCR products for isoform

C and of the restriction pattern obtained after *Bg*II digestion, which enabled isoforms A and B to be distinguished. Results showed that the library contains the three isoforms, indicating that the restricted selection of isoform A was not due to the absence of isoforms B and C in the library. In addition, cDNA of each of the three human isoforms was obtained by reverse transcription-PCR of lymphocyte mRNA and their interaction with spectrin SH3 was tested in the two hybrid systems. As shown in Fig. 2, the α II-Sp SH3 domain interacts with human isoform A but not with human isoforms B or C. This confirmed that the α II-Sp SH3 domain interacted specifically with isoform A of human and rat LMW-PTP.

Using a yeast mating strategy, we tested the hypothesis that residues 41 to 74, specific to isoform A, were responsible and sufficient for binding to the SH3 domain. Sequences encompassing the N-terminal (residues 1 to 78), the C-terminal (residues 33 to 158), and the central (residues 33 to 78) regions of LMW-PTP A were fused to the Gal4 activating domain. However, no interaction was detected with these three partial sequences of LMW-PTP A, suggesting that the interaction required the entire LMW-PTP A molecule (Fig. 2).

To better characterize the specificity of the interaction, we studied the behavior of LMW-PTP A versus various SH3 domains. We used the α I-Sp SH3 domain and two other unrelated SH3 domains from the yeast SCD2 protein (11) that share 68, 28, and 18% identity with the α II-Sp SH3 domain, respectively (Fig. 1B). As shown in Fig. 2, LMW-PTP A did not interact with any of the other tested SH3 domains in the yeast two-hybrid assay.

Mutations affecting two highly conserved residues in all SH3 domains (corresponding to E985 and P1017 in the α II-Sp SH3 sequence; Fig. 1B) have been associated with a complete loss of interactions in vitro as well as with a loss of function in vivo (15, 18, 37, 47). Structural studies of several SH3 domains have revealed that these two conserved residues are involved in the formation of the ligand-binding surface. Interaction of mutant P1017L and E985A α II-Sp SH3 peptides with LMW-PTP A was analyzed using the yeast two-hybrid system. The presence of either mutation totally abolished the interaction as revealed by the absence of growth on triple-selective medium DO-WLH (Fig. 2) and of β -galactosidase activity (data not shown). In contrast, mutation of a nonconserved Lys (K1002E) did not affect the interaction.

In vitro experiments confirmed weak but specific interaction. In order to confirm the results obtained with the two-hybrid system, LMW-PTP A and B as well as several peptides encompassing the α II-Sp SH3 domain were expressed as either GST- or His₆-tagged proteins. GST- α II-Sp SH3 peptide bound to glutathione beads did not retain purified recombinant LMW-PTP A (devoid of GST) (data not shown). Similarly, GST-LMW-PTP A bound to glutathione beads did not retain α II-Sp SH3- α 9- α 10-His₆ peptides. These negative results could be explained by a weak interaction between the two partners, in keeping with the observation of a weak β -galactosidase activity observed in the two-hybrid system. To verify this hypothesis, cross-linking agent (DSS) was added to the binding reaction solution containing both partners (at 1 to 10 μ M). Subsequent analysis of the proteins by SDS-PAGE (Fig. 3A) revealed the presence of an additional band in the sample containing the α II-Sp SH3/LMW-PTP A mixture. This new

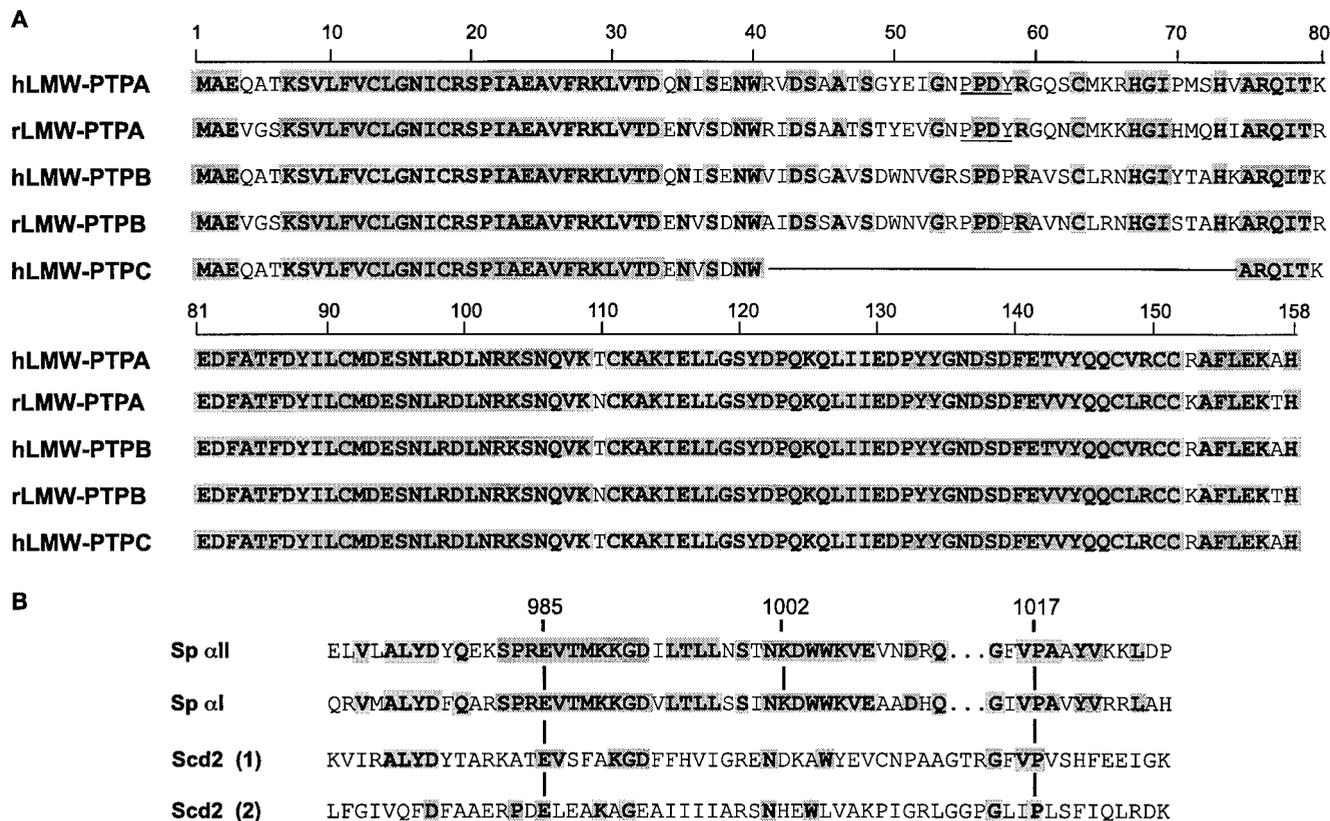


FIG. 1. Comparative analysis of amino acid sequence of LMW-PTP isoforms and SH3 domains used in this study. Identical residues are highlighted in grey. (A) Sequence alignment of human and rat LMW-PTP isoforms (accession numbers P24666, P24667, P41498, and H33956). Alternative splicing leads to different sequences for residues 41 to 74 between isoforms A and B. Isoform C is characterized by the absence of residues 41 to 74. The PPXY motif is underlined. (B) Sequence alignment of SH3 domains from mammal α II-spectrin (accession number A35715), human α I-spectrin (accession number P02549), and yeast SCD2 protein (11). The numbered residues have been mutated.

band showed an apparent molecular weight compatible with the formation of a complex between both species in a 1:1 ratio. No such additional band was detected on Coomassie blue-stained gels in the mixture containing either α I-Sp SH3 instead of α II-Sp SH3 or LMW-PTP B instead of LMW-PTP A (Fig. 3A). The identity of this new band was confirmed by Western blottings (Fig. 3B). This new band corresponds to the complex consisting of α II-Sp SH3 and LMW-PTP A since it was recognized by both antibodies directed against the SH3 domain and LMW-PTP A. This band was absent when the P1017L mutant α II-Sp SH3 peptide was used instead of the wild-type SH3 (Fig. 3B). These results confirm that the interaction between α II-Sp SH3 and LMW-PTP A occurs with high specificity but weak affinity.

LMW-PTP A was present with spectrin-based skeleton in detergent-insoluble fraction. LMW-PTPs are essentially considered to be cytosolic enzymes in a number of tissues; however, a fraction has also been observed in the detergent-insoluble pellet of NIH 3T3 cells (14). Using Western blotting, we analyzed the distribution of isoform A between the detergent-soluble and -insoluble fractions obtained from a rat kidney cell line (RCCD1). Immunopurified polyclonal antibodies raised against LMW-PTP A showed the presence of this phosphatase not only in the detergent-soluble fraction but also in the de-

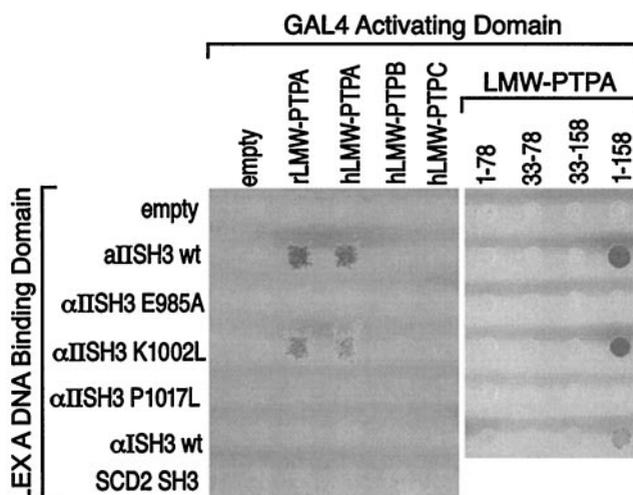


FIG. 2. Analysis of SH3 domains/LMW-PTP interactions using yeast mating. AMR70 yeast cells transformed with different pLexA-SH3 plasmids were mated with L40 yeast cells transformed with pGAD plasmids containing different sequences of rat and human LMW-PTP. As revealed by yeast growth on selective medium DO-WLH, interactions occurred only between either wild-type or K1002L α II-Sp SH3 peptides and full-length LMW-PTP A.

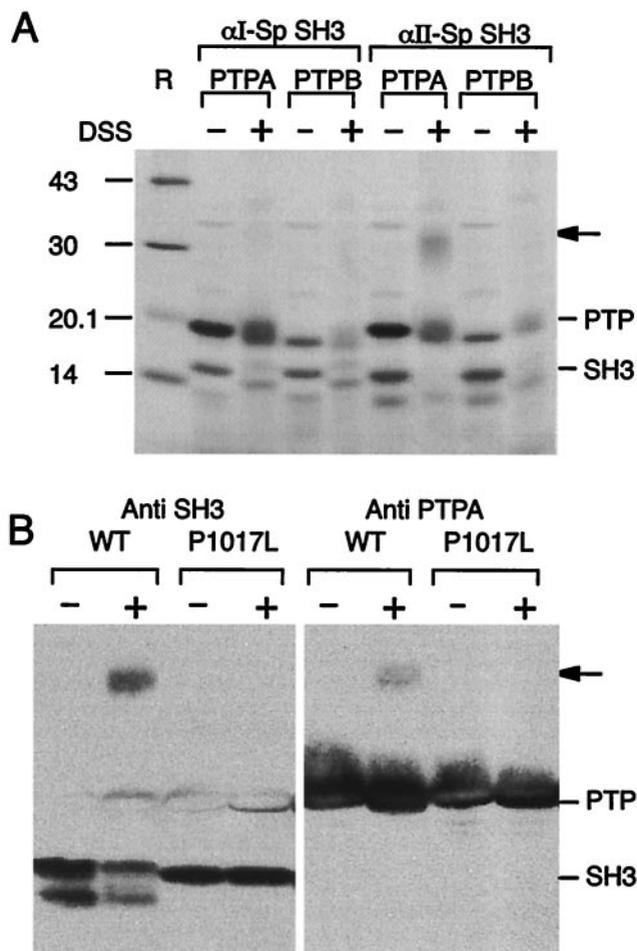


FIG. 3. In vitro interactions between α -spectrin SH3 domains and LMW-PTP isoforms. (A) Coomassie blue-stained gel. LMW-PTP A (19.5 kDa) and LMW-PTP B (19 kDa) (at 10 μ M) were incubated with either α I-Sp SH3 (10.6 kDa) or α II-Sp SH3 (9.7 kDa) in the presence of cross-linking reagent (DSS). Interaction occurred only between α II-Sp SH3 and LMW-PTP A, as revealed by the presence of a new band (indicated by an arrow) with an apparent molecular mass of 32 kDa. Lane R, molecular mass markers. (B) Western blots. Wild-type (WT) and mutant (P1017L) α II-Sp SH3 peptides (at 1 μ M) were incubated with LMW-PTP A in the presence of DSS. Western blots were revealed by antibodies directed against either the α II-Sp SH3 domain or LMW-PTP A. In the presence of DSS, both antibodies revealed the same additional band (indicated by an arrow) in the mixture containing wild-type α II-Sp SH3 peptide. In contrast, no such a band was detected in the presence of mutant α II-Sp SH3.

tergent-insoluble fraction (Fig. 4), which contains the spectrin-based skeleton.

α II-spectrin was tyrosine phosphorylated in vivo. The interaction between the α II-Sp SH3 domain and LMW-PTP A could have two biological implications. On the one hand, the interaction with spectrin could target this enzyme to the vicinity of its known substrates, which are transmembrane proteins (42). On the other hand, spectrin itself could be a substrate: the α II-Sp from mammals has been reported to be tyrosine phosphorylated in vitro by Src and spleen tyrosine kinases (1, 48). We studied endogenous α II-Sp tyrosine phosphorylation in a rat kidney cell line (RCCD1) by Western blotting using

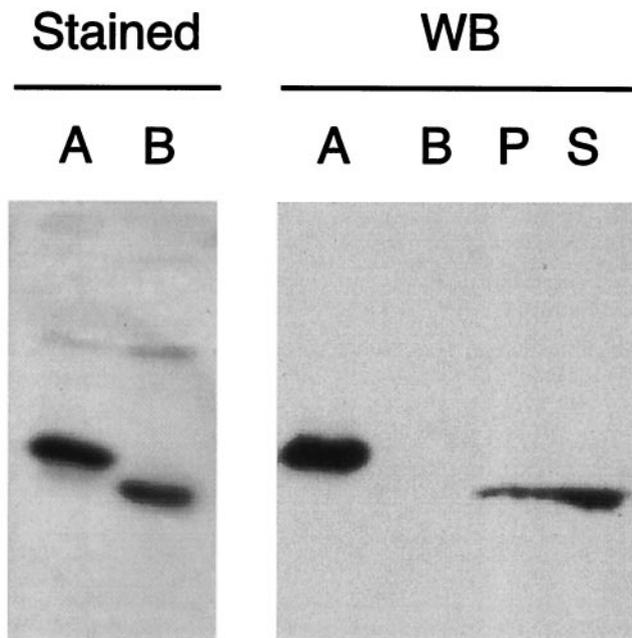


FIG. 4. Distribution of LMW-PTP A in cell detergent extracts. Shown are a Coomassie blue-stained gel and a Western blots (WB). The immunopurified antibodies directed against LMW-PTP A specifically recognized LMW-PTP A (lane A) and did not label LMW-PTP B (lane B). These antibodies revealed the presence of LMW-PTP A not only in the detergent-soluble fraction (lane S) but also in the detergent-insoluble fraction (lane P) obtained from the rat kidney cell line RCCD1.

anti-phosphotyrosine antibodies. Spectrin was immunoprecipitated by anti- α II/ β II-Sp antibodies and then probed using Western blotting with anti-phosphotyrosine antibodies, and after stripping, with anti- α II-Sp SH3 antibodies (Fig. 5). When cells were treated with a phosphatase inhibitor (pervanadate) 30 min before lysis, anti-phosphotyrosine antibodies strongly labeled a high-molecular-mass peptide displaying an apparent molecular mass in agreement with that of the full-length α II-spectrin (280 kDa). This band was recognized by anti- α II-Sp SH3 antibodies. In the absence of phosphatase inhibitors in cell culture, the α II-spectrin was faintly labeled by anti-phosphotyrosine antibodies. Moreover, apart from the 280-kDa peptide, the α II-Sp SH3 antibodies revealed a 150-kDa peptide that could correspond to the well-determined spectrin cleavage product (23). This 150-kDa peptide has been demonstrated to result from either calpain or caspase 3 cleavage at two close residues, Y1176 and D1185, respectively, which are located in the α 10 repeat unit, near the SH3 domain (residues 971 to 1025). In pervanadate-treated cells, the 150-kDa peptide was not detected, suggesting a protective effect of phosphatase inhibitor on spectrin cleavage.

Phosphorylation occurred on Tyr residue 1176 located in calpain cleavage site. Our results showed an interaction between the α II-Sp SH3 domain and LMW-PTP A and suggested a relationship between the phosphorylation of spectrin and its proteolytic cleavage at residues located near the SH3 domain. We therefore looked for tyrosine phosphorylation sites close to the SH3 domain. Computer analysis (using the prediction programs PROSITE and NETPHOS) of the amino acid sequence

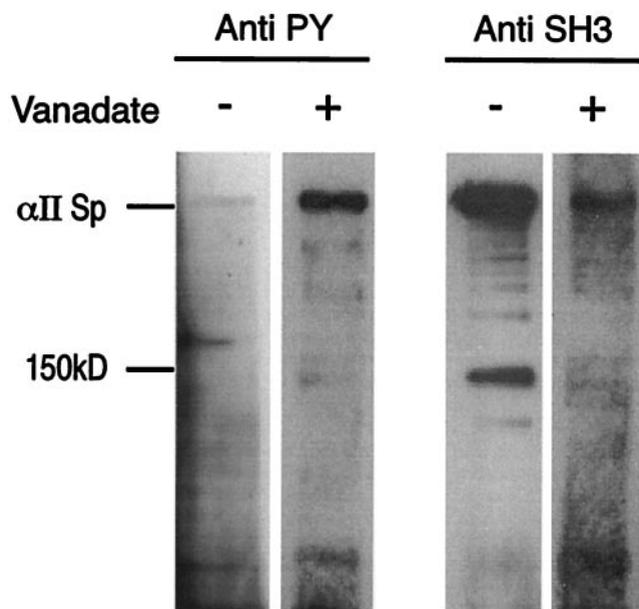


FIG. 5. α II-spectrin phosphorylation in cells and effects of phosphatase inhibitor. Sp α II/ β II was immunoprecipitated with anti-Sp α II/ β II antibodies from detergent-soluble extracts of RCCD1 cells. Prior to SDS lysis, cells were incubated for 30 min in the presence of phosphatase inhibitor (pervanadate) when indicated. The immunoprecipitate was probed with anti-phosphotyrosine (PY) and then stripped and probed with anti- α II-Sp SH3 antibodies.

encompassing the SH3 domain and its two adjacent repeat units (α 9 and α 10) predicted one or two potential tyrosine phosphorylation sites (Y1073 and Y1176). We studied the in vitro activity of two tyrosine kinases, Src and Lck, on a set of either GST- or His₆-tagged peptides encompassing the human sequences corresponding to the SH3 domain alone or with one (α 9) or two (α 9 and α 10) adjacent repeat units in the presence of [γ -³²P]ATP. These peptides have a high Tyr residue content (14 for GST and 3, 7, and 8 for Sp α II SH3, SH3- α 9, and SH3- α 9- α 10, respectively). Only the Sp recombinant peptide containing the α 10 repeat (SH3- α 9- α 10 peptide) was phosphorylated. The peptide was highly phosphorylated by the two kinases (Fig. 6, upper panel), up to 90% by Src. The α 10 repeat bears the calmodulin binding site and the cleavage sites for calpain and caspase (at residues Y1176 and D1185, respectively). This peptide differs from the other tested peptides only by the presence of one additional Tyr residue (Y1176) located in the calpain cleavage site (40). Site-directed mutagenesis resulting in Y1176E amino acid substitution totally abolished in vitro spectrin phosphorylation by Src and Lck (Fig. 6, upper panel). This site was predicted by NETPHOS with a probability of 0.76.

Whether or not the Y1176 residue is phosphorylated in vivo was further tested by transient expression of FLAG-tagged SH3- α 9- α 10 peptides (wild-type and Y1176E mutant) in COS cells. Western blottings of cell lysate (obtained from transfected cells incubated for 30 min in the presence of pervanadate prior to lysis) were probed with anti- α II-Sp SH3 antibodies. The results indicated that both wild-type and mutant peptides were well expressed and highly stable as indicated by the presence of a unique band with an apparent molecular

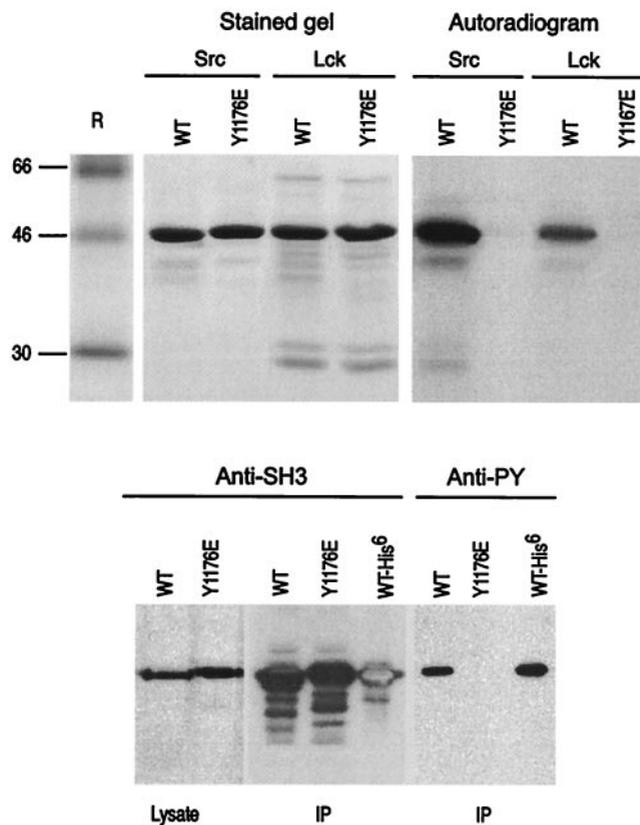


FIG. 6. Identification of a phosphorylation site in α II-spectrin, located near the SH3 domain. (Top) His-tagged recombinant peptides (wild-type [WT] and Y1176E mutant SH3- α 9- α 10) were submitted to in vitro Src and Lck phosphorylation in the presence of [³²P]ATP. Wild-type peptide was phosphorylated by both enzymes, whereas the Y1176E mutant SH3- α 9- α 10-His₆ was not. Lane R, molecular mass markers. (Bottom) Expression and phosphorylation of wild-type (WT) and Y1176E mutant SH3- α 9- α 10 peptides in COS cells (preincubated in presence of pervanadate) were analyzed by Western blotting on cell lysates and after immunoprecipitation (IP) by anti-Flag antibodies. Peptides were revealed by antibodies directed against α II-Sp SH3 and then by anti-phosphotyrosine (PY). WT-His₆ corresponds to the recombinant SH3- α 9- α 10-His₆ peptide phosphorylated in vitro by Src.

weight similar to that of the His-tagged peptide (Fig. 6, lower panel). After immunoprecipitation by anti-FLAG antibodies, both wild-type and mutant peptides were labeled by anti- α II-Sp SH3 antibody, but only the wild-type SH3- α 9- α 10 peptide was recognized by anti-phosphotyrosine antibodies. The anti-phosphotyrosine antibodies did not react with the mutant Y1176E peptide. These data confirm the residue Y1176 as a phosphorylation site recognized in vivo by cellular kinases. In the absence of cell treatment with phosphatase inhibitors, phosphorylation of this residue was very weak, indicating that this residue is also an in vivo substrate for tyrosine phosphatase (data not shown). So, the phosphorylation state of Y1176 is determined by a dynamic equilibrium between kinases and phosphatases.

Spectrin phosphorylation affected calpain cleavage. After the identification of residue Y1176 located in the calpain cleavage site as a phosphorylation site, we analyzed in vitro the effects of this phosphorylation on α II-Sp cleavage by μ -calpain.

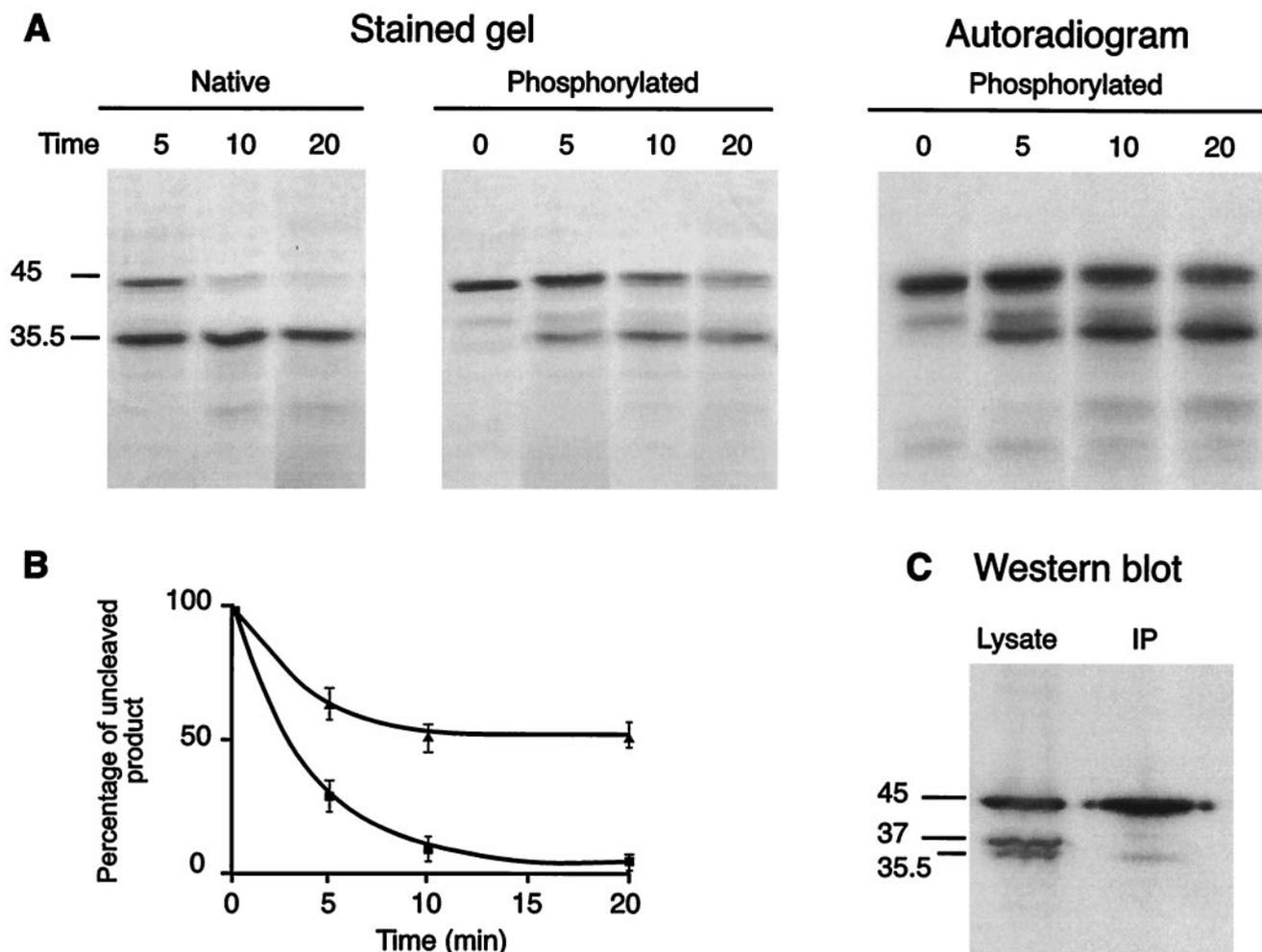


FIG. 7. α II-spectrin phosphorylation and protease cleavage. (A) In vitro kinetic studies of μ -calpain activity on 32 P-phosphorylated and native SH3- α 9- α 10-His₆ peptides. The 35.5-kDa peptide corresponds to the cleavage product. (B) Graph showing μ -calpain activity on native (■) and phosphorylated (▲) peptides calculated from Coomassie blue-stained gels and autoradiograms. (C) Expression and cleavage of Flag-tagged SH3- α 9- α 10 peptide expressed in COS cells. In the absence of phosphatase inhibitor, anti- α II-Sp SH3 antibody revealed the full-length peptide (45 kDa) and two proteolytic products (37 and 35.5 kDa). The 45-kDa peptide immunoprecipitated (IP) only anti-Flag antibodies.

In the presence of calmodulin (50 μ M) and Ca^{2+} (500 μ M), phosphorylated peptides (His₆-tagged SH3- α 9- α 10) were less sensitive to μ -calpain than nonphosphorylated peptides (Fig. 7A and B): after 10 min of incubation, the nonphosphorylated SH3- α 9- α 10 peptide was almost completely cleaved, whereas only 40% of the phosphorylated form was cleaved by μ -calpain. Mass spectrometry of peptide products after calpain cleavage confirmed that spectrin cleavage occurred after residue Y1176 (data not shown).

As phosphorylation of Y1176 residue appears to protect spectrin against in vitro calpain degradation, we further investigated in vivo proteolysis of FLAG-tagged SH3- α 9- α 10 peptide transiently expressed in COS cells. In the absence of phosphatase inhibitors (Fig. 7C), Western blottings of cell lysate exhibited three bands (with apparent molecular masses of 45, 37, and 35.5 kDa) labeled by anti- α II-Sp SH3 antibodies, whereas in the presence of phosphatase inhibitor (Fig. 6, lower panel), only the 45-kDa peptide (corresponding to the full-length peptide) was detected. Anti-FLAG antibodies were able

to pull down the 45-kDa peptide but not the 37- or 35.5-kDa peptides, suggesting that both these peptides have lost the FLAG located at the COOH end. This was confirmed by Western blottings on cell lysate using anti-FLAG antibodies that recognized only the 45-kDa band (data not shown). These two 37- and 35.5-kDa peptides probably arise from proteolytic cleavage that must occur between the SH3 domain and the FLAG. The apparent molecular masses of these peptides (37 and 35.5 kDa) are compatible with a cleavage at residues D1185 and Y1176 by caspase 3 and calpain, respectively.

Spectrin is substrate for LMW-PTP A. We checked whether this Src-phosphorylated residue could be an in vitro substrate of LMW-PTP A. Since the linkage of GST to the N terminus of LMW-PTP does not affect the kinetic properties of the enzymes (13), the activity of both LMW-PTP A and B expressed as GST-fusion proteins was tested on *para*-nitrophenylphosphate (pNPP) and on the Src-phosphorylated peptide (SH3- α 9- α 10 peptide). Recombinant LMW-PTP B displayed a higher activity on pNPP than on LMW-PTP A (100 times as

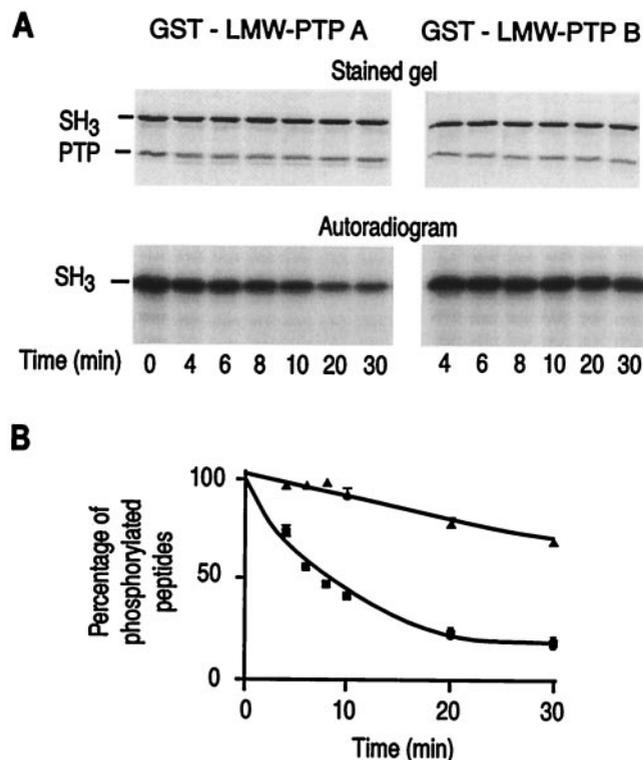


FIG. 8. Kinetic studies of LMW-PTP A and B activity on phosphorylated spectrin peptides. After phosphorylation by Src, recombinant peptide SH₃- α 9- α 10-His₆ (indicated by SH₃) was submitted to dephosphorylation by LMW-PTP A and B (indicated by PTP). (A) Coomassie blue-stained gel and autoradiogram. (B) Activity of LMW-PTP A (■) and LMW-PTP B (▲).

estimated by the number of pNPP molecules hydrolyzed per microgram of recombinant peptides), but LMW-PTP A was considerably more active on spectrin peptides than isoform B (Fig. 8). After 10 min of incubation at the same enzyme-substrate ratio, more than 50% of the spectrin was dephosphorylated by isoform A. In contrast, no detectable loss of phosphate was observed in the presence of isoform B after 10 min of incubation, and only a 25% loss of phosphate label was observed after 30 min of reaction.

DISCUSSION

Spectrin was tyrosine phosphorylated in vivo on residue Y1176. There is very little information available on the phosphorylation of spectrins, but in vivo ³²P labeling of spectrin has revealed phosphorylation of β -spectrins, mainly on serine but also threonine residues (19, 24, 39). In erythrocytes, β I-spectrin was reported to contain at least six phosphorylatable sites in vivo (36). The locations of these phosphorylated residues, the kinases, and phosphatases involved in this process as well as the functional significance of β I-spectrin phosphorylation are not clear. Manno et al. (30) demonstrated that an increase in the phosphorylation of β I-spectrin causes a decrease in the mechanical stability of red blood cell membrane. Serine phosphorylation of β II-spectrin has been associated with spectrin redistribution in epidermal growth factor-stimulated A 431

cells (9) and during mitosis (19). These findings support the view that β I-spectrin phosphorylation may regulate physiological functions in vivo. Concerning α -spectrins, mammalian α II-spectrin is an in vitro substrate for tyrosine kinases such as Src (1). The α -spectrin from *Torpedo* has been shown to be tyrosine phosphorylated (2). In this study, we demonstrate for the first time by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibodies that the mammalian endogenous α II-spectrin is tyrosine phosphorylated in vivo. This tyrosine phosphorylation of α II-spectrin depends greatly on kinase/phosphatase equilibrium since this phosphorylation cannot be detected in the absence of phosphatase inhibitors, which could explain why it was not previously detected.

Expression of mutant peptides in COS cells has allowed us to identify residue Y1176, located in the hypersensitive site for calpains (23, 40), as an in vivo site for cellular kinases and phosphatases.

In vitro experiments showed that this tyrosine can be a substrate for nonreceptor tyrosine kinases, such as Src and Lck. Some lines of evidence suggest that Src may be the physiological kinase: (i) Src is more active on residue Y1176 than Lck, (ii) in our in vitro studies (data not shown), Src preferentially phosphorylated Sp peptides rather than LMW-PTP A, which has been demonstrated to be a physiological target for Src (14), and (iii) Src and spectrin have been colocalized (20). The Src involvement in Sp phosphorylation on residue Y1176 in cells is likely but remains to be confirmed.

LMW-PTP A interacted with α II-Sp SH3 domain and dephosphorylated Y1176. Our in vitro studies have shown that residue Y1176 is a substrate for LMW-PTP A. We suspected spectrin might be a substrate for LMW-PTP A since we detected an interaction between LMW-PTP and the α II-Sp SH3 domain by two-hybrid screening of a rat kidney cDNA library. LMW-PTP A appears to be a highly specific partner for the α II-Sp SH3 domain as indicated by the following observations: (i) this interaction is conserved in humans, although LMW-PTP A sequences differ slightly between the two species (20 different residues out of 158; Fig. 1), (ii) LMW-PTP B (with 21 different residues) and LMW-PTP C (with these 21 residues deleted) did not interact with the α II-Sp SH3 domain, (iii) LMW-PTP A did not interact with either the α I-Sp SH3 domain (68% identity with α II-Sp SH3) or two other unrelated SH3 domains, and (iv) mutations of α II-Sp SH3 on residues involved in SH3 domain functions led to a loss of interaction with LMW-PTP A.

Surprisingly, the LMW-PTP A sequence did not contain the PXXP core motif usually flanked by positively charged residues, mainly Arg [RXX(X)PXXP or PXXP(X)R], whereas rat LMW-PTP B contains this motif (PPXPR). However, recent data have extended the repertoire of SH3 domain binding motifs to Tyr-based motifs, such as RKXXYXXY and PXXDY (28, 32), indicating that SH3 domain binding motifs are not so restrictive. Rat and human LMW-PTP A do not contain such a motif, but they contain a similar sequence (PPDYR) that is not present in isoforms B or C. Mutagenesis experiments are in progress to test whether this motif is the SH3-binding site. However, this short sequence is probably not sufficient since any interaction can be detected with partially truncated proteins that contain this sequence, suggesting that the whole molecule is required in the interaction. Selection of

clones with only the full-length sequence in the two-hybrid screens reinforces such a hypothesis.

The interaction of α II-Sp SH3 with LMW-PTP A was weak since we detected it only in the two-hybrid assay and *in vitro*, in the presence of a cross-linking agent. During evolution it seems that SH3 domains have been selected to recognize their ligands with a high specificity but a relatively low affinity. Such interactions are ideal for signaling domains that must recognize selective ligands to transduce information accurately, but with low affinity to allow sensitive and dynamic modulation in response to changing signals. Typically, the K_d values of ligands binding SH3 domains are low (between 1 and 100 μ M for synthetic peptides). Recent data have suggested that SH3 domain interactions may be regulated in the cell, for example, by phosphorylation. The interaction between Sos and Grb2 and the interaction between WASP and PSTPIP can be regulated by phosphorylation of either the ligand or the SH3 domain (49, 50). So, the interaction between spectrin and LMW-PTP A can involve both the Sp SH3 domain and the phosphorylated Y1176 residue. Interaction with the α II-Sp SH3 domain could participate either in the recruitment or in the regulation of the enzyme activity, and it could also make the enzyme-substrate interaction more specific. Such effects have been observed between PTP 1B and its substrate, the protein p130cas: the interaction between the PTP 1B proline-rich region and the p130cas SH3 domain is required for substantial tyrosine dephosphorylation of p130cas and for the function of PTP 1B as a negative regulator of integrin signaling (29).

Moreover, LMW-PTPs are 18-kDa enzymes that are distantly related to other PTPases: they contain only the catalytic domain whereas other PTPases also possess regulatory or targeting domains. Because LMW-PTPs apparently lack regulatory elements, their regulation and targeting are not fully understood, although Y131 and Y132 phosphorylation by kinases of the Src family up-regulate their catalytic activity (44). The Sp α II SH3 domain ability to bind LMW-PTP A correlates with the presence of a tyrosine phosphorylation site near the SH3 domain. It is noticeable that the α I-spectrin chain, which does not contain this tyrosine or the calpain cleavage site, has an SH3 domain unable to recruit LMW-PTP. Similarly, our *in vitro* studies have shown that spectrin is a better substrate for LMW-PTP A than for isoform B. The isoforms A and B are quite similar; they arise from alternative splicing of two homologous exons of the same gene. However, the two enzymes differ in substrate specificity (towards synthetic substrates as well as more physiological protein targets) and in response to inhibitors or activators, indicating that isoforms have acquired different physiological functions (13). Several proteins have been identified as LMW-PTP B substrates (PDGF-R, EGF-R, insulin-R, and MCSF-R), whereas ephrin receptor tyrosine kinases are the only physiological targets of LMW-PTP A known so far (42). Spectrin is a new candidate for a physiological substrate for LMW-PTP A, since a fraction of LMW-PTP A that is mainly cytosolic is associated with the skeleton in a detergent-insoluble fraction.

Spectrin cleavage by calpain and membrane skeleton remodeling. As we have shown, α II-spectrin phosphorylation on residue 1176 modifies its susceptibility to calpains, ubiquitous Ca^{2+} -dependent proteases. Modification of sensitivity to proteolysis by phosphorylation has already been observed: the

glutamate ionotropic AMPA receptors are more resistant to calpain when phosphorylated (6). In contrast, tyrosine phosphorylation of cortactin increases its sensitivity to calpain (26).

Proteolysis of the α II-spectrin by calpain is well known and has been documented as a consequence of cell injury in several tissues. It also correlates with platelet activation, neutrophil degranulation, neuronal long-term potentiation, NMDA receptor activation, stimulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells, and endocytosis (27). The action of calpain on spectrin is of significant interest because of its dramatic effect on the stability of the spectrin-based skeleton: spectrin cleavage by calpain leads up to a loss of spectrin ability to cross-link actin filaments and to bind to the membrane (25). Thus, modulation of spectrin proteolysis by phosphorylation must be important for stability and reorganization of the spectrin-based skeleton and consequently for spectrin-based skeleton functions. These data raise the question of the events that can modify the balance of kinase/phosphatase activities.

Taken together, our results demonstrate that calpain-mediated truncation of spectrin can be regulated not only by Ca^{2+} -calmodulin level but also by phosphorylation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Maria Skibinska (program Erasmus) for technical help and Philippe Vernier for their valuable advice and suggestions in the preparation of the cDNA library.

This work was supported by an SFH grant.

REFERENCES

1. Akiyama, T., T. Kadowaki, E. Nishida, T. Kadooka, H. Ogawara, Y. Fukami, H. Sakai, F. Takaku, and M. Kasuga. 1986. Substrate specificities of tyrosine-specific protein kinases toward cytoskeletal proteins *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **261**:14797–14803.
2. Balasubramanian, S., and R. L. Haganir. 1999. Characterization of phosphotyrosine containing proteins at the cholinergic synapse. *FEBS Lett.* **446**:95–102.
3. Beck, K. A., J. A. Buchanan, and W. J. Nelson. 1997. Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **110**:1239–1249.
4. Bennett, V., and A. J. Baines. 2001. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.* **81**:1353–1392.
5. Berghs, S., D. Aggularo, R. Dirks, Jr., E. Maksimova, P. Stabach, J. M. Hermel, J. P. Zhang, W. Philbrick, V. Slepnev, T. Ort, and M. Solimena. 2000. BetaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* **151**:985–1002.
6. Bi, R., X. Bi, and M. Baudry. 1998. Phosphorylation regulates calpain-mediated truncation of glutamate ionotropic receptors. *Brain Res.* **797**:154–158.
7. Bloch, R. J., and J. S. Morrow. 1989. An unusual beta-spectrin associated with clustered acetylcholine receptors. *J. Cell Biol.* **108**:481–493.
8. Blot-Chabaud, M., M. Laplace, F. Cluzeaud, C. Capurro, R. Cassingena, A. Vandewalle, N. Farman, and J. P. Bonvalet. 1996. Characteristics of a rat cortical collecting duct cell line that maintains high transepithelial resistance. *Kidney Int.* **50**:367–376.
9. Bretscher, A. 1989. Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* **108**:921–930.
10. Bryson, G. L., H. Massa, B. J. Trask, and R. L. Van Etten. 1995. Gene structure, sequence, and chromosomal localization of the human red cell-type low-molecular-weight acid phosphotyrosyl phosphatase gene, ACP1. *Genomics* **30**:133–140.
11. Chang, E. C., M. Barr, Y. Wang, V. Jung, H. P. Xu, and M. H. Wigler. 1994. Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* **79**:131–141.
12. Chomczynski, P. A., and N. Sacchi. 1991. Single-step isolation from cultured cells or tissue, p. 4.2.1–4.2.2. *In* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
13. Cirri, P., T. Fiaschi, P. Chiarugi, G. Camici, G. Manao, G. Raugei, and G.

- Ramponi. 1996. The molecular basis of the differing kinetic behavior of the two low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase isoforms. *J. Biol. Chem.* **271**:2604–2607.
14. Cirri, P., P. Chiarugi, L. Taddei, G. Raugi, G. Camici, G. Manao, and G. Ramponi. 1998. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. *J. Biol. Chem.* **273**:32522–32527.
 15. Clark, S. G., M. J. Stern, and H. R. Horvitz. 1992. *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* **356**:340–344.
 16. De Matteis, M. A., and J. S. Morrow. 1998. The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:542–549.
 17. Dubreuil, R. R., P. Wang, S. Dahl, J. Lee, and L. S. Goldstein. 2000. *Drosophila* beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na,K ATPase in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **149**:647–656.
 18. Erpel, T., G. Superti-Furga, and S. A. Courtneidge. 1995. Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interaction. *EMBO J.* **14**:963–975.
 19. Fowler, V. M., and E. J. Adam. 1992. Spectrin redistributes to the cytosol and is phosphorylated during mitosis in cultured cells. *J. Cell Biol.* **119**:1559–1572.
 20. Fox, J. E., L. Lipfert, E. A. Clark, C. C. Reynolds, C. D. Austin, and J. S. Brugge. 1993. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* **268**:25973–25984.
 21. Gascard, P., and N. Mohandas. 2000. New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells. *Curr. Opin. Hematol.* **7**:123–129.
 22. Hammarlund, M., W. S. Davis, and E. M. Jorgensen. 2000. Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure. *J. Cell Biol.* **149**:931–942.
 23. Harris, A. S., and J. S. Morrow. 1988. Proteolytic processing of human brain alpha spectrin (fodrin): identification of a hypersensitive site. *J. Neurosci.* **8**:2640–2651.
 24. Harris, H. W., Jr., and S. E. Lux. 1980. Structural characterization of the phosphorylation sites of human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* **255**:11512–11520.
 25. Hu, R. J., and V. Bennett. 1991. In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s). *J. Biol. Chem.* **266**:18200–18205.
 26. Huang, C., N. N. Tandon, N. J. Greco, Y. Ni, T. Wang, and X. Zhan. 1997. Proteolysis of platelet cactactin by calpain. *J. Biol. Chem.* **272**:19248–19252.
 27. Kamal, A., Y. Ying, and R. G. Anderson. 1998. Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J. Cell Biol.* **142**:937–947.
 28. Kang, H., C. Freund, J. S. Duke-Cohan, A. Musacchio, G. Wagner, and C. E. Rudd. 2000. SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J.* **19**:2889–2899.
 29. Liu, F., M. A. Sells, and J. Chernoff. 1998. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. *Curr. Biol.* **8**:173–176.
 30. Manno, S., Y. Takakuwa, K. Nagao, and N. Mohandas. 1995. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**:5659–5665.
 31. McMahon, L. W., C. E. Walsh, and M. W. Lambert. 1999. Human alpha spectrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex. *J. Biol. Chem.* **274**:32904–32908.
 32. Mongioli, A. M., P. R. Romano, S. Panni, M. Mendoza, W. T. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni, and P. P. Di Fiore. 1999. A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J.* **18**:5300–5309.
 33. Moorthy, S., L. Chen, and V. Bennett. 2000. Caenorhabditis elegans beta-G spectrin is dispensable for establishment of epithelial polarity, but essential for muscular and neuronal function. *J. Cell Biol.* **149**:915–930.
 34. Nicolas, G., S. Pedroni, C. Fournier, H. Gautero, and M. C. Lecomte. 1997. Method of site-directed mutagenesis using long primer-unique site elimination and exonuclease III. *BioTechniques* **22**:430–434.
 35. Parkinson, N. J., C. L. Olsson, J. L. Hallows, J. McKee-Johnson, B. P. Keogh, K. Noben-Trauth, S. G. Kujawa, and B. L. Tempel. 2001. Mutant beta-spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice. *Nat. Genet.* **29**:61–65.
 36. Pedroni, S., M. C. Lecomte, H. Gautero, and D. Dhermy. 1993. Heterogeneous phosphorylation of erythrocyte spectrin beta chain in intact cells. *Biochem. J.* **294**(Pt. 3):841–846.
 37. Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, and D. Bowtell. 1993. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* **363**:83–85.
 38. Sihag, R. K., T. B. Shea, and F. S. Wang. 1996. Spectrin-actin interaction is required for neurite extension in NB 2a/dl neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* **44**:430–437.
 39. Sihag, R. K. 1998. Brain beta-spectrin phosphorylation: phosphate analysis and identification of threonine-347 as a heparin-sensitive protein kinase phosphorylation site. *J. Neurochem.* **71**:2220–2228.
 40. Stabach, P. R., C. D. Cianci, S. B. Glantz, Z. Zhang, and J. S. Morrow. 1997. Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry* **36**:57–65.
 41. Stankewich, M. C., W. T. Tse, L. L. Peters, Y. Ch'ng, K. M. John, P. R. Stabach, P. Devarajan, J. S. Morrow, and S. E. Lux. 1998. A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:14158–14163.
 42. Stein, E., A. A. Lane, D. P. Cerretti, H. O. Schoecklmann, A. D. Schroff, R. L. Van Etten, and T. O. Daniel. 1998. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev.* **12**:667–678.
 43. Steiner, J. P., H. T. Walke, Jr., and V. Bennett. 1989. Calcium/calmodulin inhibits direct binding of spectrin to synaptosomal membranes. *J. Biol. Chem.* **264**:2783–2791.
 44. Tailor, P., J. Gilman, S. Williams, C. Couture, and T. Mustelin. 1997. Regulation of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase by phosphorylation at tyrosines 131 and 132. *J. Biol. Chem.* **272**:5371–5374.
 45. Tailor, P., J. Gilman, S. Williams, and T. Mustelin. 1999. A novel isoform of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase, LMPTP-C, arising from alternative mRNA splicing. *Eur. J. Biochem.* **262**:277–282.
 46. Takeda, S., H. Yamazaki, D. H. Seog, Y. Kanai, S. Terada, and N. Hirokawa. 2000. Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin- associating vesicles important for neurite building. *J. Cell Biol.* **148**:1255–1265.
 47. Vidal, M., N. Goudreau, F. Cornille, D. Cussac, E. Gincel, and C. Garbay. 1999. Molecular and cellular analysis of Grb2 SH3 domain mutants: interaction with Sos and dynamin. *J. Mol. Biol.* **290**:717–730.
 48. Wang, C. Y., S. K. Kong, and J. H. Wang. 1988. Characterization of fodrin phosphorylation by spleen protein tyrosine kinase. *Biochemistry* **27**:1254–1260.
 49. Wu, Y., S. D. Spencer, and L. A. Lasky. 1998. Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein. *J. Biol. Chem.* **273**:5765–5770.
 50. Zhao, H., S. Okada, J. E. Pessin, and G. A. Koretzky. 2007. 1998. Insulin receptor-mediated dissociation of Grb2 from Sos involves phosphorylation of Sos by kinase(s) other than extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:12061–12067.
 51. Ziemnicka-Kotula, D., J. Xu, H. Gu, A. Potempska, K. S. Kim, E. C. Jenkins, E. Trenkner, and L. Kotula. 1998. Identification of a candidate human spectrin Src homology 3 domain-binding protein suggests a general mechanism of association of tyrosine kinases with the spectrin-based membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* **273**:13681–13692.