

Université de Montréal

**Étude de l'activation des MAPKs ERK1/2 par les  
récepteurs couplés aux protéines G  
Rôle de la protéine adaptatrice  $\beta$ arrestine**

Par  
Pascale G. Charest

Département de Biochimie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Biochimie

Mai, 2005

© Pascale G. Charest, 2005





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude de l'activation des MAPKs ERK1/2 par les  
récepteurs couplés aux protéines G  
Rôle de la protéine adaptatrice  $\beta$ arrestine**

Présentée par :  
Pascale G. Charest

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvie Mader, présidente-rapporteuse et  
représentante du doyen de la FES  
Michel Bouvier, directeur de recherche  
Gérardo Ferbeyre, membre du jury  
Thue Schwartz, examinateur externe

## Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de récepteurs de la surface cellulaire. Responsables de la détection d'une énorme variété de signaux, les RCPGs sont la plus importante cible pharmacologique pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Toutefois, plusieurs aspects fonctionnels de la signalisation cellulaire engendrée par les RCPGs demeurent inexplicés. Même si la transduction des signaux détectés par les RCPGs est classiquement décrite comme l'activation d'une protéine G hétéro-trimérique, modulant l'activité d'effecteurs membranaires et la production de second messagers intracellulaires, un nombre grandissant d'études démontre l'importance de l'activation des protéines kinases activées par des signaux mitogéniques (MAPK) dans le répertoire signalétique des RCPGs. Ainsi, cette thèse est principalement consacrée à l'étude de l'activation des MAPKs régulées par des signaux extracellulaires 1 et 2 (ERK1/2) par les RCPGs, en utilisant les récepteurs V2 de la vasopressine (V2R) et  $\beta_2$ -adrénergique ( $\beta_2$ AR) comme modèles.

Premièrement, nous avons étudié l'activation d'ERK1/2 par les  $\beta_2$ AR et V2R induite par des ligands d'efficacités distinctes envers l'activité adénylyl cyclase couplée à ces récepteurs. Nous avons observé qu'alors que l'activation des  $\beta_2$ AR et V2R par des agonistes complets induit une forte stimulation des activités adénylyl cyclase et ERK1/2, leur stimulation par des agonistes inverses, inhibant leur couplage à Gs et l'activité adénylyl cyclase, induit l'activation partielle des MAPKs de façon dépendante de la protéine adaptatrice  $\beta$ arrestine. Ainsi, ces résultats suggèrent que le recrutement de  $\beta$ arrestine n'est pas qu'une propriété des agonistes et qu'il existe plusieurs conformations actives distinctes des RCPGs. Celles-ci peuvent alors être sélectivement régulées selon la nature du ligand et mener à l'activation différentielle des voies de signalisation couplées aux récepteurs. Recherchant ensuite le rôle de la palmylation des RCPGs dans la régulation de l'activité MAPK, nos travaux montrent que la palmylation du V2R favorise

son interaction avec  $\beta$ arrestine et, par conséquent, l'activation d'ERK1/2 ainsi que l'endocytose du récepteur. De plus, l'étude de la cascade signalétique menant à l'activation d'ERK1/2 par le V2R a permis de mettre encore plus en évidence le rôle de  $\beta$ arrestine dans cette voie de signalisation, qui s'avéra complètement indépendante des protéines G hétéro-trimériques. Enfin, pour étudier davantage l'activation de  $\beta$ arrestine par les RCPGs, nous avons développé un biosenseur intra-moléculaire basé sur le transfert d'énergie de résonance par bioluminescence, consistant en une  $\beta$ arrestine prise en sandwich entre la luciférase de *Renilla* et la protéine fluorescente jaune. Cette  $\beta$ arrestine double brillance nous a permis de détecter, en temps réel dans des cellules vivantes, la présence d'un changement conformationnel de la molécule de  $\beta$ arrestine suivant son recrutement aux RCPGs activés. De plus, puisque la majorité des RCPGs semblent recruter et activer  $\beta$ arrestine de façon dépendante de l'agoniste, la  $\beta$ arrestine double brillance représente un biosenseur potentiel pour l'étude générale de l'activité de ces récepteurs.

Nous croyons que les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont contribué de façon significative à améliorer notre compréhension de la régulation des MAPKs ERK1/2 par les RCPGs, mettant en évidence le rôle de la protéine adaptatrice  $\beta$ arrestine dans cette voie de signalisation.

**Mots-clés:** RCPG; Kinases activés par des signaux mitogéniques; Kinases régulées par des signaux extra-cellulaires 1 et 2; Récepteur V2 de la vasopressine, V2R; Récepteur  $\beta_2$ -adrénergique,  $\beta_2$ AR; Biosenseur; Transfert d'énergie de résonance par bioluminescence, BRET.

## Abstract

G protein-coupled receptors (GPCR) represent the largest family of cell surface receptors. Being responsible for the detection of a large variety of signals, it's not surprising to find that GPCRs are the most popular drug targets of the pharmaceutical industry. However, many aspects of GPCR function are still not clearly understood, such as their capacity to regulate mitogen-activated protein kinases (MAPK). Indeed, even if signal transduction by GPCRs is classically known to involve activation of hetero-trimeric G proteins, leading to modulation of second messenger producing systems, a growing number of studies underline the importance of MAPKs in GPCR function. This thesis is thus primarily interested in studying GPCR-mediated activation of the extra-cellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) MAPKs, using the prototypical V2 vasopressin (V2R) and  $\beta_2$ -adrenergic ( $\beta_2$ AR) receptors.

First, we studied  $\beta_2$ AR- and V2R-mediated ERK1/2 activation following their stimulation by ligands with different efficacies towards the adenylyl cyclase activity coupled to these receptors. We show that, while stimulation of the  $\beta_2$ AR and V2R by their respective full agonist led to strong activation of the adenylyl cyclase and ERK1/2, inverse agonists, inhibiting Gs coupling and the adenylyl cyclase activity, induced a partial  $\beta$ arrestin-dependant activation of the MAPKs in both systems. Hence, these results suggest that recruitment of the adaptor protein  $\beta$ arrestin is not an exclusive property of agonists, and point to a multistate model of receptor activation in which ligand-specific conformations are capable of differentially activating distinct signaling partners. Second, investigation of the potential role of GPCR palmitoylation on MAPK activation, we found that V2R palmitoylation favors  $\beta$ arrestin recruitment, leading to enhance ERK1/2 activation and receptor endocytosis. In addition, the study of the signaling cascade linking the V2R to ERK1/2 allowed putting forward the central role of  $\beta$ arrestin in this signaling pathway, which seems to be totally independent of G protein signaling. Finally, to further study

$\beta$ arrestin activation by GPCR, we developed an intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer-based biosensor consisting of a  $\beta$ arrestin sandwiched between the *Renilla* luciferase and the yellow fluorescent protein. This double brilliance  $\beta$ arrestin allowed us to detect, in real time and living cells, the presence of an important conformational change of the  $\beta$ arrestin molecule, occurring after its initial recruitment to the activated receptors. Moreover, since most agonist-stimulated GPCRs were shown to recruit and activate  $\beta$ arrestin, double brilliance  $\beta$ arrestin represents a potential tool in the general study of GPCR activity.

We believe the results presented herein significantly contributed to increase our knowledge of the GPCR-mediated regulation of MAPK activity, bringing forward the important role of the adaptor protein  $\beta$ arrestin in this signaling pathway.

**Keywords:** GPCR; Mitogen-activated protein kinases; Extra-cellular signal-regulated kinases 1 and 2; V2 vasopressin receptor, V2R;  $\beta_2$ -adrenergic receptor,  $\beta_2$ AR; Biosensor; Bioluminescence resonance energy transfer, BRET.



## Table des matières

Liste des tableaux.....	x
Liste des figures .....	xi
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	xiii
Remerciements.....	xx
<i>AVANT-PROPOS</i> .....	xxi
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	1
1.1 Les récepteurs à sept passages trans-membranaires et leur interaction avec les protéines G hétéro-trimériques.....	1
1.1.1 Classification des RCPGs .....	3
1.1.2 Activité des RCPGs .....	6
1.2 Les protéines G hétéro-trimériques.....	9
1.2.1 Classification des protéines G hétéro-trimériques .....	12
1.2.2 Les effecteurs cibles des protéines G hétéro-trimériques .....	13
1.3 Adaptation-Atténuation du signal .....	16
1.3.1 Désensibilisation du signal.....	17
1.3.2 Endocytose .....	25
1.3.3 Régulation négative.....	30
1.4 Autres partenaires des RCPGs et signalisation indépendante des protéines G hétéro-trimériques .....	31
1.4.1 Interaction directe des RCPGs avec des protéines effectrices .....	32
1.4.2 Interaction des RCPGs avec des protéines d'échafaudage .....	35
1.5 Régulation des voies MAPK par les RCPGs .....	40
1.5.1 Les MAPKs.....	41
1.5.2 Régulation de la voie ERK1/2 par les RCPGs dépendante de la production de seconds messagers.....	43
1.5.3 La trans-activation des RTKs.....	46

1.5.4	Rôle de l'échafaudage des MAPKs sur leur localisation et fonction.....	49
1.6	Régulation de la fonction des RCPGs et modifications post-traductionnelles: rôle de la palmylation.....	51
1.6.1	La palmylation des RCPGs.....	52
1.6.2	La dynamique de la palmylation.....	55
1.6.3	Rôle fonctionnel de la palmylation des RCPGs.....	57
1.7	Modèles d'étude.....	60
1.7.1	Le V2R.....	61
1.7.2	Le $\beta_2$ AR.....	68
1.8	Objectifs de la thèse.....	73
2.	<i>RÉSULTATS</i> .....	74
2.1	Article 1	
	$\beta$ -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. ....	75
2.2	Article 2	
	Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances $\beta$ -arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. ....	83
2.3	Article 3	
	The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signaling. ....	95
2.4	Article 4	
	Monitoring agonist-promoted conformational changes of $\beta$ arrestin in living cells by intra-molecular BRET.....	134
3.	<i>DISCUSSION</i> .....	143
3.1	Fonction des RCPGs et spécificité conformationnelle .....	144
3.1.1	Multiplicité des états conformationnels des RCPGs et régulation par le ligand.....	144

3.1.2	Palmylation des RCPGs et régulation intra-cellulaire de la conformation des récepteurs.....	149
3.2	Rôle de $\beta$ arrestine dans la fonction des RCPGs.....	151
3.2.1	Activation et changements conformationnels de $\beta$ arrestine.....	152
3.2.2	Fonction et régulation de l'interaction des RCPGs avec $\beta$ arrestine.....	156
3.2.3	Régulation de l'activité ERK1/2 par le V2R.....	159
3.3	Conclusion .....	168
4.	<i>BIBLIOGRAPHIE</i> .....	170
	<i>ANNEXES</i> .....	204
	Annexe I Contributions additionnelles.....	204

## Liste des tableaux

Tableau I. Protéines interagissant avec les RCPGs.....	33
Tableau II. Alignement de séquence du domaine C-terminal de certains RCPGs.....	54

## Liste des figures

Figure 1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). .....	2
Figure 2. Structure et organisation de la rhodopsine. ....	4
Figure 3. Classification et diversité des RCPGs. ....	5
Figure 4. Pharmacologie des RCPGs. ....	7
Figure 5. Les protéines G hétéro-trimériques. ....	10
Figure 6. Les deux principaux systèmes de génération de seconds messagers activés par les protéines G hétéro-trimériques.....	14
Figure 7. Les GRKs. ....	19
Figure 8. Les $\beta$ arrestines. ....	22
Figure 9. Mécanisme proposé pour la liaison de $\beta$ arrestine aux RCPGs. ....	24
Figure 10. Endocytose des RCPGs dépendante de $\beta$ arrestine. ....	27
Figure 11. Rôle de $\beta$ arrestine dans la désensibilisation, séquestration et trafic intracellulaire des RCPGs. ....	28
Figure 12. Interaction des RCPGs avec des protéines échafauds. ....	36
Figure 13. Rôle de $\beta$ arrestine dans l'échafaudage de complexes signalétiques.....	39
Figure 14. Les modules MAPK. ....	42
Figure 15. Un réseau complexe de signaux dérivés des RCPGs régule l'activité de la cascade ERK1/2. ....	45
Figure 16. Spécialisation fonctionnelle de différents mécanismes d'activation d'ERK1/2 par les RCPGs.. ....	50
Figure 17. Représentation schématique d'un RCPG palmitylé. ....	53
Figure 18. Structure du néphron.....	62
Figure 19. Représentation schématique de l'effet d'AVP, qui augmente la perméabilité à l'eau des cellules principales du tube collecteur. ....	63
Figure 20. Composition de la séquence peptidique du V2R humain et son organisation topographique à la membrane plasmique.....	66

Figure 21. Composition de la séquence peptidique du $\beta_2$ AR humain, et son organisation topographique à la membrane plasmique.....	71
Figure 22. Schéma représentant deux modèles d'activation des RCPGs.....	146
Figure 23. Rôle de la palmylation du V2R. ....	150
Figure 24. Endocytose dépendante de $\beta$ arrestine au-delà des RCPGs.....	156
Figure 25. Régulation et fonction de l'interaction du V2R avec $\beta$ arrestine. ....	158
Figure 26. Voies de signalisation engagées par le V2R.....	163
Figure 27. Hypothèse du mécanisme d'activation des MAPKs ERK1/2 par le V2R.....	166
Figure 28. Activation de p38 par le V2R. ....	167

## Liste des sigles et abréviations

### Acides aminés :

C	Cystéine
D	Aspartate
F	Phénylalanine
I	Isoleucine
K	Lysine
L	Leucin
N	Asparagine
P	Proline
R	Arginine
S	Sérine
T	Thréonine
Y	Tyrosine

### Atomes :

C	Carbone
H	Hydrogène
N	Azote
O	Oxygène

5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>4A</sub>	Récepteur sérotoninergique de type 2A ou 4A
AC	adénylyl cyclase
ADH	Hormone anti-diurétique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AKAP	Protéine d'ancrage de la PKA
AP-2	Adaptine-2

AQP2, AQP3, AQP4	Aquaporine de type 2, 3, ou 4
$\alpha$ AR, $\beta$ AR	Récepteur adrénergique de type $\alpha$ ou $\beta$
ASK	Kinase de signalisation apoptotique
AT <sub>1</sub> AR	Récepteur de l'angiotensine de type 1A
AVP	Arginine vasopressine
B2R	Récepteur de la bradykinine de type 2
$\beta$ ARK	Kinase du $\beta_2$ AR ou GRK2
$\beta$ arr	$\beta$ arrestine
BRET	RET par bioluminescence
BRET <sup>2</sup>	Deuxième génération de BRET
C-	Carboxyl
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcique
CCR5	Récepteur des chimiokines CC de type 5
CKII	Kinase caséine II
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CRREB-P	Protéine liant CRE
CRF	Facteur de relâche des corticotropines
CTC	Complexe ternaire cubique
CXCR	Récepteur des chimiokines CXC
D1R, D2R, D4R	Récepteur de la dopamine de type 1, 2, ou 4
DAG	Diacylglycérol
$\delta$ OR	Récepteur $\delta$ -opioïde
Dyn	Dynamine
e1, e2, e3	boucles extra-cellulaires 1, 2, 3
E	Effecteur
EGF, EGFR	Facteur de croissance épidermique et son récepteur
eNOS, iNOS	NO synthase endothéliale ou inductible
ERK1/2	Kinases régulées par des signaux extra-cellulaires 1 et 2



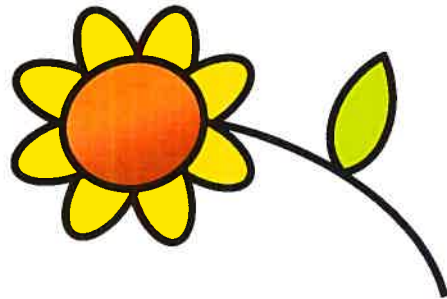
ET <sub>A</sub> R, ET <sub>B</sub> R	Récepteur de l'endothéline de type A ou B
ETC	Complexe ternaire étendu
FAK	Kinase de l'adhésion focale
fMLP	N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
FSH	Hormone stimulatrice du follicule
G	Protéine G hétéro-trimérique
GABA	Acide- $\gamma$ -amino-butyrique
GAP	Protéine activatrice de la GTPase
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange du GDP
GFP	Protéine fluorescente verte
GLUT	Transporteur du glucose
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GnRH	Hormone de relâche des gonadotropines
GoVR	VR couplé à Go
GRK	Kinase des RCPGs
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Enzyme hydrolysant le GTP
H	Hormone
H <sup>+</sup>	Ion hydrogène
H2R	Récepteur histaminique de type 2
HB-EGF	EGF liant l'héparine
hCG	Coriogonadotropine humaine
HEK293	Cellules embryonnaires de rein humain 293
i1, i2, i3	boucles intra-cellulaires 1, 2, 3
IGF	Facteur de croissance semblable à l'insuline
IL-8	Interleukine-8
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate

Jak	Kinase Janus ou “juste une autre kinase”
JIP	Protéine interagissant avec JNK
JNK	Kinase au domaine N-terminal semblable à c-Jun ou SAPK
K <sup>+</sup>	Ion potassique
L	Ligand
LH	Hormone lutéinisante
LH/hCG	Récepteur du LH/hCG
Luc	Luciférase de <i>Rénilla</i>
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes
MAP2K	MAPK kinase
MAP3K	MAP2K kinase
MEK	MAPK kinase pour ERK
mGluR1a, mGluR5	Récepteur métabotrope du glutamate de type 1a ou 5
MKK4	MAPK kinase de type 4
MMP	Métalloprotéase associée à la matrice
N-	Amino
Na <sup>+</sup>	Ion sodique
NDI	Diabète insipide néphrogénique
NGF, NGFR	Facteur de croissance neuronal et son récepteur
NHE3	Échangeur Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> de type 3
NHERF	Facteur de régulation de l'échange Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup>
NK1R	Récepteur de la neurokinine-1
nm	Nanomètre
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NSF	Facteur sensible au N-éthylmaléimide
ORL	Récepteur de la nociceptine
PACAP	Peptide activateur de l'AC pituitaire
PAF, PAFR	Facteur activant les plaquettes et son récepteur

PAR	Récepteur activé par une protéase
PDE	Phosphodiesterase
PDGF, PDGFR	Facteur de croissance dérivé des plaquettes et son récepteur
PDZ	Domaine semblable à PSD-95/Discs-large/ZO-1
PH	Domaine d'homologie à la plextrine
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante du Ca <sup>2+</sup>
PKD	Protéine kinase D
PLA <sub>2</sub> , PLC, PLD	Phospholipase de type A <sub>2</sub> , C, ou D
PP2A	Phosphatase de type 2A
PSD	Protéine de densité synaptique
PTH, PTHR	Hormone parathyroïdienne et son récepteur
R	Récepteur
R*	Récepteur actif
RACK	Récepteur activé par la PKC
RAMP	Protéine modifiant l'activité des récepteurs
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques
RET	Transfert d'énergie de résonance
RGS	Régulateur de la signalisation des protéines G
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SAPK	Protéine kinase activée par le stress
SH1, SH2, SH3	Domaine d'homologie à Src de type 1, 2, ou 3
SSTR5	Récepteur de la somatostatine de type 5
STAT	Protéine de transduction du signal et activatrice de la transcription
T2R	Récepteur du goût de type 2
TGFβ	Facteur de croissance transformant de type β
TM	Domaine trans-membranaire

TRH, TRHR	Hormone de relâche des thyrotropines et son récepteur
TSH, TSHR	Hormone stimulatrice de la thyroïde et son récepteur
$\mu\text{M}$	Micromolaire
UT2	Transporteur d'urée de type 2
V1aR, V1bR, V2R	Récepteur de la vasopressine de type 1a, 1b, ou 2
VIP	Peptide vasoactif intestinal
VR	Récepteur des phéromones voméronasal
YFP	Protéine fluorescente jaune

*À mon meilleur ami, mon complice, mon soleil,  
Antonio.*



## Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, qui m'a réellement fait découvrir la science, ses bons comme ses moins bons côtés, mais toujours avec un optimisme hors pair! Michel, ta curiosité scientifique et ta patience font de toi un scientifique et un directeur exceptionnel et je me considère choyée d'avoir effectué mes études graduées dans ton laboratoire. J'ai aussi énormément apprécié la confiance que tu m'as démontré et la liberté que tu m'as offerte durant toutes ces années sous ta tutelle, qui m'ont sincèrement permis de m'épanouir scientifiquement. Merci.

Je remercie aussi tous les membres passés et présents du laboratoire de Michel, qui ont également contribué, que ce soit par les discussions scientifiques enflammées ou par l'amitié, à mon évolution de ces dernières années tant sur le plan scientifique que personnel. Je remercie particulièrement Monique, la dame aux multiples fonctions, la  $\beta$ arrestine du laboratoire! Monique, sincèrement, merci pour ta disponibilité et ta patience!! Tu m'as rendu les choses compliquées tellement plus faciles! Je remercie aussi vivement Hélène. Ton amitié m'est très précieuse et tu vas me manquer!!

Puis, sur un plan plus personnel, je remercie mes parents pour leur soutien constant, autant moral que financier! Je n'en serais probablement pas rendu là sans vous. Merci. Et finalement, je remercie spécialement mon « Abdul » préféré, Antonio. Merci de m'avoir endurée dans tous les hauts et les bas de ses études de fou, merci pour ta compréhension, ton soutien, ton affection. Et surtout, merci d'avoir vécu cette aventure avec moi mais, ce n'est que le début!!!

## ***AVANT-PROPOS***

Dans un organisme multicellulaire, les cellules doivent communiquer entre elles sans arrêt, afin de se renseigner ainsi que de renseigner les autres de leur tâche à accomplir. À l'image de toute société, ces interactions sociales sont vitales à la fois pour la survie de la communauté et pour sa création. Ainsi, leur permettant de coordonner leur comportement de plusieurs façon différentes, les cellules ont la capacité de transmettre et de détecter une grande variété de signaux, allant de très petites molécules comme des photons et ions jusqu'à de plus grosses comme des acides aminés, peptides et protéines. Comme n'importe quel système de communication, les points critiques de la transmission sont ceux où l'information est convertie d'une forme en une autre : la transduction du signal. Le signal est reconnu par un récepteur spécialisé présent à la surface cellulaire qui transforme le signal extracellulaire en un signal intracellulaire interprétable par la cellule cible, c'est la signalisation cellulaire. Une cellule typique possède une collection entière de récepteurs différents et est donc simultanément sensible à de nombreux signaux extracellulaires. La signalisation intracellulaire engendrée par ces multiples signaux simultanés est alors dite combinatoire et la réponse en découlant est le produit de l'intégration de ces signaux par la cellule, réponse qui ne correspond pas nécessairement à la simple somme de ces signaux. De cette manière, un nombre relativement petit de signaux peut être utilisé dans des combinaisons différentes pour contrôler le comportement de la cellule de façon fine et complexe.

La plus grande famille de récepteurs présents à la membrane cellulaire est sans contredit celle des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG). Servant d'intermédiaire aux réponses à une énorme variété de signaux, ils sont impliqués dans la régulation de processus physiologiques aussi divers que la perception sensorielle de la douleur, de la lumière, des odeurs et du goût, de même que la neurotransmission, la sécrétion endocrine et

exocrine, le métabolisme, le développement, la contraction musculaire, ainsi que les réponses inflammatoire et immunitaire. Vu l'importance biologique des RCPGs, il n'est pas surprenant que ces récepteurs représentent la plus importante cible pharmacologique pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Même si cette famille de récepteurs comporte de moins en moins de secrets pour les scientifiques du domaine, plusieurs aspects fonctionnels de la signalisation cellulaire engendrés par les RCPGs ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des différentes voies de signalisation demeurent inexpliqués. De plus, il y a encore, à ce jour, des dizaines de RCPGs encodés par le génome humain dont on ne connaît ni la nature du ligand ni la fonction.

Classiquement, la transduction des signaux détectés par les RCPGs est décrite comme l'activation d'une protéine G hétéro-trimérique, qui agit à son tour sur un enzyme membranaire, induisant soit l'inhibition ou la stimulation de la production de second messagers intracellulaires, comme l'AMP cyclique et l'ion  $Ca^{2+}$ , orchestrant ensuite la réponse cellulaire. Nous savons maintenant que la signalisation cellulaire engendrée par l'activation des RCPGs peut être beaucoup plus complexe. Entre autres, un nombre grandissant d'études démontre l'importance de l'activation des protéines kinases activées par des signaux mitogéniques (MAPK), parfois dépendante parfois indépendante des protéines G hétéro-trimériques, dans le répertoire signalétique des RCPGs. De plus, influencés par la nature du ligand, du récepteur ainsi que par le contexte cellulaire, les RCPGs semblent pouvoir mener à l'activation des MAPKs en employant des voies de signalisation d'une diversité surprenante (Azzi et al. 2003).

Cette thèse est principalement consacrée à l'étude de l'activation des MAPKs, en particulier des kinases régulés par des signaux extracellulaires 1 et 2 (ERK1/2), par les RCPGs. Utilisant surtout le récepteur V2 de la vasopressine (V2R) mais aussi le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ( $\beta_2$ AR) comme modèles, la régulation de l'activation d'ERK1/2 par ces récepteurs ainsi que les voies de signalisation impliquées ont été étudiées. De plus, la difficulté d'étudier de façon générale l'activation des RCPGs, dû à la grande diversité des



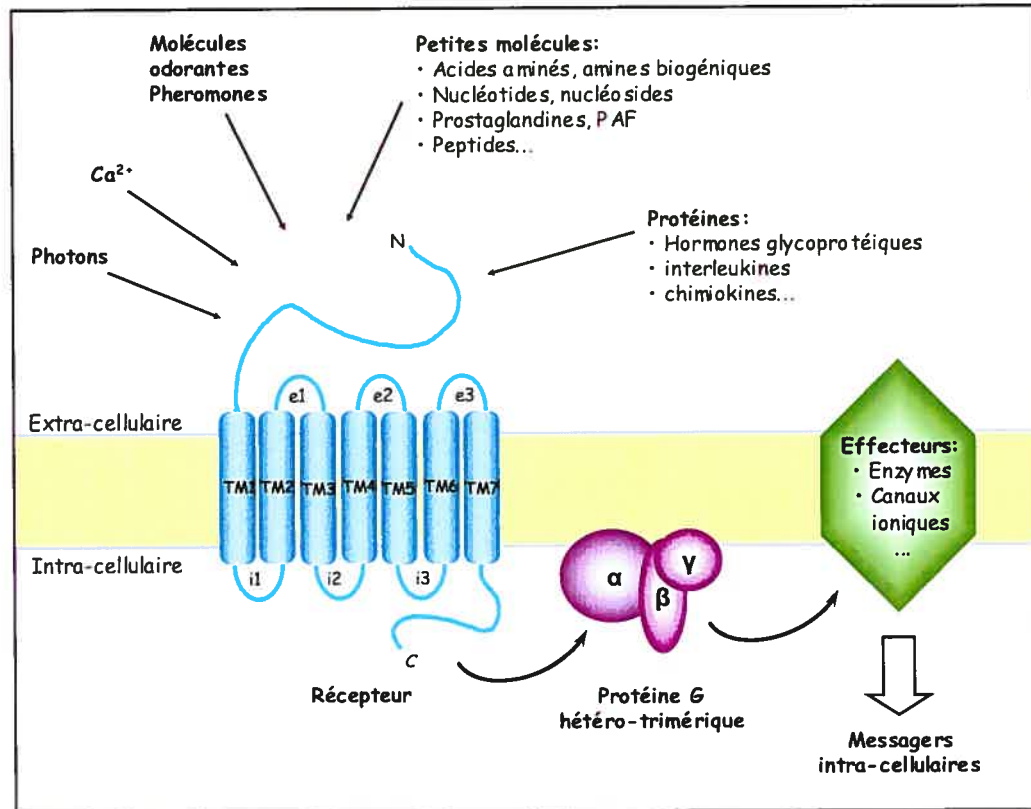
signaux intracellulaires engendrés par ces récepteurs, nous inspira l'invention d'un biosenseur basé sur la technique de transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET) permettant la détection de l'activité des RCPGs. Finalement, deux études sont également présentées dans cet ouvrage, en annexe : le développement d'un essai basé sur le BRET permettant d'étudier l'ubiquitination des protéines en temps réel dans les cellules vivantes; l'étude du mécanisme d'action de la chaperone pharmacologique SR121463 dans le repliement du V2R.

## ***1. INTRODUCTION***

### **1.1 Les récepteurs à sept passages trans-membranaires et leur interaction avec les protéines G hétéro-trimériques**

Comme mentionné en avant propos, les RCPGs représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires encodés par le génome humain. Les membres de cette famille incluent les récepteurs de plusieurs hormones, neurotransmetteurs, chimiokines et ion calcique, ainsi que les récepteurs sensoriels des photons et de molécules odorantes et du goût (Figure 1). Malgré la diversité des signaux reconnus, des études de modélisation ont révélées que tous les RCPGs analysés ont une structure générale similaire. Celle-ci consiste en une chaîne polypeptidique unique traversant sept fois la double couche lipidique de la membrane plasmique, sous la forme d'hélices  $\alpha$ , créant trois boucles extra-cellulaires (e1, e2, e3) et cytoplasmiques (i1, i2, i3) de longueurs variables avec l'extrémité amino (N)-terminale exposé à l'extérieur de la cellule et l'extrémité carboxyl (C)-terminale intracellulaire. C'est en référence à cette topologie que les RCPGs sont également appelés les récepteurs à sept domaines trans-membranaires. Aussi, cette appellation semble de plus en plus appropriée puisque plusieurs études ont mis en évidence des fonctions des RCPGs indépendantes de l'activation des protéines G hétéro-trimériques (Heuss and Gerber 2000; Brzostowski and Kimmel 2001). Celles-ci demeurent néanmoins leur partenaires privilégiés et semblent impliquées dans la majorité des événements de transduction du signal engendrés par les RCPGs.

La structure prédite des RCPGs fut récemment confirmée suite à la première cristallisation d'un de ces récepteurs, la rhodopsine bovine (Palczewski 2000) (Figure 2A). L'élucidation de la topologie de la rhodopsine nous révéla toutefois quelques surprises. Entre autres, la découverte de la présence d'une huitième hélice  $\alpha$  à la sortie du dernier domaine trans-membranaire, parallèle au plan de la membrane plasmique et limitée



**Figure 1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).**

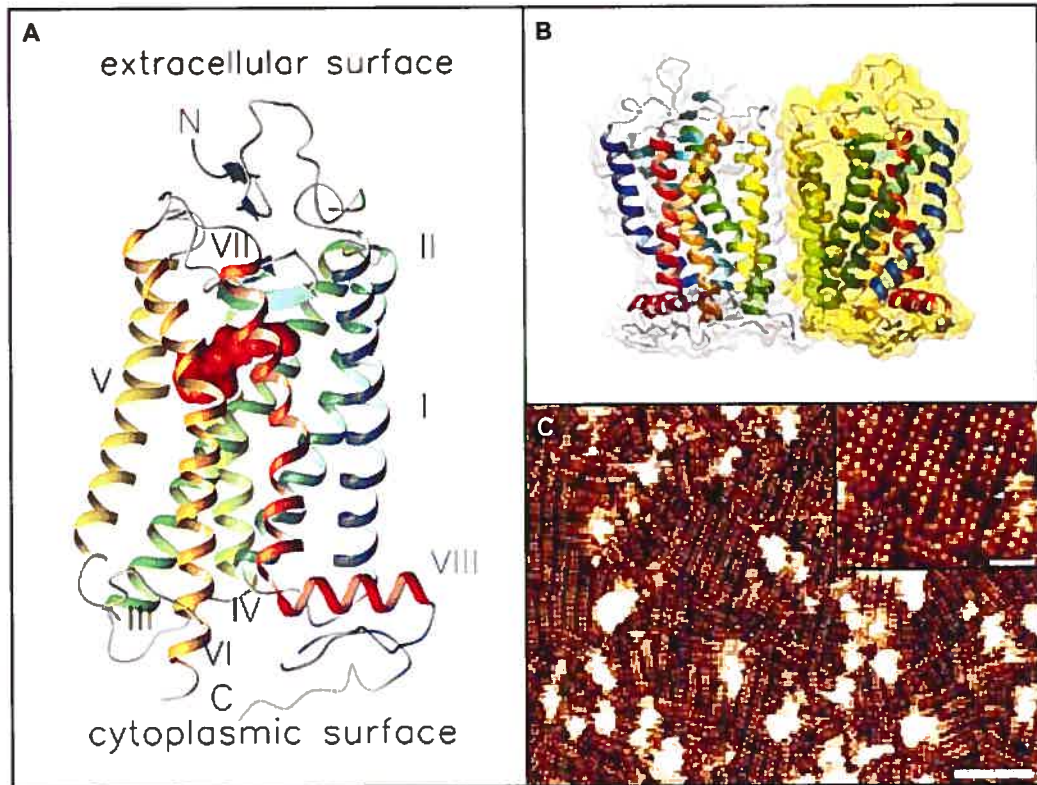
Adapté de (Bockaert and Pin 1999).

Représentation de l'unité signalétique de base des RCPGs, composée du récepteur à sept domaines trans-membranaires, de la protéine G hétéro-trimérique et de ses effecteurs cibles. Les différentes classes de molécules signal détectées par les RCPGs sont également représentées. Les domaines trans-membranaires du récepteur sont identifiés TM1 à TM7 et ses boucles intra- et extra-cellulaires sont identifiées i1, i2, i3 et e1, e2, e3 respectivement.

par les deux cystéines palmitylées (la palmytilation des RCPGs sera abordée en détail dans la section 1.6). Également, la présence de dimères de rhodopsine dans les cristaux (Figure 2B) vint appuyer multiples études biochimiques et biophysiques suggérant que les RCPGs existent sous forme de dimères ou d'oligomères (Angers et al. 2002). De plus, des études utilisant la microscopie à force atomique ont subséquemment permises l'observation de dimères de rhodopsines présents à la membrane des disques du segment externe des cellules photo-réceptrices en bâtonnet (Fotiadis et al. 2003) (2C).

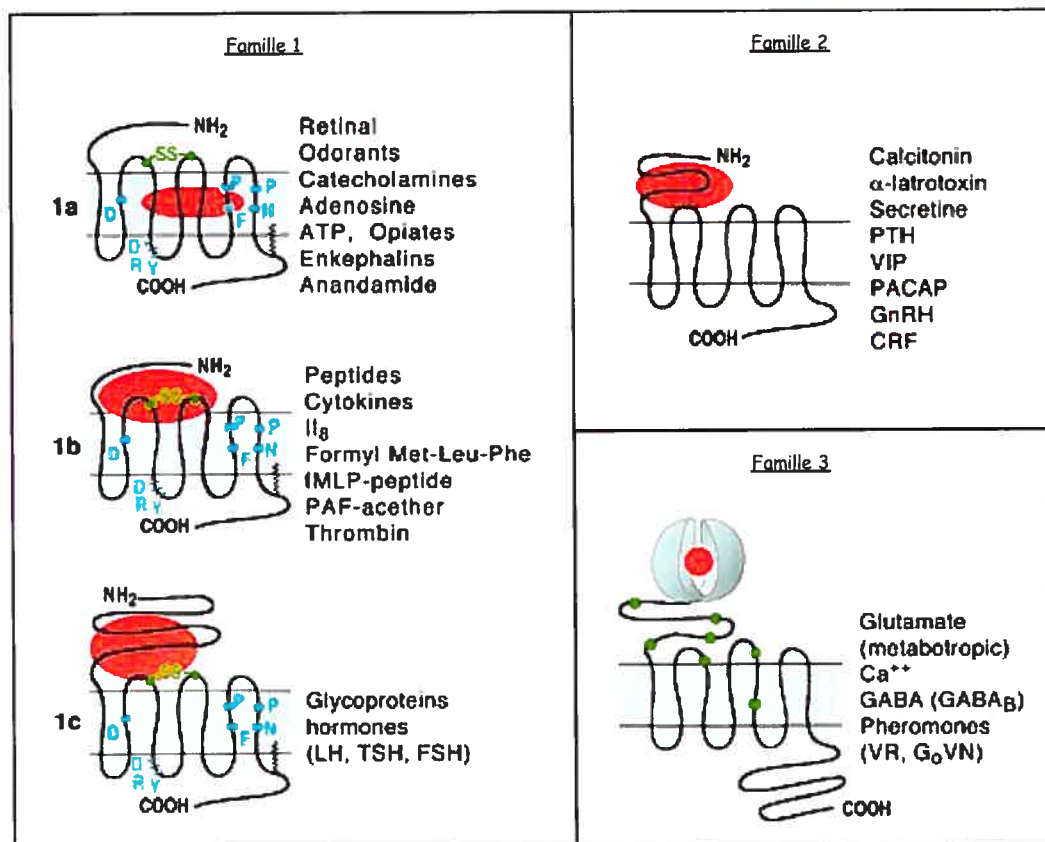
### 1.1.1 Classification des RCPGs

Les RCPGs sont divisés en huit familles en fonction de leur similarité de séquence, mais la majorité des récepteurs sont regroupés dans les familles 1 à 3 (Bockaert and Pin 1999) (Figure 3). La famille 1 regroupe le plus grand nombre de récepteurs, dont le  $\beta_2$ AR et le V2R, et est aussi appelé la famille de la rhodopsine. Les récepteurs de cette famille se caractérisent par la conservation d'un pont disulfure entre les boucles e2 et e3 ainsi que par un motif DRY dans la boucle i2 impliqué dans le processus d'activation de ces récepteurs et de leur couplage aux protéines G hétéro-trimériques. De plus, la modification post-traductionnelle résultant de l'addition d'un palmitate (acide gras à 16 carbones) sur un résidu cystéine du domaine C-terminal des RCPGs appartenant à cette famille semble également très conservée. Dû à la diversité des ligands et des sites de liaison des récepteurs de la famille 1, ceux-ci sont subdivisés en sous-familles 1a, 1b et 1c. Les récepteurs regroupés dans la famille 2, pour leur part, reconnaissent des peptides de poids moléculaires élevés, comme le glucagon et la calcitonine, et possèdent un grand domaine N-terminal riche en cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfures. Quant à la famille 3, elle regroupe des RCPGs caractérisés par la présence d'un énorme domaine N-terminal formant deux lobes impliqués dans la liaison du ligand, tels les récepteurs métabotropiques du glutamate et de l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique, les récepteurs aux phéromones de mammifères ainsi que les récepteurs gustatifs. Les familles 4 à 8 comportent les récepteurs des



**Figure 2. Structure et organisation de la rhodopsine.**

A) Représentation schématique de l'arrangement tridimensionnelle de la rhodopsine tirée de sa structure cristalline (Filipek et al. 2003). Les huit hélices  $\alpha$  sont identifiées de I à VIII. B) Modélisation du dimère de rhodopsine tel que cristallisé (Filipek et al. 2004). C) Topographie obtenue par microscopie à force atomique de la surface membranaire cytoplasmique de disques du segment externe des bâtonnets (Fotiadis et al. 2003). Échelle: 50 nm. *Encadré*, Agrandissement de la topographie en C, montrant les dimères de rhodopsine organisés en rangées ainsi que la présence de dimères isolés (ellipse pointillée) et quelques monomères (flèches). Échelle: 15 nm.



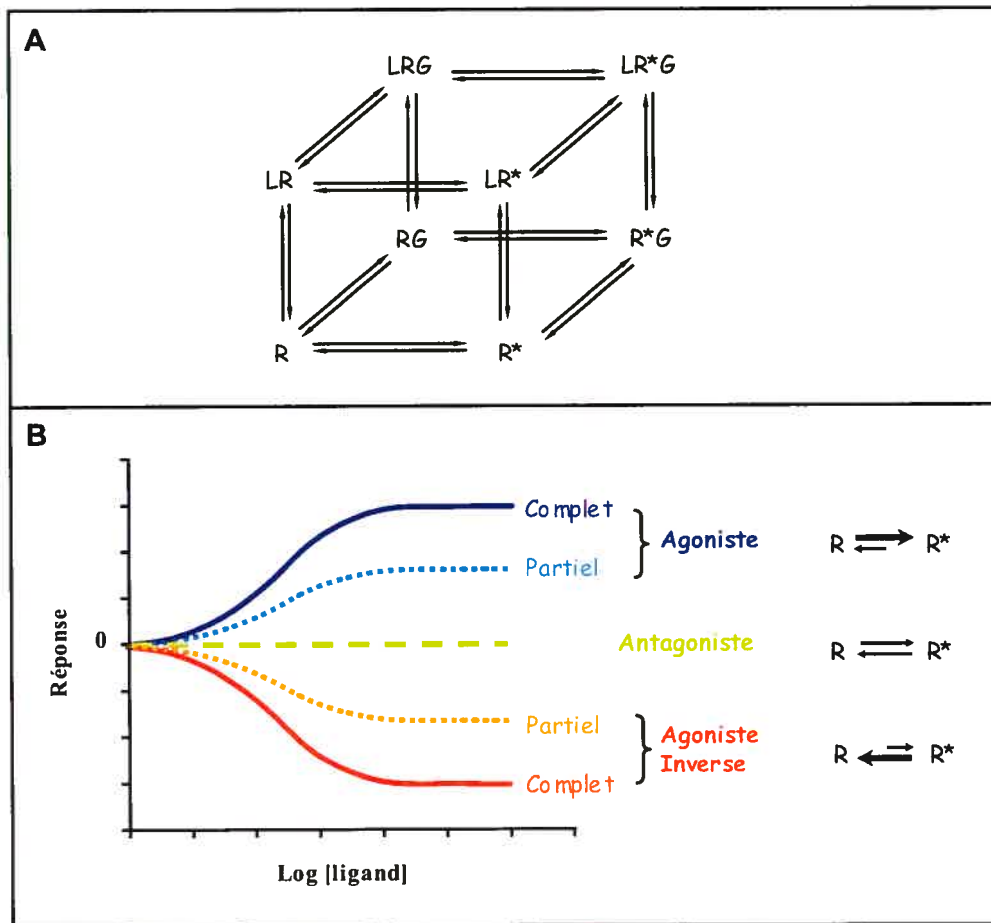
**Figure 3. Classification et diversité des RCPG.** (Bockaert and Pin 1999)

Les trois principales familles sont représentées ainsi que les sous-familles 1a, 1b et 1c. Les résidus d'acide aminé ainsi que les cystéines engagées dans des ponts disulfures conservés parmi la famille 1 sont identifiés en bleu et en vert respectivement, alors que les ligands et leur site de liaison sont représentés en orange. Abréviations: IL8: Interleukine 8; fMLP: N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine; PAF: Facteur activant les plaquettes; LH: Hormone lutéinisante; TSH: Hormone stimulatrice de la thyroïde; FSH: Hormone stimulatrice du follicule; PTH: Hormone parathyroïdienne; VIP: Peptide vasoactif intestinal; PACAP: Peptide activateur de l'adénylyl cyclase pituitaire; GnRH: Hormone de relâche des gonadotropines; CRF: Facteur de relâche des corticotropines; GABA: Acide  $\gamma$ -aminobutyrique; VR: Récepteur des phéromones voméronasal; G<sub>o</sub>VN: Récepteur des phéromones voméronasal couplé à G<sub>o</sub>.

phéromones, frizzled et smoothed impliqués dans le développement, de l'AMP cyclique (AMPC) chez l'amibe *Dictyostelium*, du goût acide T2R chez les vertébrés, et les récepteurs olfactifs de la drosophile respectivement (Bockaert et al. 2002).

### 1.1.2 Activité des RCPGs

L'unité signalétique de base des RCPGs est définie de manière classique comme un récepteur, une protéine G hétéro-trimérique et un effecteur dont la mesure de l'activité est utilisée pour étudier l'état d'activation des récepteurs. La découverte que plusieurs récepteurs sauvages ou mutants peuvent être activés en absence de ligand (activité constitutive) mena à l'élaboration de la théorie de récepteur comme on la connaît aujourd'hui, stipulant que les récepteurs existent sous différentes conformations interchangeables, différemment stabilisées par des ligands spécifiques et interactions protéine-protéine. Ainsi, on assista à l'élaboration successive de la version étendue (ETC) (Samama et al. 1993) puis cubique (CTC) (Weiss et al. 1996) du modèle de complexe ternaire où le récepteur est cru en équilibre entre une conformation active ( $R^*$ ) et inactive ( $R$ ), et la protéine G est considérée comme stabilisant la conformation active ( $R^*G$ ; Figure 4A). Dans ce cadre, les ligands sont classés selon leur efficacité à induire l'activation du récepteur (Kenakin 2002). Ainsi, un ligand d'efficacité positive est défini comme un agoniste, un ligand ne produisant aucun effet est un antagoniste neutre avec une efficacité de zéro et un ligand ayant une efficacité négative, réduisant l'activité de base de l'effecteur, est appelé agoniste inverse (Figure 4B) (Kenakin 2004). Selon ce modèle à deux états, les conformations  $R$  et  $R^*$  coexistent en condition basale et sont différemment reconnues par des ligands d'efficacités distinctes. Par conséquent, il fut suggéré que les conformations  $R^*$  sont préférentiellement liées et stabilisées par les agonistes, menant à l'activation de la protéine G hétéro-trimérique, alors que les conformations  $R$  sont mieux



**Figure 4. Pharmacologie des RCPGs.**

**A)** Modèle cubique du complexe ternaire. Ce modèle suggère que le récepteur dans son état inactif peut aussi former un complexe avec la protéine G qui ne signale pas (RG).

**B)** Schéma illustrant la classification des ligands basée sur leur efficacité à induire une réponse pharmacologique. Abréviations: R, récepteur inactif; R\*, récepteur actif; L, ligand; G, protéine G hétéro-trimérique.



reconnues par les agonistes inverses, menant au découplage fonctionnel du récepteur (réduction de son activité basale et de sa signalisation spontanée via les protéines G hétéro-trimériques). Les antagonistes neutres pour leur part ne différencient pas les divers états de récepteurs.

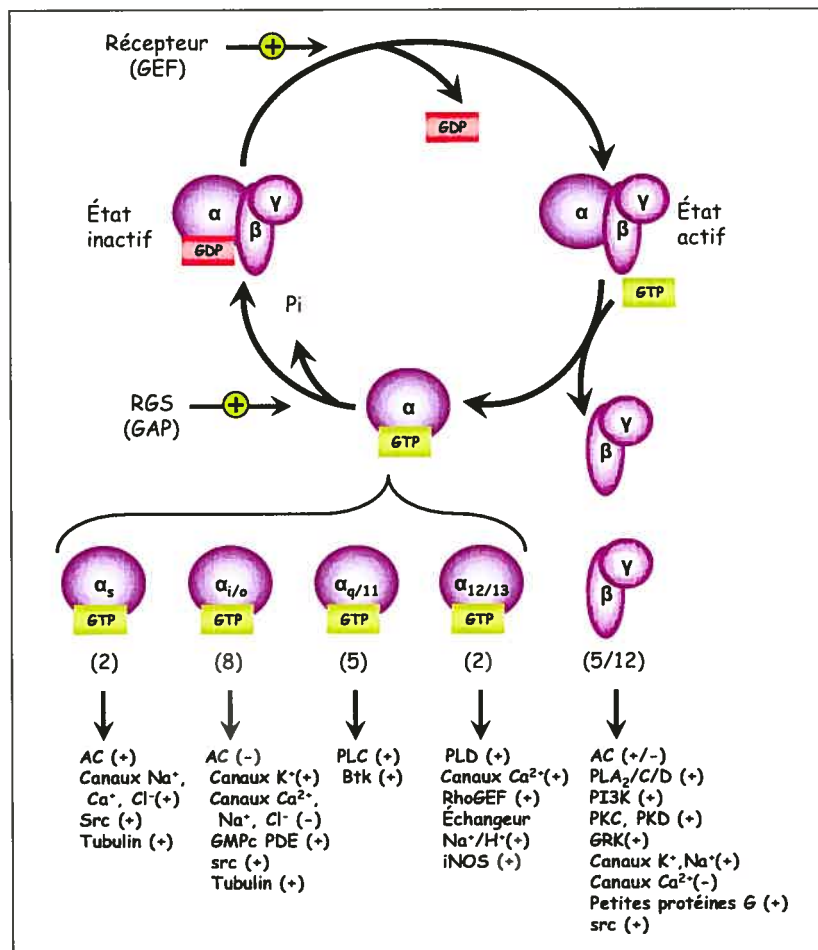
Un tel modèle à deux états semble adéquat du point de vue des formes non liées de récepteur mais clairement incorrect lorsqu'un ligand est introduit dans le système (Kenakin 2002). En effet, un nombre grandissant d'études suggèrent qu'avec la liaison d'un ligand, le récepteur peut adopter une nouvelle affinité pour la protéine G hétéro-trimérique, différente de celle de l'état actif non lié et ainsi, il peut devenir une espèce protéique totalement différente. De plus, d'autres études suggèrent que chacun des différents états de récepteurs peuvent exister sous multiples conformations pour lesquelles les ligands possèdent différentes affinités et induisent différentes conformations actives selon leur nature. Ceci a entre autres été suggéré par l'étude de couplages récepteur-protéine G multiples, où soit différentes mutations soit différents ligands induisent un couplage à un jeu différent de protéines G hétéro-trimériques (Kenakin 1997). Aussi, alors que l'efficacité du ligand a été originalement définie en terme de réponse pharmacologique, le concept peut être étendue à une variété d'autres comportements des RCPGs, incluant leurs interactions pléiotropes avec multiples protéines G hétéro-trimériques, leur oligomérisation, internalisation, désensibilisation, ainsi que leur interaction avec d'autres protéines auxiliaires. Ainsi, il peut y avoir de nombreux types d'efficacité du ligand, et différents ligands peuvent avoir un éventail d'efficacité associées aux différents comportements des récepteurs.

Enfin, malgré le nombre grandissant d'études démontrant la diversité des mécanismes de signalisation empruntés par les RCPGs, la définition d'efficacité du ligand en terme de réponse pharmacologique demeure toutefois liée à un schéma considérant uniquement la régulation de la signalisation classique via les protéines G hétéro-trimériques. Comme nous le verrons plus loin, ce paradigme est alors remis en question lorsque les réponses aux ligands sont générées par la formation de complexes métastables impliquant

des protéines d'échafaudage (Hall and Lefkowitz 2002). Entre autres, ce type de complexe est souvent impliqué dans des voies de signalisation menant à l'activation des MAPKs par les RCPGs, formés de protéines accessoires comme la  $\beta$ arrestine et ASK1 ainsi que de molécules effectrices comme c-Src, Ras, Raf, MAPK kinase 4, ERK1/2, et les kinases de la famille Janus (JNK) (Luttrell 2003). Les différents mécanismes d'activation des MAPKs par les RCPGs, dépendants ou indépendants des protéines G hétéro-trimériques, seront décrits plus en détail dans la section 1.5.

## **1.2 Les protéines G hétéro-trimériques**

Les protéines G couplées aux RCPGs sont dites hétéro-trimériques car elles sont composées de trois sous-unité protéiques :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . On les distingue des petites protéines G qui sont monomériques et ressemblent aux sous-unités  $G\alpha$  des protéines G hétéro-trimériques. À l'état non stimulé, la sous-unité  $G\alpha$  est liée au GDP, et la protéine G hétéro-trimérique est inactive (Figure 5) (Cabrera-Vera et al. 2003). L'activation du récepteur par un agoniste entraîne alors l'activation de la protéine G, agissant comme un facteur d'échange du GDP (GEF), en amenant la sous-unité  $G\alpha$  à éjecter son GDP lié et à le remplacer par du GTP, pour lequel sa conformation active a beaucoup plus d'affinité. Cette activation mène à la dissociation de la protéine G hétéro-trimérique en une sous-unité  $G\alpha$  active liée au GTP d'une part, et un dimère  $G\beta\gamma$  d'une autre, où tous deux sont alors libres d'interagir et d'activer leurs effecteurs cibles (enzymes ou canaux ioniques). La période d'activation est régit par la sous-unité  $G\alpha$  qui, possédant une activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP (GTPase), hydrolyse au bout d'un certain temps le GTP en GDP; la sous-unité  $G\alpha$  inactive se réassocie alors au dimère  $G\beta\gamma$ , pour lequel elle a beaucoup d'affinité lorsque liée au GDP. La transmission du signal est alors interrompue et la protéine G hétéro-trimérique, de retour à son état initial, peut de nouveau entrer dans un cycle d'activation/inactivation



**Figure 5. Les protéines G hétéro-trimériques.**

Schéma illustrant le cycle d'activation/inactivation des protéines G hétéro-trimériques, ainsi que les différentes classes de sous-unités et leurs multiples effecteurs. Le nombre de sous-unités différentes formant chaque classe est indiqué entre parenthèses. Abréviations: AC: adénylyl cyclase; PDE: phosphodiesterase; PLC et PLD: phospholipase C et D; RhoGEF: facteur d'échange du GDP pour Rho; iNOS: synthase d'oxyde nitrique inductible; PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase; PKC et PKD: protéine kinase C et D; GRK: kinase des RCPCG.

menant à l'amplification du signal. De plus, ceci est accéléré par l'action des régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS) qui sont en fait des protéines activatrices de la GTPase (GAP), catalysant l'hydrolyse du GTP par la sous-unité  $G\alpha$  (Neubig and Siderovski 2002). Bien que ce modèle de dissociation-réassociation des sous-unités de la protéine G soit devenu un dogme, des études portent à croire que celui-ci pourrait être remis en question. Des études suggèrent en effet que plusieurs récepteurs, protéine G hétéro-trimériques ainsi que leurs effecteurs forment un grand complexe préformé et que l'activation du système n'est qu'une suite de changements conformationnels (Lachance et al. 1999; Rebois and Hebert 2003).

Les protéines G hétéro-trimériques sont essentiellement localisées à la membrane, tenues en place par des modifications post-traductionnelles lipidiques (Milligan and Grassie 1997). En effet, les sous-unités  $G\alpha$  peuvent être myristylées (ajout d'un acide gras à 14 carbones sur un résidu glycine) et/ou palmylées (ajout d'un acide gras à 16 carbones sur un résidu cystéines) à leur extrémité N-terminal, et la sous-unité  $G\gamma$  en complexe avec  $G\beta$  est isoprénylée (ajout d'un acide gras à 15 carbones : isoprène farnésyl; 20 carbones : isoprène géranylgeranyl) sur un résidu cystéine en son extrémité C-terminale. Une fonction évidente de l'acylation des protéines est de leur servir d'ancrage hydrophobe à la membrane, mais ces modifications lipidiques semblent également pouvoir réguler les interactions protéine-protéine (Quanbar and Bouvier 2003). Entre autres, des études ont démontrées que la palmylation de  $G\alpha_s$  augmente son affinité pour  $G\beta\gamma$  (Iiri et al. 1996) tandis que la palmylation de  $G\alpha_z$  inhibe son interaction avec la protéine RGS GzGAP (Tu et al. 1997). Étant réversible, la palmylation des protéines G hétéro-trimériques peut représenter un mécanisme de régulation de leur fonction et ainsi, influencer leur capacité à servir de molécule de signalisation. D'ailleurs, pour plusieurs protéines, l'activation des RCPGs semble accompagnée par un changement d'état de palmylation. Ces protéines incluent certains RCPGs ainsi que la synthase d'oxyde nitrique et les sous-unités  $G\alpha$  des protéines G hétéro-trimériques (Quanbar and Bouvier 2003). Pour  $G\alpha_s$ , la perte d'acide palmitique suite à l'activation du récepteur est accompagnée par le départ de cette protéine de la membrane.

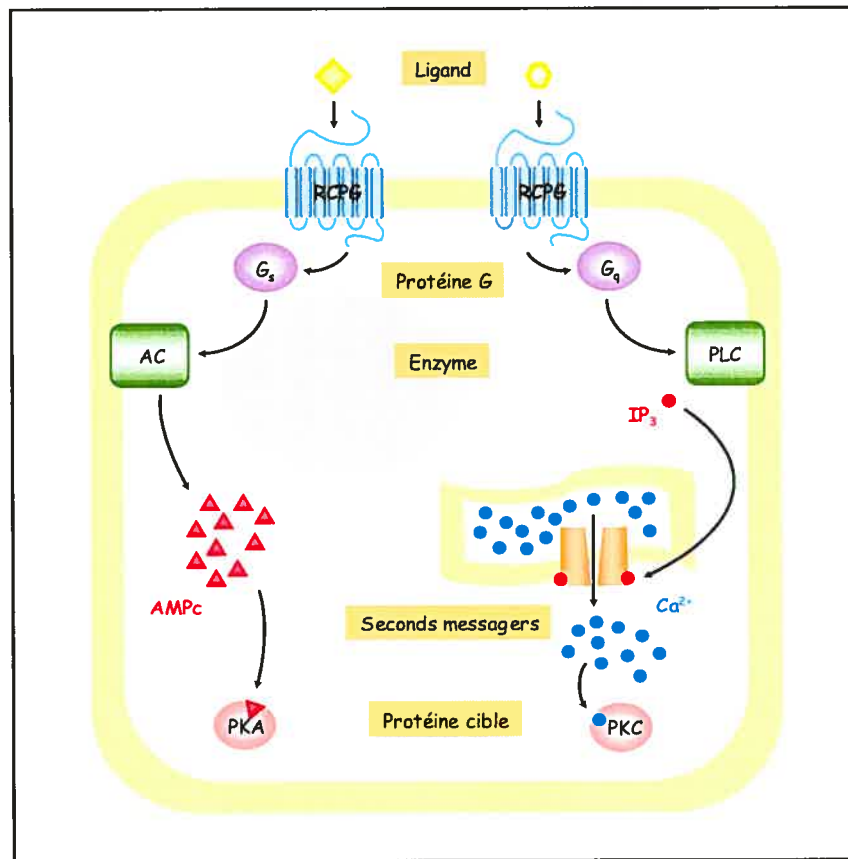
### 1.2.1 Classification des protéines G hétéro-trimériques

La complexité et la diversité des signaux intracellulaires activés par les RCPGs repose en partie sur la variété d'espèces moléculaires des sous-unités des protéines G hétéro-trimériques. En effet, 17 sous-unités  $G\alpha$  différentes ont été identifiées ainsi que 5 sous-unités  $G\beta$  et 12 sous-unités  $G\gamma$ . Le type de protéine G hétéro-trimérique couplée à un récepteur est identifié par le sous-type de sous-unités  $G\alpha$  impliquées. Celles-ci sont classées en 4 familles selon leurs similarités de séquence :  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_{12}$  (Hermans 2003; Hur and Kim 2002). Comme résumé à la Figure 5, une variété d'effecteurs intra-cellulaires et membranaires des protéines G hétéro-trimériques a été identifiée, et plusieurs d'entre eux représentent une cible pour diverses sous-unités et sous-types différents. Même si toutes les combinaisons de sous-unités n'existent pas nécessairement dans la nature, le nombre théorique d'assemblage des protéines G hétéro-trimériques est particulièrement grand et contribué évidemment à la diversité et à la sélectivité des signaux intracellulaires activés par les RCPGs. En effet, plusieurs niveaux de spécificité des protéines G hétéro-trimériques ont été décrits (Albert and Robillard 2002; Cabrera-Vera et al. 2003). Le premier implique l'interaction protéine G-récepteur. En général  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_{12}$  reconnaissent différentes familles de récepteurs, même si certains récepteurs peuvent interagir avec des sous-unités de classes différentes. Aussi, les récepteurs semblent préférer certaines combinaisons d'hétéro-trimères suggérant qu'une sous-unité seule ne détermine pas la spécificité du couplage. Finalement, des récepteurs très apparentés peuvent lier plusieurs et différents domaines des sous-unités des protéines G hétéro-trimériques pour un couplage sélectif (Slessareva et al. 2003). Dans la section qui suit, un second niveau de spécificité des protéines G hétéro-trimériques sera abordé, qui implique leur interaction avec leurs effecteurs.

### 1.2.2 Les effecteurs cibles des protéines G hétéro-trimériques

Comparé à la variété de récepteurs et de protéines G hétéro-trimériques, un jeu relativement limité d'effecteurs représente la cible de celles-ci (Figure 5). Les effecteurs classiques des protéines G hétéro-trimériques sont soit des canaux ioniques, soit des enzymes liés à la membrane comme les adénylyl cyclases et phospholipases (Hall et al. 1999). En agissant sur ces enzymes, les protéines G hétéro-trimériques contrôlent ainsi la production de seconds messagers intra-cellulaires (Figure 6).

Deux principaux types de **canaux ioniques** sont la cible de protéines G hétéro-trimériques, plus particulièrement de certains complexes  $G\beta\gamma$ , des canaux  $K^+$  et des canaux  $Ca^{2+}$  (Dascal 2001). De plus, le complexe  $G\beta\gamma$  activé exerce des effets opposés selon le type de canal ionique : il induit l'ouverture des canaux  $K^+$  alors qu'il mène à la fermeture des canaux  $Ca^{2+}$ . L'**adénylyl cyclase**, pour sa part, voit son activité modulée par plusieurs protéines G différentes (Taussig and Zimmermann 1998). Ainsi, les sous-unités  $G\alpha_s$  stimulent l'activité de l'adénylyl cyclase, tandis que les sous-unités  $G\alpha_i$  l'inhibent. Même certains complexes  $G\beta\gamma$  ont pour cible l'adénylyl cyclase, ayant soit un effet activateur ou inhibiteur selon le sous-type d'enzyme impliqué. En affectant l'activité de l'adénylyl cyclase, les protéines G modifient ainsi la concentration intra-cellulaire du second messager qu'est l'AMPc, synthétisé par l'adénylyl cyclase à partir de l'ATP. L'AMPc exerce principalement ses effets en activant la protéine kinase dépendante de l'AMPc, ou protéine kinase A (PKA), qui module à son tour l'activité de multiples protéines cytoplasmiques et facteurs de transcriptions en les phosphorylant sur des résidus sérines et thréonines.



**Figure 6. Les deux principaux systèmes de génération de seconds messagers activés par les protéines G hétéro-trimériques.**

Dans chacun des cas, la liaison d'un ligand induit la liaison du récepteur avec une protéine G qui active (ou inactive) un enzyme membranaire. Dans la voie de l'AMPC, l'enzyme produit directement l'AMPC. Dans la voie du Ca<sup>2+</sup>, l'enzyme produit un médiateur soluble (IP<sub>3</sub>) qui induit la relâche de Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique. Tous deux, l'AMPC et le Ca<sup>2+</sup>, transmettent le signal agissant en effecteurs allostériques: ils se lient à des protéines cellulaires spécifiques, modifiant leur conformation et ainsi leur activité. Abréviations: AC: adénylyl cyclase; PLC: phospholipase C; IP<sub>3</sub>: inositol-1,4,5-triphosphate; PKA et PKC: protéines kinases A et C.

En ce qui concerne les **phospholipases**, alors que certaines peuvent être activées par des complexes  $G\beta\gamma$ , la phospholipase C (PLC) est classiquement activée par les sous-unités  $G\alpha_q$  mais aussi parfois par  $G\alpha_o$  (Knall and Johnson 1998). La PLC génère deux seconds messagers différents produits de l'hydrolyse du phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate, l'inositol-1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) et le diacylglycérol (DAG). L' $IP_3$  induit ensuite la libération de  $Ca^{2+}$  intracellulaire en agissant sur les canaux calciques du réticulum endoplasmique, alors que le DAG participe à l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui a aussi besoin de lier le  $Ca^{2+}$  pour devenir active. De façon similaire à la PKA, la PKC modifie alors la fonction de protéines par phosphorylation de ses multiples substrats. Pour sa part, une autre phospholipase, la PLD, peut être stimulée par les complexes  $G\beta\gamma$  et leur sous-unité  $G\alpha_{12}$  associée (Ushio-Fukai et al 1999). De façon différente de la PLC, la PLD hydrolyse plutôt la phosphatidylcholine, menant à la production d'acide phosphatidique et la génération subséquente de DAG par des phosphohydrolases spécifiques (Billah 1993). Comme mentionné plus haut, le DAG peut ensuite participer à l'activation de PKC, mais représente également une source d'acide arachidonique, produit cette fois par un autre type de phospholipase, la  $PLA_2$  (Bonventre 1992). Celle-ci, qui catalyse l'hydrolyse de phospholipides en acide arachidonique, semble également pouvoir être régulée directement par les protéines G hétéro-trimériques. Bien que ceci soit moins documenté, la  $PLA_2$  semble pouvoir être activée par les sous-unités  $G\beta\gamma$  ainsi que  $G\alpha_{12/13}$  (Jelsema and Axelrod 1987; Bockaert and Pin 1998). L'acide arachidonique produit par la  $PLA_2$  est ensuite métabolisé par différentes oxygénases dans les tissus rénaux et vasculaires (Bonventre 1992).

Les systèmes de génération de seconds messagers mentionnés ci-haut sont sans contredit les effecteurs cibles des protéines G hétéro-trimériques les mieux décrits. Toutefois, même si les mécanismes menant à leur activation ne sont pas toujours tout à fait élucidés, plusieurs **autres effecteurs** tiennent une place importante dans les réponses cellulaires engendrées par l'activation de ces protéines G (Cabrera-Vera 2003). Entre autres, les complexes  $G\beta\gamma$  ont également pour cible des kinases comprenant la kinase des RCPG de type 2 (GRK2), la phosphatidylinositol-3-kinase ( $PI_3K$ ) et la protéine tyrosine kinase c-Src,



ainsi que différentes protéines à motif répétitif WD40 comme le récepteur activé par la kinase C 1 (RACK1) (Chen et al. 2004). Les sous-unités  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_i$ , qui peuvent également activer c-Src, stimulent aussi l'activité GTPasique de la tubuline (Roychowdhury et al. 1999). De plus, les sous-unités  $G\alpha_{12-13}$  régulent l'activité des petites protéines G Ras et Rho en agissant sur leur GAP et GEF respective (Kurose 2003). Et les transducines ( $G\alpha_t$ , membres de la famille  $G\alpha_{i/o}$ ) couplés aux récepteurs visuels, pour leur part, activent une phosphodiesterase (PDE) menant à la production du second messager GMPc.

### **1.3 Adaptation-Atténuation du signal**

Une particularité importante des systèmes de signalisation par les protéines G hétéro-trimériques est que ceux-ci ne sont pas constants, mais démontrent une mémoire de l'activation précédente. Ainsi, la forte stimulation d'un récepteur mène à une diminution de sa capacité à être stimulé ultérieurement (désensibilisation), alors qu'une faible activation peut mener à une aptitude plus grande à être stimulé (sensibilisation). Une telle adaptation permet au système de rester sensible aux modifications d'intensité du signal dans un large éventail de niveaux de stimulation de base. Dans le système visuel par exemple, ceci permet à la rhodopsine de s'ajuster autant à la lumière qu'à la noirceur très rapidement.

L'aptitude des RCPGs à transmettre les signaux est principalement régulée au niveau du récepteur lui-même de deux façons: en régulant l'efficacité de signalisation des récepteurs et en contrôlant le nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire soit par endocytose, à court terme, ou dégradation, à long terme. En particulier, l'atténuation du signal représente un mécanisme rétroactif important qui protège contre la sur-stimulation chronique ou aiguë (Gainetdinov et al. 2004).

### 1.3.1 Désensibilisation du signal

Afin de pouvoir répondre rapidement aux changements de concentrations d'agonistes, les récepteurs activés doivent être inactivés puis re-sensibilisés pour une prochaine stimulation. Ainsi, très rapidement après à leur exposition aux agonistes, les RCPGs présents à la membrane plasmique ne répondent presque plus au signal. Ce processus, appelé désensibilisation, est la conséquence de mécanismes moléculaires menant au découplage fonctionnel des récepteurs, qui n'ont plus la capacité d'activer les protéines G hétéro-trimériques (Ferguson 2001). Le moyen le plus rapide par lequel les RCPGs sont découplés de leur protéine G associée est par la modification covalente des récepteurs, consistant en leur phosphorylation par des protéines kinases intra-cellulaires. À elle seule, la phosphorylation des RCPGs au niveau de leurs boucles intra-cellulaires et domaine C-terminal semble réduire la capacité des récepteurs à interagir avec les protéines G hétéro-trimériques par inhibition stérique.

#### *1.3.1.1 Désensibilisation hétérologue*

La désensibilisation hétérologue consiste en une désensibilisation des RCPGs indépendante de leur activation. Le mécanisme le plus commun de désensibilisation hétérologue consiste en la régulation rétroactive des récepteurs par les protéines kinases dépendantes des seconds messagers, car celles-ci ne phosphorylent pas seulement les récepteurs activés mais aussi les récepteurs qui n'ont même pas été exposés aux agonistes (Bohm 1997). Les protéines kinases dépendantes des seconds messagers, PKA et PKC, phosphorylent leurs cibles sur des résidus sérines et thréonines compris dans une séquence consensus d'acides aminés spécifiques (PKA : R/K-R/x-x-S/T; PKC : S/T-x-K/R), retrouvés, entre autres, chez plusieurs RCPGs. Par exemple, le  $\beta_2$ AR activé stimule Gs qui stimule à son tour l'adénylyl cyclase et la production d'AMPc, menant ainsi à l'activation de PKA. Cette dernière peut alors phosphoryler les  $\beta_2$ ARs stimulés eux-mêmes ainsi que les

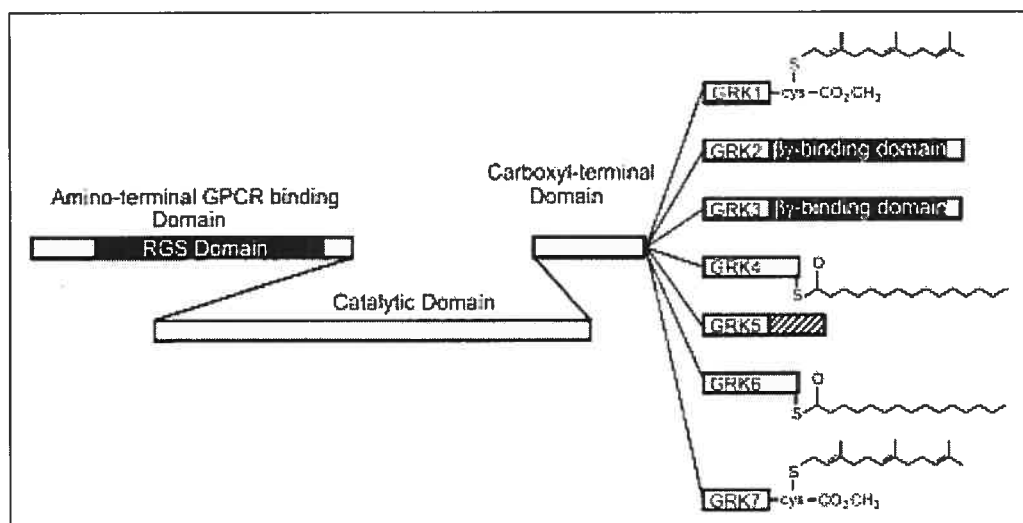
récepteurs qui n'ont pas été activés par la présente stimulation. Même une PKA activée suite à une stimulation totalement distincte du type de récepteur peut phosphoryler et modifier la sensibilité du  $\beta_2$ AR. De façon similaire, la régulation de divers types de récepteurs se produit pour des RCPGs activant PKA, PKC, des MAPKs, et plusieurs autres kinases. Dans la même veine, les kinases dépendantes des seconds messagers peuvent phosphoryler et réguler les effecteurs des protéines G hétéro-trimériques, comme l'adénylyl cyclase, PLC, et autres, contribuant ainsi à la sensibilité de la cellule à des stimulations simultanées ou subséquentes (Hamm and Gilchrist 1996).

#### *1.3.1.2 Désensibilisation homologue*

La désensibilisation homologue c'est une désensibilisation dépendante de l'activation des récepteurs, où l'état actif des RCPGs est spécifiquement reconnu et phosphorylé par les GRKs suivi par la liaison d'un membre d'une autre famille de protéines, les arrestines (Krupnick and Benovic 1998). Les GRKs peuvent différencier les états inactifs des récepteurs de ceux activés par les agonistes, en partie, parce qu'elles sont elles-mêmes activées par les récepteurs stimulés. La régulation des récepteurs par les GRKs résulte alors en une désensibilisation homologue.

Les **GRKs** sont des sérines/thréonines kinases apparentées aux PKA et PKC. Cependant, contrairement à ces kinases, les GRKs ne démontrent aucune spécificité de séquence pour leur substrat, même si la phosphorylation des RCPGs par celles-ci semble survenir au niveau de résidus spécifiques du domaine C-terminal ou de la i3 de plusieurs récepteurs (Pitcher et al. 1998). Il y a 7 sous-types de GRKs connus, classés en 3 familles selon leur similarité de séquence et de fonction: (a) GRK1 (GRK1, ou kinase de la rhodopsine, et GRK7), (b) GRK2, ou kinase du récepteur  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ ARK) (GRK2 et GRK3), et (c) GRK4 (GRK4, GRK5 et GRK6). La famille GRK1 est principalement visuelle tandis que GRK4 est essentiellement exprimée dans les testicules. Ainsi, quatre sous-types (GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6) se partagent la tâche de réguler la majorité des

RCPGs de l'organisme. Toutes les GRKs possèdent une structure similaire, comprenant un domaine N-terminal de type RGS, un domaine central protéine kinase, et une extrémité C-terminale variable (Figure 7) (Penela et al. 2003). Parmi la sous-famille GRK2, le domaine N-terminal de type RGS lie la sous-unité  $G\alpha_q$  mais ne facilite pas l'hydrolyse du GTP. Ainsi, GRK2 n'agit pas comme une GAP mais comme un amortisseur de la signalisation en prévenant la sous-unité  $G\alpha_q$  active de lier d'autres effecteurs, étant possiblement elle-même un effecteur de  $G\alpha_q$  (Pitcher et al. 1998). Les autres sous-familles de GRK, même si elles partagent un domaine de type RGS similaire, ne semblent pas lier la sous-unité  $G\alpha_q$  ni d'autres sous-unités  $G\alpha$ .



**Figure 7. Les GRKs.** (Ferguson 2001)

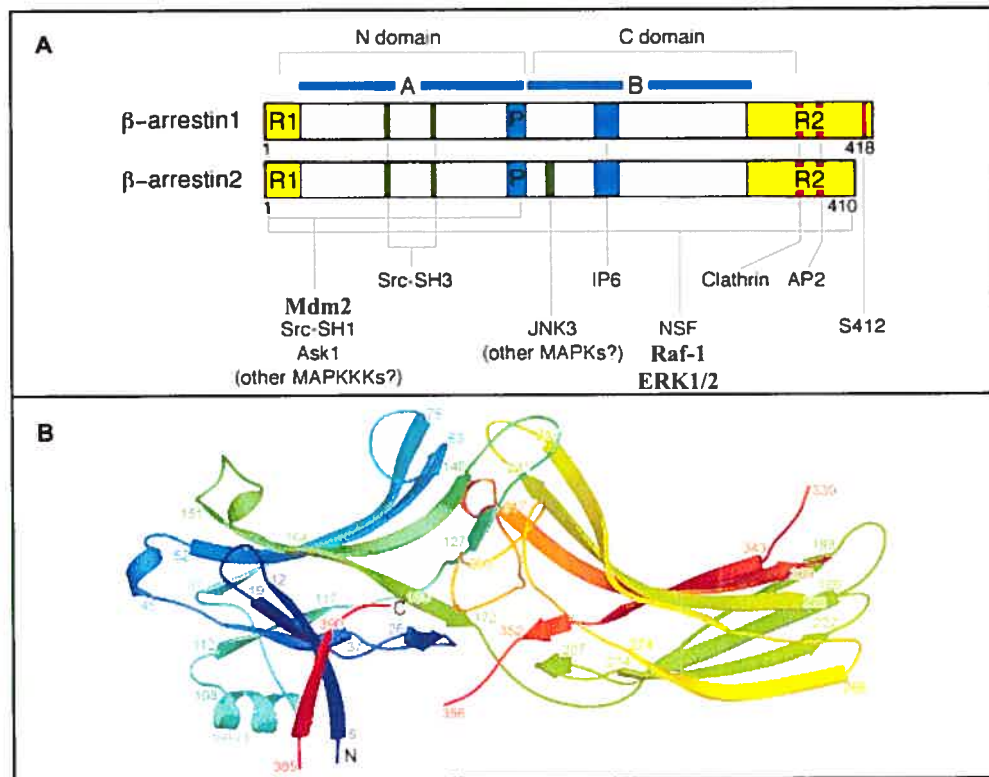
Représentation schématique de l'architecture des GRK1-GRK7. La bifurcation dans le domaine C-terminal représente la divergence de séquence entre les différentes GRKs, où GRK1 et GRK7 sont farnésylées, GRK2 et GRK3 contiennent des domaines de liaison à  $G\beta\gamma$ , GRK4 et GRK6 sont palmitylées, et GRK5 contient un domaine basique de liaison aux phospholipides.

Le domaine C-terminal des GRKs représente le site de plusieurs modifications post-traductionnelles et interactions protéine-protéine régulatrices. Entre autres, ce domaine apparaît impliqué dans le ciblage des enzymes à la membrane ainsi qu'aux récepteurs (Krupnick and Benovic 1998). En effet, GRK1 est farnésilée en C-terminal tandis que GRK4 et GRK6 sont palmylées, et GRK5 lie les phospholipides de la membrane via un domaine poly-basiques, également en C-terminal (Figure 7). Dans la sous-famille GRK2, le domaine C-terminal des kinases est prolongé et contient un domaine d'homologie à la plectrine (PH). Le domaine PH de GRK2 lie les phospholipides et les sous-unités G $\beta$  libérées suite à l'activation des protéines G hétéro-trimériques par les RCPGs, ce qui contribue à l'activation des kinases et à leur ciblage à la membrane plasmique. Ainsi, l'activité des GRKs, tout comme leur localisation cellulaire, est étroitement régulée par des interactions avec les lipides et protéines d'ancrage, de même qu'avec les récepteurs et les sous-unités des protéines G hétéro-trimériques. De plus, il a récemment été démontré que la phosphorylation des GRKs par plusieurs autres kinases, notamment PKA et PKC, module également leur fonction, mettant en évidence de nouveaux mécanismes rétroactifs liant différentes voies de signalisation à la régulation des RCPGs (Penela et al. 2003).

La désensibilisation homologue des RCPGs via leur phosphorylation par les GRKs est maintenant un paradigme bien établi. Toutefois, comme mentionné plus haut, les GRKs possèdent plusieurs domaines d'interactions protéine-protéine et semblent, de plus, pouvoir contribuer à la désensibilisation des récepteurs par des mécanismes n'impliquant pas leur activité kinase (Pao and Benovic 2002). Par exemple, la désensibilisation du récepteur de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique de type B (GABA<sub>B</sub>) semble être effectuée par GRK4, mais n'implique pas la phosphorylation du récepteur par celle-ci (Perroy et al. 2003). Néanmoins, la phosphorylation des RCPGs par les GRKs demeure le mécanisme de désensibilisation homologue le plus répandu.

Comme mentionné plus haut, une fois phosphorylé par une GRK, le récepteur activé est lié par un membre d'une autre famille de protéines, les **arrestines**. Celles-ci reconnaissent les récepteurs phosphorylés par les GRKs ainsi que la conformation active de ceux-ci de sorte que, ensemble, ces interactions mènent à une association robuste des arrestines avec les RCPGs (Gurevich and Gurevich 2004). Les arrestines contribuent à la désensibilisation des RCPGs en s'interposant physiquement entre les récepteurs activés et les protéines G hétéro-trimériques, empêchant ainsi d'autres stimulations des protéines G. Il y a 4 arrestines de mammifères : deux sont exprimées exclusivement dans les cellules visuelles, et les deux autres, appelées  $\beta$ arrestine 1 et 2 (ou arrestine 2 et 3), sont ubiquitaires. Ainsi, seulement deux arrestines se partagent la régulation de la vaste majorité des RCPGs. Les  $\beta$ arrestines possèdent une séquence en acides aminés très similaire et sont composées de deux domaines structuraux majeurs, domaine N-terminal et domaine C-terminal, chacun composé de sept feuillets  $\beta$ , séparés par un domaine de reconnaissance des phosphates formant un noyau polaire (Figure 8). Comme son nom l'indique, ce dernier domaine est impliqué dans la reconnaissance des RCPGs phosphorylés par les GRKs. Les  $\beta$ arrestines apparaissent constitutivement phosphorylées mais sont déphosphorylées suite à l'activation d'un RCPG, suggérant le rôle inhibiteur de cette phosphorylation des  $\beta$ arrestines. Des études structurales, suite à la cristallisation de  $\beta$ arrestine 1, suggèrent en effet que la phosphorylation de celle-ci contribue à la garder dans une conformation inactive (Han et al. 2001).

La résolution des structures cristallines de l'arrestine visuelle et de  $\beta$ arrestine 1 (Figure 8B) (Han et al. 2001; Hirsch et al. 1999), plusieurs études de mutagenèse (Gurevich and Benovic 1993; Vishnivetskiy et al. 1999; Vishnivetskiy et al. 2000; Vishnivetskiy et al. 2002), ainsi que de protéolyse protégée (Xiao et al. 2004), suggèrent qu'un réarrangement structural de la molécule d'arrestine accompagne sa transition vers un état de haute affinité de liaison au récepteur. En effet, des interactions connues, entre les domaines N- et C-terminal dans l'état inactif, sont perdues dans la molécule d'arrestine active, suggérant que



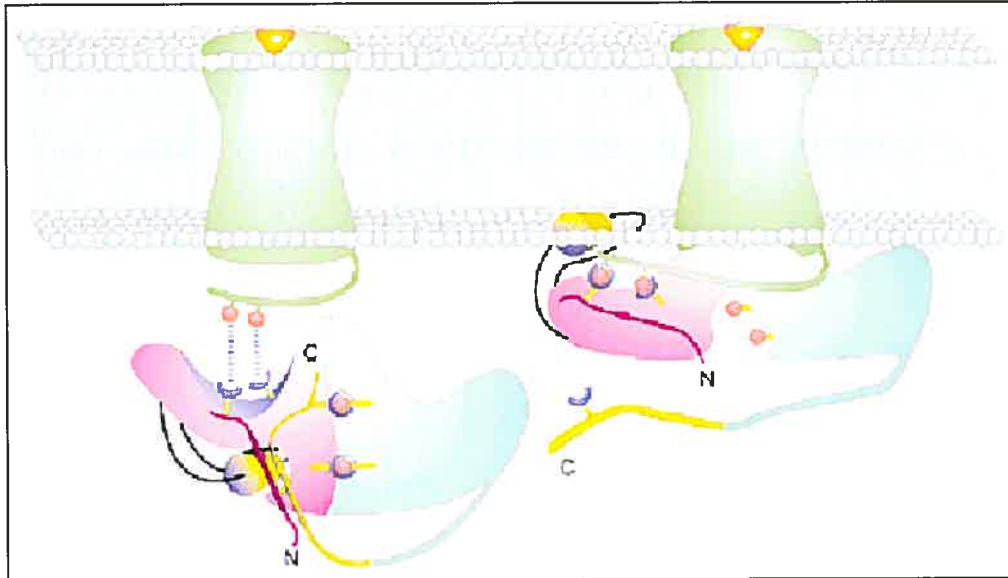
**Figure 8. Les  $\beta$ arrestines.**

**A)** Représentation schématique de l'architecture des  $\beta$ arrestines 1 et 2. Adapté de (Luttrell and Lefkowitz 2002). A, domaine N-terminal responsable de la reconnaissance des RCPGs activés; B, le domaine C-terminal responsable de la reconnaissance secondaire du récepteur; P, domaine de reconnaissance des phosphates. Les différentes régions et domaines identifiés par couleur: Bleu, reconnaissance du récepteur et de la membrane; Jaune, régulation en N (R1) et C (R2) -terminal; Rouge, interaction avec la machinerie d'endocytose; Vert, interactions proposées entre  $\beta$ arrestine et les protéines de signalisation. S412, site de phosphorylation par ERK1/2. **B)** Diagramme en ruban de  $\beta$ arrestine 1 issue de sa structure cristalline (Han et al. 2001). Les extrémités N- et C-terminale sont indiquées par N et C respectivement. La couleur varie de bleu à rouge en allant du N- au C-terminal. Deux boucles ne sont pas représentées en raison de leurs formes désordonnées dans tous les cristaux.

les domaines bougent un par rapport à l'autre au cours du processus d'activation de l'arrestine. Ainsi, à l'état inactif, l'arrestine présente une conformation fermée avec un noyau polaire intact, à l'interface entre les domaines N- et C-terminal, tenu en place par les interactions ioniques et hydrophobes entre les deux domaines. De plus, l'hélice  $\alpha I$  du domaine N-terminal est complètement enfouie dans un environnement hydrophobe où vient la rejoindre la queue C-terminale, qui est également ancrée au niveau du domaine N-terminal, stabilisant ainsi la conformation inactive (Figure 9) (Gurevich and Gurevich 2004).

La liaison des arrestines aux récepteurs semble se produire en deux étapes. Premièrement, l'arrestine reconnaît la boucle i3 des RCPGs dans leur conformation active via son domaine N-terminal. Ensuite, l'arrestine reconnaît les sites phosphorylés par les GRKs sur les récepteurs via son domaine de reconnaissance des phosphates, c'est alors que l'arrestine atteint sa conformation active, de haute affinité pour les récepteurs. Dans le processus d'activation d'arrestine et de sa liaison au récepteur, ses interactions intramoléculaires hydrophobes et ioniques sont déstabilisées, et la queue C-terminale ainsi que l'hélice amphipatique  $\alpha I$  de l'arrestine sont libérées (Gurevich and Gurevich 2004). L'hélice  $\alpha I$  peut alors possiblement s'insérer dans la membrane, servant d'ancrage membranaire additionnel et stabilisant la liaison d'arrestine au récepteur (Figure 9). Par ailleurs, la libération de la queue C-terminale expose ses sites de liaisons à la clathrine et à l'adaptine-2 (AP2), ce qui promeut son interaction avec la machinerie d'internalisation. L'endocytose des RCPGs ainsi que le rôle joué par l'arrestine dans ce processus sera abordé dans la prochaine section. Aussi, en plus de leurs rôles dans la désensibilisation des RCPGs et l'initiation de leur endocytose, les  $\beta$ arrestines activées peuvent également agir en protéines d'échafaudage, liant les récepteurs aux voies de signalisation des MAPKs (Luttrell and Lefkowitz 2002), ce qui sera décrit plus en détail dans la section 1.4.2.





**Figure 9. Mécanisme proposé pour la liaison de  $\beta$ arrestine aux RCPGs.**

(Gurevich and Gurevich 2004)

Les domaines N- et C-terminal sont en rose et bleu respectivement. Le noyau polaire est localisé à l'interface entre les domaines N- et C-terminal et est représenté par des interactions charge à charge (points bleus et rouge). La queue C-terminale est dessinée en teinte verte jaunâtre et le feuillet I en N-terminal est en magenta. Les charges positives et négatives sont en bleu et rouge; les portions hydrophobes sont en jaune. Le récepteur activé est représenté en vert.

À prime abord, les  $\beta$ arrestines 1 et 2, possédant une forte similarité de séquence ainsi que structurale, semblent remplir les mêmes fonctions. Toutefois, quelques études ont récemment mis en évidence des différences entre les  $\beta$ arrestines 1 et 2 à plusieurs niveaux. Tout d'abord, la localisation cellulaire des deux  $\beta$ arrestines est différente. Tandis que  $\beta$ arrestine 1 est retrouvée autant dans le cytoplasme que dans le noyau,  $\beta$ arrestine 2 semble seulement localisée au cytoplasme (Oakley et al. 2000). Plus récemment, il fut démontré que toutes deux ont la possibilité d'aller dans le noyau mais que, contrairement à  $\beta$ arrestine 1,  $\beta$ arrestine 2 possède un signal d'export nucléaire faisant en sorte qu'elle est

constitutivement transportée hors du noyau, ce qui explique son apparente exclusion nucléaire (Scott et al. 2002; Wang et al. 2003a). Aussi, les  $\beta$ arrestines 1 et 2 présentent des affinités différentielles pour les RCPGs, mettant en évidence deux classes principales de récepteur. Les récepteurs de la classe A démontrent une plus grande affinité pour  $\beta$ arrestine 2, tandis que ceux de la classe B lient les deux isoformes de  $\beta$ arrestines avec des affinités similaires (Oakley et al. 2000; Kohout et al. 2001). Il a par la suite été démontré que ces différences d'affinité sont directement liées au niveau de phosphorylation des RCPGs par les GRKs (Oakley et al. 2001). En effet, les récepteurs de la classe B, contrairement à ceux de la classe A, possèdent des regroupements de sérines et/ou thréonines au niveau de leur queue C-terminale qui sont fortement phosphorylées par les GRKs, et impliqués dans l'établissement d'une interaction stable entre les récepteurs et  $\beta$ arrestine.

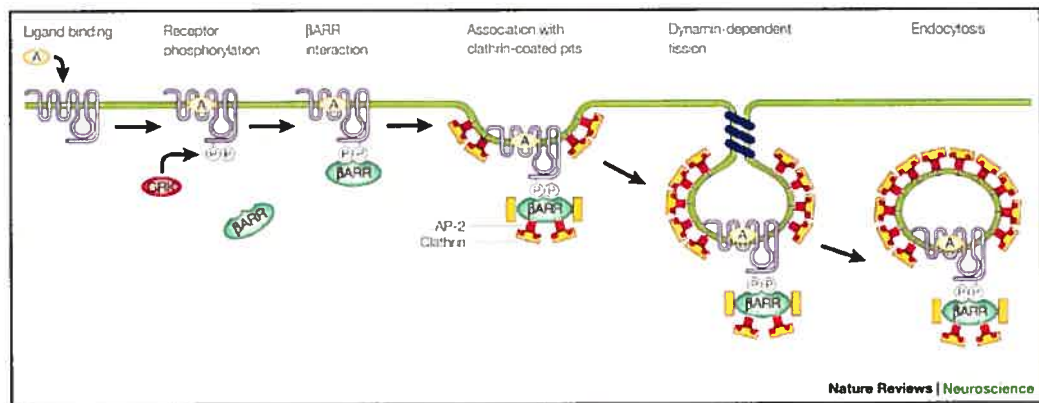
Les  $\beta$ arrestines 1 et 2 semblent également sous le contrôle de différents mécanismes de régulation rétroactive. En effet,  $\beta$ arrestine 1 est phosphorylée par les MAPKs ERK1/2 (Lin et al. 1999) tandis que  $\beta$ arrestine 2 est un substrat de la kinase caséine II (CKII) (Kim et al. 2002). Même si le rôle de la phosphorylation des  $\beta$ arrestines par ces kinases demeure incompris, ces différences de phosphorylation entre  $\beta$ arrestine 1 et 2 contribuent sans doute aux différentes fonctions cellulaires de ces deux protéines dans la régulation et la signalisation des RCPGs. De plus, des études ont récemment mis en évidence le rôle particulier de  $\beta$ arrestine 2 dans l'ubiquitination du  $\beta_2$ AR (Shenoy et al. 2001a) et V2R (Martin et al. 2003a) induit par l'agoniste, ainsi que dans l'activation des MAPKs par le récepteur de l'angiotensine de type 1A ( $AT_{1A}R$ ) (Kim et al. 2005) et le V2R (Ren et al. 2005).

### **1.3.2 Endocytose**

Suite à leur activation par un agoniste, pratiquement tous les RCPGs subissent une endocytose dépendante du ligand (aussi appelé internalisation ou séquestration). À première

vue, ce processus semble essentiellement représenter un mécanisme servant à retirer les récepteurs « utilisés » (c.-à-d. désensibilisés) de la surface cellulaire. Mais, il est maintenant reconnu que ce processus sert en fait plusieurs causes (Prossnitz 2004). Celles-ci incluent la régulation du niveau d'expression des récepteurs à la surface membranaire pour moduler la sensibilité des cellules aux ligands (Krupnick and Benovic 1998b), la re-sensibilisation des récepteurs pour leur recyclage à la surface cellulaire et la poursuite de la transduction des signaux (Ferguson 2001a), la localisation de complexes de signalisation intra-cellulaire aux endosomes contenant les récepteurs (Luttrell and Lefkowitz 2002), et la dégradation des RCPGs (appelée parfois régulation négative) menant à une désensibilisation à long terme (Tsao et al. 2001). Ces deux dernières fonctions seront abordées plus en détail dans les sections qui suivront.

Le mécanisme d'endocytose des RCPGs le mieux connu, et sans aucun doute le plus répandu, est orchestré par  $\beta$ arrestine, menant à l'internalisation des récepteurs via les puits tapissés de clathrines (Figure 10) (Pierce and Lefkowitz 2001). Comme mentionné plus haut,  $\beta$ arrestine contient des sites d'interaction avec la clathrine ainsi que pour l'adaptateur associé à la clathrine AP2, sites qui sont révélés dans la conformation active de  $\beta$ arrestine. L'interaction de  $\beta$ arrestine avec ces éléments de la machinerie d'endocytose mène à la redistribution du complexe récepteur- $\beta$ arrestine dans la membrane vers des domaines, ou puits tapissés de clathrines, préexistants (Santini et al. 2002; Scott et al. 2002). Ces invaginations sont ensuite « pincées » et séparées de la membrane par fission sous l'action de la GTPase cytoplasmique dynamine (Sever 2002). Le signal induisant ceci semble provenir en partie de la phosphorylation de la dynamine par la protéine tyrosine kinase c-Src, elle-même possiblement recrutée et activée par la  $\beta$ arrestine liée au récepteur (Miller et al. 2000).

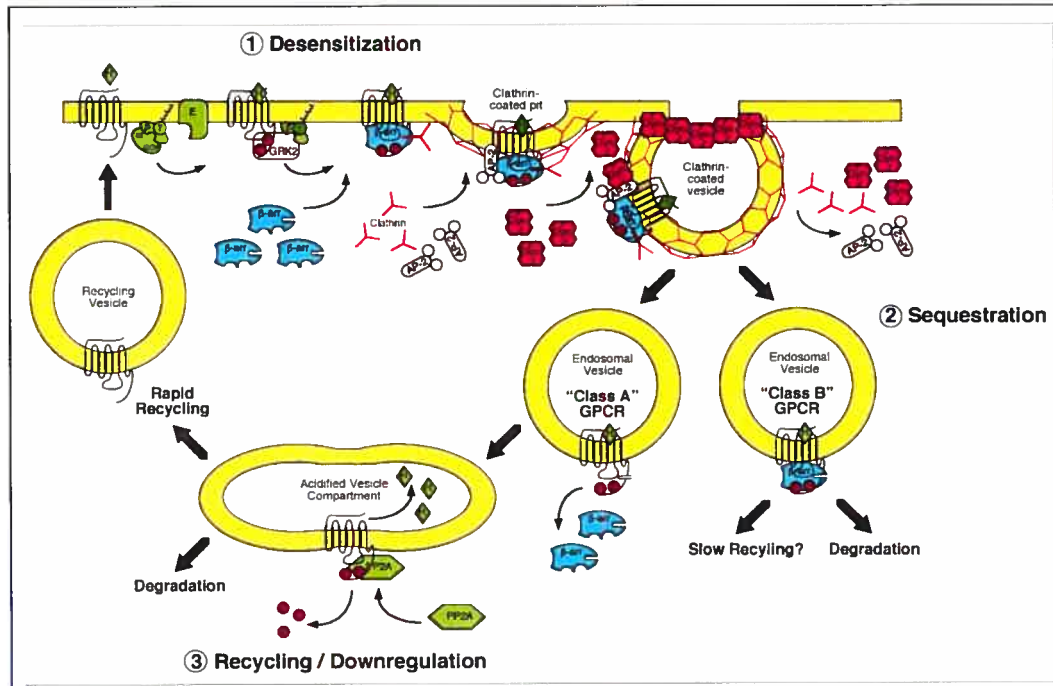


**Figure 10. Endocytose des RCPGs dépendante de  $\beta$ arrestine.**

(Pierce and Lefkowitz 2001)

Dessin illustrant les événements menant à la séquestration des RCPGs, dépendante de  $\beta$ arrestine et GRK, via les puits tapissés de clathrines.

Comme abordé précédemment, les RCPGs peuvent être classés en fonction de leur affinité de liaison avec  $\beta$ arrestine, ce qui semble être influencé par la densité de phosphorylation des récepteurs au niveau de leur queue C-terminale (Oakley et al. 2001). D'une part, les récepteurs de la classe A (par ex. le  $\beta_2$ AR) interagissent seulement de façon transitoire avec  $\beta$ arrestine suite à une stimulation par un agoniste, dû à la faible affinité de celle-ci pour ces récepteurs faiblement phosphorylés par les GRKs. D'autre part, la haute densité de résidus sérines et thréonines phosphorylés par les GRKs au niveau de la queue C-terminale des récepteurs de la classe B (par ex. le V2R) conduit à la formation de complexes récepteur- $\beta$ arrestine très stables, qui persistent même après l'internalisation de ces récepteurs. En effet, dû à ces différences d'affinité entre  $\beta$ arrestine et les RCPGs, les deux classes de récepteurs ont également des profils différents d'endocytose, de trafic intracellulaire post-endocytose et de re-sensibilisation, ou recyclage (Figure 11) (Oakley et al. 1999a; Luttrell and Lefkowitz 2002).



**Figure 11. Rôle de  $\beta$ arrestine dans la désensibilisation, séquestration et trafic intracellulaire des RCPGs.** (Luttrell and Lefkowitz 2002)

Illustration représentant les principaux mécanismes moléculaires impliqués dans la désensibilisation homologue des RCPGs (1), séquestration (2), et recyclage/régulation négative (3). Abréviations: H, hormone ou agoniste;  $\beta$ -arr,  $\beta$ arrestine; E, effecteur; Dyn, dynamine.

Ainsi, les récepteurs de la classe A se dissocient rapidement de  $\beta$ arrestine lors de leur internalisation, sont acheminés dans des endosomes acidifiés, où le ligand est dissocié et les récepteurs sont déphosphorylés par la phosphatase hPP2A (Pitcher et al. 1995), puis recyclés à la membrane plasmique (Ferguson 2001). À l'inverse, dû à la stabilité de l'interaction entre  $\beta$ arrestine et les RCPGs de la classe B, ceux-ci subissent une internalisation de plus grande envergure que ceux de la classe A, et sont retrouvés en complexe avec  $\beta$ arrestine dans les endosomes. Cette interaction persistante de  $\beta$ arrestine avec les récepteurs de la classe B conduit à l'accumulation de complexes récepteur-

$\beta$ arrestine dans des endosomes tardifs, qui sont ensuite soit ciblés pour dégradation dans les lysosomes, soit ré-acheminés très lentement vers la membrane plasmique par une voie non définie (Oakley et al. 1999; Oakley et al. 2000).

Récemment, plusieurs études ont menées à l'identification de partenaires d'interaction des GRKs et de  $\beta$ arrestine impliqués dans la régulation de l'internalisation des RCPGs (Claing et al. 2002). Entre autres, des études ont mis en évidence l'interaction de  $\beta$ arrestine avec la ligase d'ubiquitine Mdm2 (Shenoy et al. 2001; Wang et al. 2003a). Ce type d'enzyme catalyse l'ubiquitination des protéines, une modification post-traductionnelle consistant en l'ajout covalent d'une petite protéine, nommée ubiquitine, sur des résidus lysines via un lien isopeptidique (Pickart 2001). Il a été démontré que l'ubiquitination de  $\beta$ arrestine par Mdm2, suite à la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ AR et V2R, est requise à l'internalisation des récepteurs via les puits tapissés de clathrine (Shenoy et al. 2001; Shenoy and Lefkowitz 2003a). De plus, l'état d'ubiquitination de  $\beta$ arrestine semble influencer la stabilité du complexe RCPG- $\beta$ arrestine ainsi que le trafic intra-cellulaire de  $\beta$ arrestine, où la déubiquitination de celle-ci semble déclencher sa dissociation des récepteurs (Shenoy and Lefkowitz 2003a).

Malgré la nature hautement conservée du mécanisme d'endocytose des RCPGs, via les puits tapissés de clathrines et dépendante de  $\beta$ arrestine et de GRK, il existe également des exemples de RCPGs qui ne sont pas internalisés rapidement, ou qui sont internalisés via d'autres mécanismes. Ces derniers sont souvent définis par l'utilisation de différentes constructions agissant comme des dominants négatifs (par ex. des mutants de  $\beta$ arrestine, dynamine et clathrine), pour évoquer ou exclure l'utilisation d'une voie particulière (Marchese et al. 2003). Par ces études, presque tous les mécanismes possibles d'endocytose des RCPGs ont été rapportés: dépendants ou indépendants de  $\beta$ arrestine et/ou clathrine et/ou dynamine. Cette diversité de trafic membranaire des RCPGs, même si elle n'est pas encore totalement élucidée au niveau mécanistique, est probablement impliquée dans la régulation physiologique des RCPGs. D'ailleurs, comme nous le verrons plus loin, le trafic

membranaire suivant l'endocytose est lié de près à d'autres mécanismes de régulation des récepteurs. Notamment, comme nous le verrons maintenant, l'endocytose des RCPGs joue un rôle important dans la régulation négative de ces récepteurs (Tsao et al. 2001).

### 1.3.3 Régulation négative

En plus d'être désensibilisés et internalisés très rapidement suite à une stimulation par un agoniste, les RCPGs sont également régulés par des mécanismes qui opèrent sur une plus longue période de temps. Le processus appelé régulation négative réfère à la diminution des nombres totaux de récepteurs présents dans les cellules ou tissus, et elle est typiquement induite des heures à des jours suivant une exposition prolongée ou répétée de la cellule à un agoniste (Clark 1986). Plusieurs mécanismes ont été impliqués dans la régulation négative des RCPGs. Par exemple, des études effectuées avec le  $\beta_2$ AR indiquent que l'activation du récepteur par un agoniste peut moduler la transcription du gène l'encodant (Collins et al. 1989), la stabilité de son ARNm (Bouvier et al. 1989; Tholanikunnel and Malbon 1997) ainsi que la protéolyse du récepteur (Gagnon et al. 1998; Jockers et al. 1999). La protéolyse régulée est particulièrement intéressante parce qu'elle occasionne la régulation négative des récepteurs existants, qui ont normalement une demi-vie remarquablement longue (dans certains cas > 24h) (Heck and Bylund 1998).

Le mécanisme de protéolyse des RCPGs qui semble le plus répandu est celui impliquant l'endocytose des récepteurs suivi de leur ciblage vers les lysosomes, organelles spécialisées contenant des enzymes digestives (Tsao et al. 2001). Les RCPGs peuvent être dirigés vers les lysosomes après leur endocytose initiale via les puits tapissés de clathrine, ou suivre une voie membranaire différente, impliquant des mécanismes d'endocytose alternatifs. Récemment, des études ont démontrées l'implication de l'ubiquitination des récepteurs dans leur ciblage vers les lysosomes (Shenoy et al. 2001; Marchese and Benovic 2001). Par contre, ce rôle de l'ubiquitination dans le trafic intra-cellulaire des récepteurs

vers les lysosomes n'est peut-être pas universel: une étude a récemment suggérée que l'ubiquitination de V2Rs exogènes dépendante de l'agoniste occasionne plutôt la dégradation des récepteurs dans les protéasomes (Martin et al. 2003). Ces derniers sont des complexes protéiques présents dans le cytosol, qui reconnaissent et dégradent les protéines marquées pour destruction par ubiquitination. La dégradation des RCPGs via la voie ubiquitine-protéasome a souvent été observée, mais principalement à partir du réticulum endoplasmique avant leur acheminement à la membrane cellulaire (Wojcikiewicz 2004). La protéolyse du V2R dans les protéasomes, toutefois, ne semble pas être le mécanisme privilégié de régulation négative de ces récepteurs *in vivo*. En effet, une étude effectuée avec des membranes de cellules rénales bovines rapporte le clivage protéolytique du V2R endogène induite par l'agoniste, par une métalloprotéase membranaire (Kojro and Fahrenholz 1995). Le contexte cellulaire semble donc grandement influencer la nature des mécanismes de régulation des RCPGs.

#### **1.4 Autres partenaires des RCPGs et signalisation indépendante des protéines G hétéro-trimériques**

Il est maintenant clair que les protéines G hétéro-trimériques ne sont pas les seuls partenaires des RCPGs. En effet, ceux-ci interagissent également, de façon parfois dépendante parfois indépendante des agonistes, avec plusieurs autres protéines possédant des fonctions aussi diversifiées qu'importantes (Tableau I) (Bockaert et al. 2004). La nature de ces autres partenaires d'interaction est évidemment dépendante de la nature du récepteur impliqué, ainsi que du contexte cellulaire. Entre autres, comme décrit précédemment, certaines protéines interagissant avec les RCPGs, telles les GRKs et  $\beta$ arrestine, sont impliqués dans la régulation et/ou ciblage des récepteurs vers des compartiments cellulaires spécifiques. Par exemple, l'interaction des RCPGs avec des protéines associées au cytosquelette (par ex. filamine A, spinophiline, F-actine) a également été suggéré comme



étant impliqué dans leur compartimentalisation cellulaire, endocytose, et/ou trafic intracellulaire (Milligan and White 2001). D'autres interactions protéine-protéine impliquant les RCPGs semblent plutôt impliquées dans l'ontogenèse des récepteurs (rôle de chaperon) ainsi que la régulation fine de leur propriétés signalétiques, comme cela semble être le cas pour l'oligomérisation des récepteurs entre eux (Angers et al. 2002), ou avec des protéines à domaine transmembranaire unique telles les protéines régulatrices de l'activité des RCPGs (RAMPs) (McLatchie et al. 1998; Morfis et al. 2003). Enfin, certaines protéines interagissant avec les RCPGs sont directement impliquées dans la transduction des signaux et engendrent, dans certains cas, la formation de complexes de signalisation appelés « signalosomes » ou « réceptosomes ». Parce que ceci représente un intérêt particulier dans le cadre de cette thèse, la nature et le rôle des différentes protéines directement impliquées dans la signalisation des RCPGs, possiblement indépendants des protéines G hétéro-trimériques, seront abordés plus en détail.

### 1.4.1 Interaction directe des RCPGs avec des protéines effectrices

Un nombre grandissant d'études suggère des interactions entre les RCPGs et certaines protéines effectrices, modulant directement l'activité des récepteurs, de façon indépendante des protéines G hétéro-trimériques (Tableau I). Une des découvertes les plus inattendues fut celle d'une interaction directe entre certains RCPGs et des **canaux ioniques**. En effet, même s'il n'existe aucune similarité structurale ni fonctionnelle entre les RCPGs et les canaux ioniques à ouverture contrôlée par un ligand, des études ont démontrées l'interaction mutuellement inhibitrice du récepteur D5 de la dopamine avec les récepteurs ionotropiques GABA<sub>A</sub> au niveau des neurones (Liu et al. 2000). Même si un tel rôle de l'interactions récepteur-canal ionique n'a pas toujours été démontré, d'autres études ont également rapportées des interactions entre le récepteur D<sub>1</sub>-dopaminergique (D<sub>1</sub>R) et le récepteur ionotropique de type *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Lee et al. 2002), entre le récepteur métabotropique du glutamate mGluR1a et des canaux calciques de type P/Q

	GIPs	RECEPTORS		GIPs	RECEPTORS
<b>A</b>	<u>Arrestin</u>	Many GPCRs	<b>N</b>	<u>NMDA (NR1A, NR2A)</u>	Dopamine (D1)
	ABP	PrRP		<u>N-type Ca<sup>++</sup> channels</u>	ORL1 (orphanin-R)
	ARIP-2	$\beta_1$ -AR, 5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>		Nina A	Opsin
	ARF-1	5-HT <sub>2A</sub>		<u>NHERF1</u>	PTH-R1, $\beta_2$ -AR, P <sub>2</sub> Y <sub>1</sub> , $\kappa$ -opioid
	ATRAP	Angiotensin (AT1)		<u>NOS</u>	Bradykinin B2,
	ATFx	GABA <sub>B</sub>		(endothelial & neuronal)	Angiotensin AT1,
	ATF4	GABA <sub>B</sub>			Endothelin (ETB)
	<u>AKAP-250</u>	$\beta_2$ -AR		NCS1	Dopamine (D2, D3)
	<u>AKAP 150</u>	$\beta_2$ -AR		Neurofilament M	Dopamine (D1)
				NCK	Dopamine (D4)
<b>C</b>	Calmodulin	mGluR7, 5-HT <sub>2C</sub> , Dopamine (D2)	<b>O</b>	<u>odr4, odr8</u>	<i>C. elegans</i> olfactory receptors
	Calcyon	Dopamine (D1, D5)	<b>P</b>	<u>PICK-1</u>	<u>mGluR7a, b, 3, 4a, 8a, 8b,</u>
	CN-Ras-GEF	$\beta_1$ -AR			Pr-RP-R
	COP-1	Dopamine (D1)		<u>P/Q Ca<sup>++</sup> channels</u>	mGluR1a
	<u>Creatine-Kinase</u>	PAR-1		<u>PSD-95</u>	$\beta_1$ -AR, 5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>
	CREB2 (see ATF4)	GABA <sub>B</sub>		Penplakin	$\mu$ opioid-R
	CIPP	5-HT <sub>2A</sub>		PLCg1	Angiotensin (AT1)
	CASK	5-HT <sub>2C</sub>		PICOT	5-HT <sub>2C</sub>
<b>D</b>	DRIP-78	Dopamine (D1)	<b>R</b>	Ran BP2	Opsin
	Dishevelled	Frizzled		RAMP1	CL (calcitonin-like R yielding CGRP-R)
	Dlgh3	5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>		RAMP2, 3	CL (yielding adrenomodulin-R)
<b>E</b>	EDP-50	$\beta_2$ -AR, $\kappa$ -opioid	<b>S</b>	SAP97	5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>
	Endophilin	$\beta_1$ -AR		SAP102	5-HT <sub>2C</sub>
<b>F</b>	Filamin-A	CaR, Dopamine (D2, D3)		Ste5	$\alpha$ -pheromone-R (yeast)
				Shank1,2/SSTRIP/ CortBP/ProSAP	SSTR2 (somatostatin-R2), CIRL (latrotoxin $\alpha$ -R)
<b>G</b>	G $\beta$ $\kappa$	mGluR7a			mGluR1a, b (via Homer)
	<u>GABA<sub>A</sub></u>	Dopamine (D5)		Syntenin	mGluR3, 4a, b, 6, 7a, b
	GRIP	PrRP, mGluR3, 4a, 6, 7a, b		S-SCAM (see ARIP)	$\beta_1$ -AR, 5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>
	GIPC	$\beta_1$ -AR, Dopamine (D2, D3), LH		SHP-2	Angiotensin (AT1)
	GASP	$\delta$ -opioid-R		Scr	$\beta_3$ -AR
	Gravin (see AKAP250)	$\beta_2$ -AR		Shiah-1A	mGluR1, 5
<b>H</b>	<u>Homers (1, 2, 3)</u>	<u>mGluR5a, b</u>	Spinophilin	Dopamine (D2, D3)	
<b>I</b>	<u>INAD</u>	<u>Rhodopsin</u>	<b>T</b>	<u>Tamalin</u>	<u>mGluR1a, mGluR5</u>
<b>J</b>	<u>JAK</u>	<u>Angiotensin (AT1), 5-HT<sub>2A</sub></u>		TcTex-1	Rhodopsin
<b>L</b>	LRP5/6	Frizzled	<b>V</b>	Vell3	5-HT <sub>2C</sub>
<b>M</b>	MAG12 (see ARIP)	$\beta_1$ -AR, 5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>			
	MAP1A	5-HT <sub>2A</sub>			
	MPP3 (see Dlgh3)	5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>			
	MCH (class Ib)	V <sub>2</sub> R (pheromone-R)			
	MUPP1	5-HT <sub>2C</sub>			
	Mint1	5-HT <sub>2C</sub>			

**Tableau I. Protéines interagissant avec les RCPGs.** Adapté de (Bockaert et al. 2004).

Classification alphabétique des protéines rapportées comme interagissant avec les RCPGs, et la nature des récepteurs impliqués dans ces interactions est indiqué. Les interactions impliquant des protéines effectrices sont soulignées en vert (canaux ioniques) ou jaune (enzymes) tandis que celles impliquant des protéines d'échafaudage sont soulignées en orange. Protéines manquantes : le facteur sensible au N-éthylmaléimide, avec le  $\beta_2$ AR (Cong et al. 2001); 14-3-3, avec le récepteur du PTH (PTHR) (Tazawa et al. 2003), le GABA<sub>B</sub>R (Couve et al. 2001) et les  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - et  $\alpha_{2C}$ -AR (Prezeau et al. 1999).

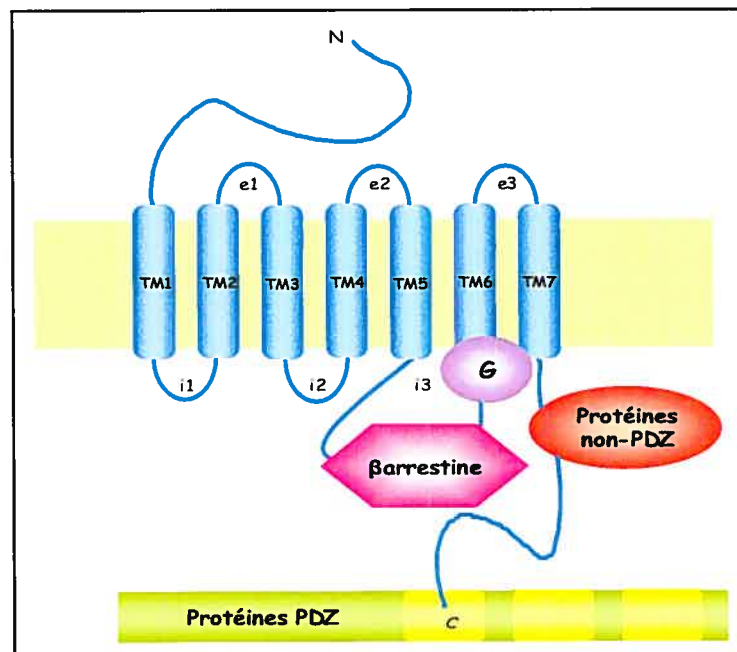
(Kitano et al. 2003), ainsi qu'entre le récepteur de la nociceptine (ORL) et un canal calcique de type N (Beedle et al. 2004).

Certaines autres protéines identifiées comme interagissant avec les RCPGs présentent plutôt des propriétés typiques de molécules de signalisation avec activité enzymatique. En effet, quelques exemples d'interaction directe entre les RCPGs et des **enzymes**, menant à l'activation de voies de signalisation indépendantes des protéines G hétéro-trimériques, ont été rapportés. Entre autres, le récepteur  $\beta_3$  adrénergique lie le domaine SH3 de la protéine tyrosine kinase c-Src, via des séquences de poly-proline (-PxxP-) présentes au niveau de la boucle i3 et queue C-terminale du récepteur (Cao et al. 2000), menant à l'activation d'ERK1/2. Le récepteur activé par une protéase 1 lie la créatine kinase, dont l'activité semble impliquée dans les changements morphologiques des cellules induits par ce récepteur (Mahajan et al. 2000). Les récepteurs B2 de la bradykinine (B2R) (Ju et al. 1998), de l'angiotensine de type 1 (AT<sub>1</sub>R) et de l'endothéline de type B (ET<sub>B</sub>R) (Marrero et al. 1999), interagissent tous avec la NO synthase endothéliale (eNOS) via leur 8<sup>e</sup> hélice, où la formation du complexe récepteur-eNOS semble inhiber l'activité de l'enzyme, qui est libérée suite à une stimulation par un agoniste. Les récepteurs AT<sub>1</sub>R (Marrero et al. 1995) et sérotoninergique 5-HT<sub>2A</sub> (Guillet-Deniau et al. 1997), pour leur part, lient et activent spécifiquement certaines kinases Janus (Jaks) de façon dépendante de l'agoniste, via un motif (-YIPP-) présent au niveau de leur 8<sup>e</sup> hélice (Ali et al. 1997; Venema et al. 1998). Les Jaks activées phosphorylent ensuite ces récepteurs sur résidus tyrosine, ce qui promeut la liaison et l'activation subséquente de protéines comportant des domaines SH2 comme les protéines de transduction du signal et activatrices de la transcription (STATs) (Ali et al. 2000).

### 1.4.2 Interaction des RCPGs avec des protéines d'échafaudage

En plus des interactions directes des RCPGs avec des protéines effectrices, plusieurs études ont démontrées l'association des récepteurs avec des protéines agissant comme échafauds, liant physiquement les récepteurs à divers effecteurs (Tableau I) (Hall and Lefkowitz 2002; Bockaert et al. 2004). Il existe plusieurs classes de protéines d'échafaudage, qui peuvent être définies de façon générale comme des protéines qui s'associent avec au moins deux partenaires pour augmenter l'efficacité et/ou la spécificité des voies de signalisation cellulaire (Burack and Shaw 2000). Les RCPGs peuvent s'associer avec des protéines d'échafaudage cytoplasmiques via leurs boucles intracellulaires ou leur extrémité C-terminale (Figure 12) (Hall and Lefkowitz 2002).

Tout d'abord, la portion distale de l'extrémité C-terminale de plusieurs RCPGs semble impliquée dans des interactions avec des **protéines échafauds à domaines PDZ** (protéines PDZ). Les domaines PDZ ont été reconnus pour la première fois comme des répétitions de séquences présentes chez trois protéines: la protéine de densité post-synaptiques (PSD) PSD-95, son homologue chez la *Drosophile*, *Discs-large*, et la protéine des jonctions étanches ZO-1 (Sheng and Sala 2001). Ces domaines spécialisés promeuvent l'interaction entre les protéines qui les contiennent et l'extrémité C-terminale de protéines cibles où, même s'il ne semble pas y avoir de séquence consensus claire, les quatre derniers acides aminés, ou plus, de leur séquence sont spécifiquement reconnus par le domaine PDZ impliqué. L'interaction entre les protéines PDZ et leurs cibles est devenu un moyen bien reconnu de modulation de la signalisation cellulaire, définissant la composition moléculaire des complexes de signalisation à l'intérieur d'un micro compartiment et, dans certains cas, localisant précisément ces complexes dans la cellule.



**Figure 12. Interaction des RCPGs avec des protéines échafauds.**

Adapté de (Hall and Lefkowitz 2002).

Les protéines d'échafaudage interagissant avec les RCPGs peuvent être séparées en trois grandes catégories: 1) des protéines à domaines PDZ (jaune) s'associant avec l'extrémité C-terminale des récepteurs; 2) diverses protéines échafauds ne contenant pas des domaines PDZ (protéines non-PDZ), qui s'associent avec l'extrémité C-terminale ou autres domaines cytoplasmiques des récepteurs; 3)  $\beta$ arrestine, qui s'associe avec plusieurs RCPGs et reconnaît typiquement des déterminants dans leur boucle i3.

Le premier exemple d'interaction entre un RCPG et une protéine PDZ a été observé chez la *Drosophila*, impliquant la rhodopsine et la protéine d'échafaudage InaD (Chevesich et al. 1997). Celle-ci, via ses multiples domaines PDZ, interagit et regroupe dans un même complexe la majorité des composantes de la voie de signalisation par le calcium couplé à la rhodopsine: la rhodopsine, Gq, la PLC, la PKC ainsi que le canal calcique TRP (Huber

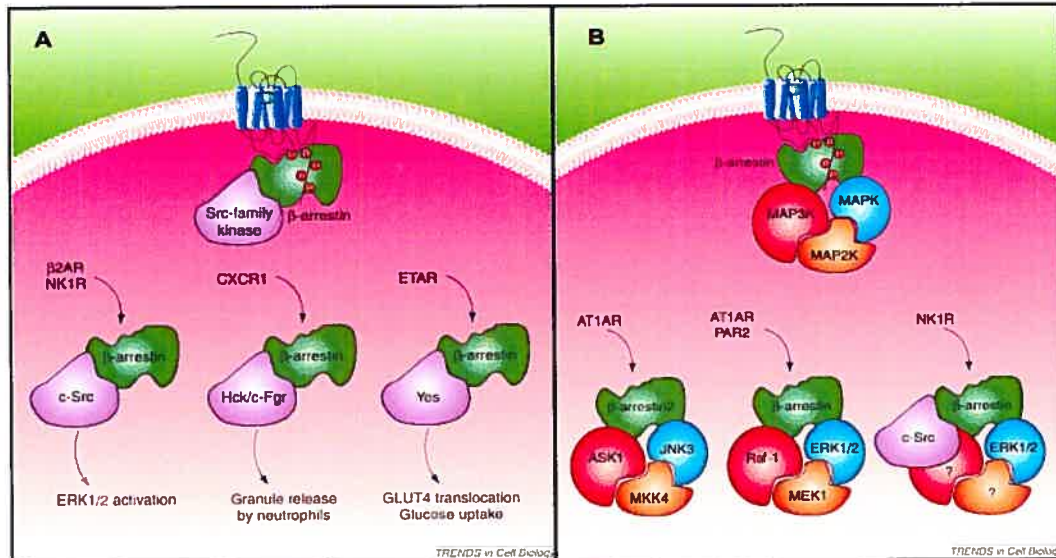
2001). Il a également été démontré que, comme la rhodopsine de *Drosophila*, certains RCPGs de mammifères peuvent aussi s'associer à des protéines échafauds contenant des domaines PDZ. Entre autres, le  $\beta_2$ AR s'associe spécifiquement avec la protéine PDZ appelée facteurs de régulation et d'échange  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  (NHERF), liant physiquement le  $\beta_2$ AR à l'échangeur  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  de type 3 (NHE3), et facilitant la régulation, au rôle inconnu, de ce transporteur membranaire par le  $\beta_2$ AR (Hall et al. 1998); et l'association du  $\beta_1$ AR avec la protéine PDZ PSD-95 sert de lien physique entre le récepteur et le canal récepteur du glutamate de type NMDA, connu pour être régulé par le  $\beta_1$ AR dans les neurones (Hu et al. 2000).

L'extrémité C-terminale de plusieurs RCPGs est également connue pour être impliquée dans l'association des récepteurs avec diverses autres **protéines échafauds sans domaines PDZ**. Par exemple, le  $\beta_2$ AR interagit avec les protéines d'ancrage de la PKA (AKAPs) via son domaine C-terminal (Shih et al. 1999; Fraser et al. 2000). Les AKAPs s'associent avec PKA, ainsi qu'une variété d'autres protéines, pour organiser des voies de signalisation intra-cellulaires (Colledge and Scott 1999). Le  $\beta_2$ AR, tout comme plusieurs autres RCPGs, se couple à la protéine Gs pour stimuler la production d'AMPc et activer la PKA en aval. Ainsi, l'association des AKAPs avec les RCPGs ressemble à un mécanisme potentiel pour accroître l'efficacité de signalisation par Gs, ainsi que l'efficacité de désensibilisation des récepteurs phosphorylés par PKA. Les mGluR1 et mGluR5, pour leur part, s'associent avec les protéines de la famille Homer via un motif spécialisé en leur domaine C-terminal (P-P-xx-F-R) (Brakeman et al. 1997; Kato et al. 1998). Les protéines Homer ont la capacité de se multimériser ainsi que d'interagir avec différentes protéines, faisant ainsi le lien entre celles-ci. L'association des récepteurs avec les protéines Homer a des conséquences importantes sur la fonction des mGluR1 et mGluR5, et plusieurs de ces effets sont dus à leur action de protéines d'échafaudage. Entre autres, les protéines Homer peuvent aussi interagir avec les canaux récepteurs intra-cellulaires de l'inositol triphosphate (IP3). Se couplant tous deux à Gq, l'activation des récepteurs mGluR1 et mGluR5 mène à la production d'IP3, et conséquemment, la liaison de ces RCPGs aux récepteurs d'IP3 par

l'intermédiaire des protéines Homer peut être particulièrement importante pour la régulation de leur signalisation (Tu et al. 1998).

Finalement, la boucle i3 de la majorité des RCPGs contient des déterminants clés pour l'association des récepteurs avec **βarrestine**. Comme mentionné plus haut, celle-ci peut servir d'échafaud pour lier les récepteurs à la machinerie d'internalisation. Toutefois, le βarrestine peut aussi s'associer avec une variété de protéines autres que les RCPGs et protéines impliquées dans l'endocytose (Shenoy and Lefkowitz 2003a). Par exemple, βarrestine peut s'associer avec différentes kinases de la famille Src, servant d'adaptateur pour le recrutement de ces kinases aux RCPGs activés (Figure 13A). Les kinases de la famille Src représentent un groupe de protéines tyrosines kinases jouant des rôles clés dans la régulation d'une variété de fonctions cellulaires, incluant l'internalisation des récepteurs, l'activation d'ERK1/2 ou l'exocytose (Kefalas et al. 1995; Luttrell and Luttrell 2004). Entre autres, le recrutement de c-Src par βarrestine 1 est impliqué dans la signalisation mitogénique dépendante de Ras induite par le β<sub>2</sub>AR (Luttrell et al. 1999). Il a également été démontré que l'échafaudage d'autres membres de la famille Src par βarrestine joue un rôle important dans la relâche de granules par les neutrophiles, induite par l'activation du récepteur 1 des chimiokines CXC (CXCR1), ainsi que dans la translocation des transporteurs du glucose de type 4 (GLUT4) à la membrane, pour l'absorption du glucose, arbitré par le récepteur de l'endothéline de type A (ET<sub>A</sub>R) (Figure 13A).

De plus, il a été montré que la stimulation du récepteur de la neurokinine 1 (NK<sub>1</sub>R) par un agoniste mène à l'activation robuste d'ERK1/2 suivant la formation d'un complexe comprenant le récepteur, βarrestine, c-Src et ERK1/2 (Figure 13B) (Defea et al. 2000a). En effet, βarrestine a également été impliquée dans l'échafaudage d'autres cascades MAPKs, rassemblant les kinases appropriées faisant partie d'un module spécifique (Figure 14), guidée par l'activation d'un RCPG (le fonctionnement et la nature des différentes cascades MAPKs seront discutés plus en détail dans la section suivante). Ainsi, il a été montré que la



**Figure 13. Rôle de  $\beta$ arrestine dans l'échafaudage de complexes signalétiques.**

(Perry and Lefkowitz 2002)

**A)** Plusieurs RCPGs mènent à l'activation des protéines tyrosines kinases de la famille Src par un mécanisme dépendant de leur recrutement par  $\beta$ arrestine. Les récepteurs impliqués, ainsi que les réponses cellulaires engendrées par l'activation des différentes kinases Src, sont indiqués. **B)** Les  $\beta$ arrestines servent d'échafauds pour les cascades MAPK et permettent leur régulation par les RCPGs. Les récepteurs impliqués, ainsi que les différentes protéines retrouvées dans le complexe de signalisation MAPK, sont indiqués. Abréviations:  $\beta$ 2AR, récepteur  $\beta$ <sub>2</sub>-adrénergique; NK1R, récepteur de la neurokinine 1; CXCR1, récepteur 1 des chimiokines CXC; ETAR, récepteur de l'endothéline de type A; AT1AR, récepteur de l'angiotensine de type 1A; PAR2, récepteur activé par une protéase 2; GLUT4, transporteur du glucose de type 4; MAPK, kinase activée par des signaux mitogéniques; MAP2K, MAPK kinase; MAP3K, MAPK kinase kinase. L'appellation  *$\beta$ arrestin* réfère aux deux  $\beta$ arrestines non visuelles.



stimulation des récepteurs de classe B activés par une protéase de type 2 (PAR2) (Defea et al. 2000b) et AT<sub>1A</sub>R (Luttrell et al. 2001) mène à la formation d'un complexe de signalisation multi-protéique composé du récepteur,  $\beta$ arrestine, Raf-1, de la MAPK kinase pour ERK de type 1 (MEK1) et ERK1/2. En outre, la kinase de signalisation apoptotique 1 (ASK1), une des kinases qui activent les kinases N-terminal c-Jun (JNK), ainsi que la MAPK kinase de type 4 (MKK4), peuvent également former un complexe avec  $\beta$ arrestine et JNK3. En effet, il a été trouvé que la stimulation d'AT<sub>1A</sub>R peut mener à l'activation de JNK3 de façon dépendante de  $\beta$ arrestine, où le récepteur,  $\beta$ arrestine 2 ainsi que JNK3 se retrouvent co-localisés aux vésicules d'endocytose (McDonald et al. 2000). L'échafaudage des MAPKs par  $\beta$ arrestine en complexe avec les RCPGs de classe B (interaction récepteur- $\beta$ arrestine stable) mène à leur rétention cytoplasmique, inhibant la signalisation nucléaire traditionnelle par les MAPKs et favorisant la régulation de leurs substrats cytoplasmiques (Luttrell 2003).

À la lumière de ces observations,  $\beta$ arrestine n'est plus seulement vue comme une protéine impliquée dans la désensibilisation des RCPGs, mais plutôt comme une protéine échafaud à multi-usage, qui peut mettre fin à certaines voies de signalisation initiées par les récepteurs tandis qu'elle mène simultanément à l'activation d'autres voies (Lefkowitz and Whalen 2004).

## **1.5 Régulation des voies MAPK par les RCPGs**

Comme mentionné précédemment, les RCPGs peuvent stimuler plusieurs cascades de signalisation, bien définies et conservées à travers l'évolution, menant à l'activation d'un groupe de kinases effectrices appelés MAPKs. Chose intéressante, les mécanismes utilisés par les RCPGs pour contrôler l'activité des MAPKs démontrent une incroyable hétérogénéité. En effet, diverses voies peuvent lier les RCPGs aux MAPKs, de façon dépendante ou indépendante des protéines G hétéro-trimériques, impliquant parfois les

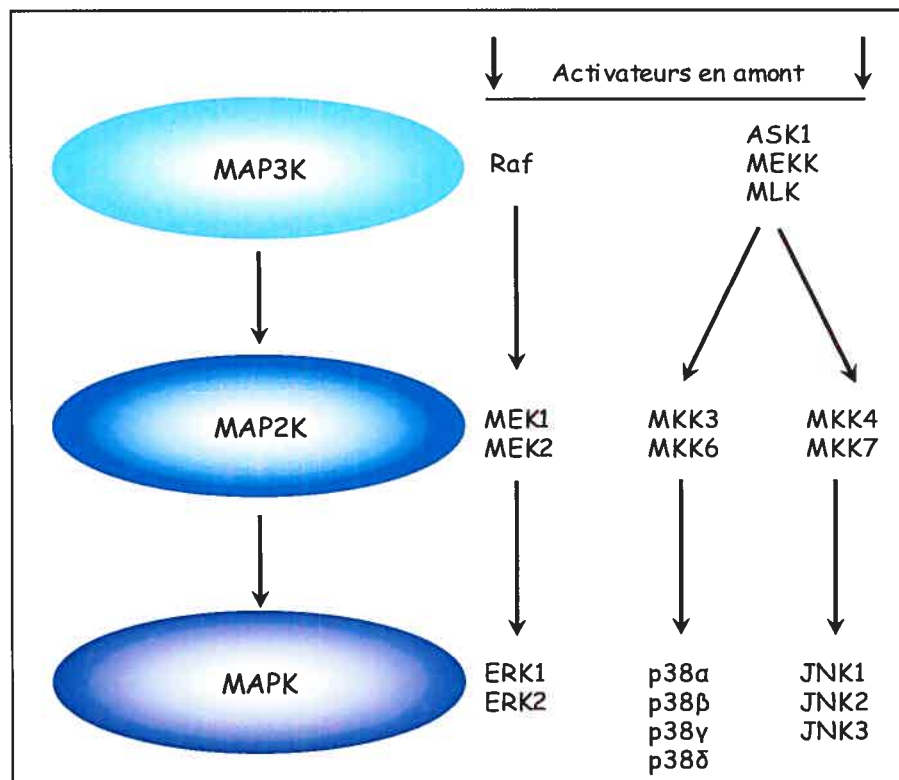
complexes d'adhésion focale ou la trans-activation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) (Figure 15) (Luttrell 2003).

### 1.5.1 Les MAPKs

Les cascades MAPK sont organisées en modules, composées d'une chaîne centrale de trois kinases sur résidus sérines/thréonines, chacune étant activée à son tour par phosphorylation, effectuée par la kinase présente en amont (Figure 14) (Pearson et al. 2001). Ainsi, les MAPKs sont phosphorylées et activées par les MAPK kinases (MAP2Ks), qui sont elles-mêmes phosphorylées et activées par les MAP2K kinases (MAP3Ks). Les cellules de mammifères contiennent trois principales classes de MAPK : les ERKs (ERK1/2), les JNKs ou protéines kinases activés par le stress (SAPK), et les MAPKs p38. La voie ERK est importante pour le contrôle de la transition G0-G1 du cycle cellulaire, et le passage des cellules en mitose ou méiose. Au contraire, les MAPKs JNK et p38 sont plutôt impliquées dans la régulation de l'arrêt de croissance, de l'apoptose, ainsi que de l'activation des cellules du système immunitaire et réticulo-endothéliales en réponse à une variété de stress hormonaux et environnementaux.

Il est maintenant reconnu que l'activation des MAPKs est contrôlée par des protéines additionnelles, non enzymatiques, fonctionnant comme échafauds pour deux kinases ou plus d'une même cascade (Burack and Shaw 2000; Pearson et al. 2001). Ces échafauds desservent au moins trois fonctions cellulaires: 1° augmenter l'efficacité de signalisation entre les kinases successives d'une cascade de phosphorylation, 2° assurer la fidélité de la signalisation en diminuant l'interférence entre les différentes cascades MAPK parallèles, et 3° cibler les MAPKs dans des sous-compartiments cellulaires spécifiques. La protéine Ste5 de *Saccharomyces cerevisiae* représente l'échafaud MAPK typique, liant chacune des trois composantes de la voie MAPK impliquée dans le cycle de reproduction de la levure dépendante des phéromones (Choi et al. 1994). Alors qu'aucun homologue

structural de Ste5 n'a été isolé chez les mammifères, plusieurs autres protéines pouvant lier deux composantes ou plus d'un module MAPK ont par contre été identifiées. Par exemple, les protéines interagissant avec JNK, JIP1 et JIP2, agissent comme échafauds de la voie JNK en interagissant avec ASK1, MKK4 ou MKK7, et JNK1 ou JNK2 (Yasuda et al. 1999). Et, comme mentionné plus haut, les  $\beta$ arrestines recrutées et activées par les RCPGs peuvent aussi servir d'échafauds pour certains modules MAPK (Figure 13B).



**Figure 14. Les modules MAPK.** Adapté de (Miller and Lefkowitz 2001).

À la gauche, représentation schématique de l'organisation des modules MAPK composés d'une MAP2K kinase (MAP3K), une MAPK kinase (MAP2K), et une MAP kinase (MAPK). Les signaux en amont mènent à l'activation de la MAP3K qui, à son tour, phosphoryle et active la MAP2K. Ensuite, la MAP2K activée phosphoryle et active la MAPK. À la droite, les principales molécules impliquées dans chaque cascade spécifique sont indiquées (ERK, p38 ou JNK).

Classiquement, les MAPKs activées sont relocalisées au noyau où elles phosphorylent et activent des facteurs de transcription, comme Elk-1, impliqués dans la synthèse d'ADN et division cellulaire (Pearson et al. 2001). Cependant, une liste grandissante de substrats membranaires, cytosoliques ainsi que du cytosquelette, des MAPKs ont aussi été identifiés. Ainsi, par la phosphorylation de leurs divers substrats protéiques, les MAPKs modulent la fonction cellulaire en produisant des effets très variés, autant à court qu'à long terme, comme la régulation de l'activité de plusieurs enzymes, de l'expression génique, de la prolifération ainsi que de la mort cellulaire. Les MAP3Ks sont stimulées par différents signaux, souvent dérivés de l'activité des RCPGs ou des RTKs. Ces derniers regroupent la majorité des récepteurs de facteurs de croissance, stimulant la différenciation ou la prolifération cellulaire principalement via la petite protéine G Ras, qui couple l'activité des RTKs à la cascade ERK1/2 (Figure 15). L'activation d'ERK1/2 par les RTKs sera décrite plus en détail dans la section 1.5.3.

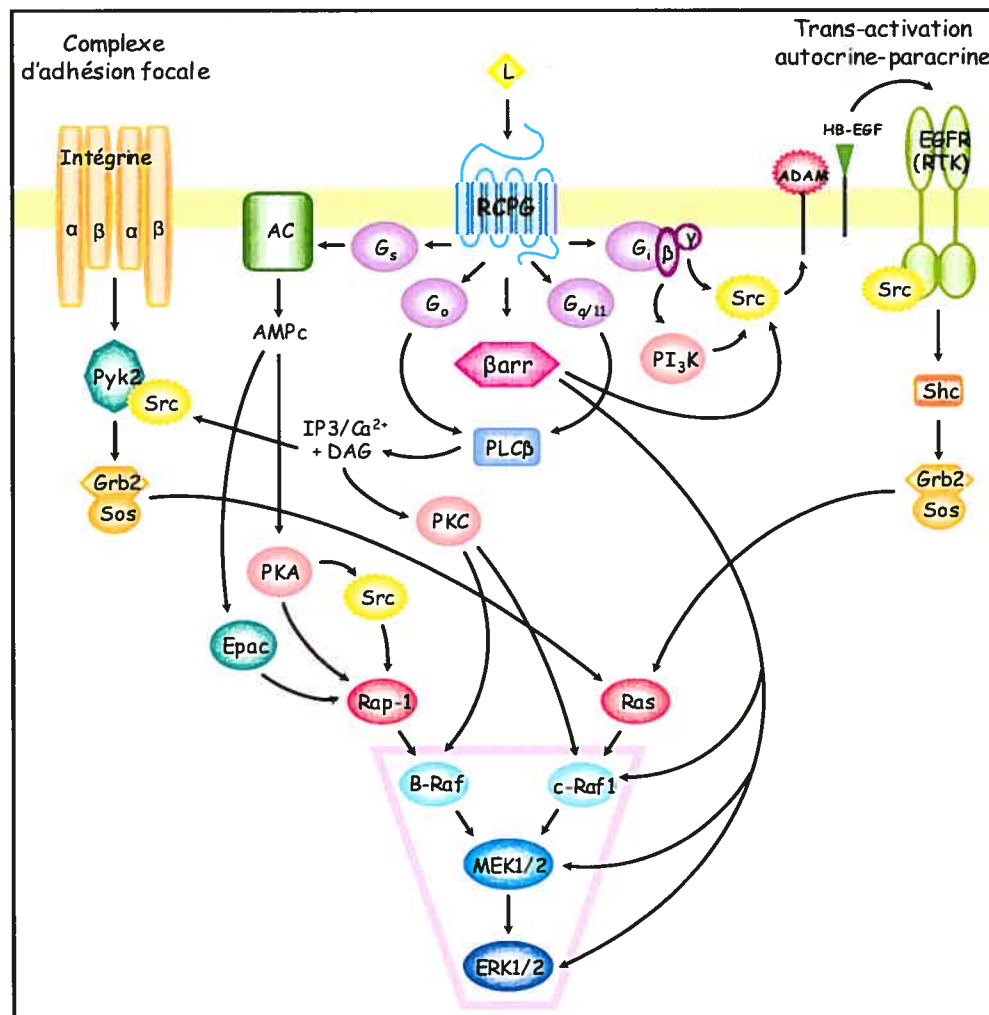
Suite à l'observation d'effets prolifératifs émanant de l'activation de plusieurs RCPGs, de récentes études révèlent l'implication de multiples voies de signalisation liant ces récepteurs à la voie ERK1/2 (Figure 15) (Marinissen and Gutkind 2001). Les mécanismes impliqués dans la stimulation de l'activité ERK1/2 par les RCPGs peuvent être regroupés selon qu'ils agissent seuls ou impliquent d'autres types de récepteurs.

### **1.5.2 Régulation de la voie ERK1/2 par les RCPGs dépendante de la production de seconds messagers**

Une forme d'activation des MAPKs par les RCPGs découle de la stimulation des effecteurs classiques des protéines G hétéro-trimériques, menant à la production de seconds messagers intra-cellulaires (principalement  $\text{Ca}^{2+}$  et AMPc; décrit dans la section 1.2.2) et à l'activation subséquente de protéines kinases dépendantes de ceux-ci (Luttrell and Luttrell 2003). Par exemple, l'activation de différents isoformes de PKC, suite à l'augmentation de

$\text{Ca}^{2+}$  intra-cellulaire induite par les RCPGs couplés à Gq/11 et Go, a souvent été impliquée dans le contrôle de la cascade ERK1/2 (Figure 15). Chez les fibroblastes, PKC $\alpha$  semble pouvoir activer Raf-1 directement par phosphorylation (Kolch et al. 1993), menant ainsi à l'activation d'ERK1/2 indépendante de Ras par les récepteurs  $\alpha_1\text{B}$ -adrénergique et M1 muscarinique couplés à Gq/11, (Hawes et al. 1995). Dans d'autres types cellulaires, notamment d'origine neuronale, l'activation de PKC dépendante de G $\alpha_o$  (van Biesen et al. 1996) mène plutôt à l'activation de l'isoforme B-Raf (Antonelli et al. 2000). Dans les cellules d'origine neuronale, un mécanisme additionnel semble contribuer à l'activation d'ERK1/2 de façon dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , impliquant l'activation de Pyk2. Celui-ci, un membre de la famille des kinases d'adhésion focale (FAK) dépendantes du calcium et de l'adhésion cellulaire, est activé de façon dépendante de Gq/11 et mène à l'activation d'ERK1/2 via Ras (Lev et al. 1995). Dans ce système, le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, libéré suite à la production d' $\text{IP}_3$  arbitré par la PLC $\beta$ , déclenche l'autophosphorylation de Pyk2, suivi du recrutement de c-Src menant ensuite à l'activation d'ERK1/2 dépendante de Ras (Dikic et al. 1996).

Le rôle de l'AMPC dans l'activation d'ERK1/2 induite par les RCPGs est plus complexe. Dans les fibroblastes, premièrement, la stimulation de l'adénylyl cyclase par les RCPGs couplés à Gs et la phosphorylation subséquente de Raf-1 par PKA inhibe ce premier et atténue l'activation d'ERK1/2 par les facteurs de croissance (Wu et al. 1993). Mais, il est maintenant clair que dans certains autres types cellulaires, l'AMPC et PKA peuvent directement déclencher l'activation d'ERK1/2 (Figure 15). Par exemple, dans des cellules d'origine neuronale ou hématopoïétique, l'activation de Gs induit la phosphorylation de Rap-1, une petite GTPase de la famille Ras, par PKA, et l'activation subséquente de l'isoforme B-Raf (Vossler et al. 1997;Grewal et al. 2000). Cette voie semble également pouvoir impliquer l'activation de kinases de la famille Src en aval de PKA (Schmitt and Stork 2002). De plus, des études, rapportant l'activation de la Rap-1 GEF Epac par liaison directe d'AMPC, ont mis en évidence la possibilité d'un mécanisme direct pour la



**Figure 15. Un réseau complexe de signaux dérivés des RCPGs régule l'activité de la cascade ERK1/2.** Adapté de (Luttrell 2003).

La stimulation des RCPGs résulte en l'activation de plusieurs protéines G hétérotrimériques affectant l'activité d'ERK1/2. Les signaux générés par les protéines kinases dépendante des seconds messagers, comme PKA et PKC, et par la l'interaction entre les voies des RCPGs et celles des RTKs ou intégrines regroupées aux points d'adhésion focaux, convergent en les isoformes de Raf, c-Raf-1 et B-Raf, au sommet du module ERK1/2.

stimulation de Rap-1 dépendante de l'AMPC (de Rooij et al. 1998). Ainsi, selon l'isoforme de Raf présent, les RCPGs peuvent stimuler ou inhiber l'activité ERK1/2 par la voie  $G\alpha_s$ -AMPC-PKA.

Un troisième processus semble impliqué dans l'activation d'ERK1/2 par les RCPGs de façon dépendante de l'AMPC, celui du changement de préférence de couplage récepteur-protéine G (Lefkowitz et al. 2002). Il a été montré que la phosphorylation par PKA de certains récepteurs couplés à Gs, notamment le  $\beta_2$ AR (Daaka et al. 1997) et le récepteur de prostacycline de souris (Lawler et al. 2001), diminue le couplage du récepteur à Gs en augmentant simultanément son affinité pour Gi/o. Par conséquent, des récepteurs classiquement couplés à Gs activent parfois la cascade ERK1/2 via une voie dépendante de Ras, orchestrée par les sous-unités  $G\beta\gamma$  dérivées de Gi/o. Ainsi, deux signaux opposés sont simultanément générés par la stimulation du  $\beta_2$ AR dans les fibroblastes, sous forme d'inhibition de l'activité ERK1/2 dépendante de  $G\alpha_s$ , et de sa stimulation dépendante du complexe  $G\beta\gamma$  (Crespo et al. 1995). Dans ce cas, le produit de la stimulation du  $\beta_2$ AR sur l'activité ERK1/2 reflète l'équilibre entre ces deux mécanismes de régulation opposés. Le mécanisme par lequel les sous-unités  $G\beta\gamma$  stimulent l'activité ERK1/2 qui est le mieux décrit consiste en la trans-activation des RTKs. Le rôle de ceux-ci dans le contrôle de l'activité ERK1/2 par les RCPGs ainsi que les différents mécanismes moléculaires impliqués menant à la trans-activation de ces récepteurs sera maintenant abordée plus en détail.

### **1.5.3 La trans-activation des RTKs**

Un mécanisme de signalisation fondamentalement distinct des autres mentionnés jusqu'à présent explique l'activation d'ERK1/2 stimulée par les RCPGs dans plusieurs types cellulaires. Celui-ci implique une combinaison de la signalisation des RCPGs et celle de RTKs classiques, fréquemment les récepteurs du facteur de croissance épidermique

(EGFR) mais également ceux du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) et du facteur de croissance neuronal (NGFR) (Ferguson 2003). Dans cette voie, la stimulation d'un RCPG mène à l'activation d'un RTK, qui à son tour active ERK1/2, de façon parfois dépendante de son internalisation.

Dans le cas de l'EGFR, sa trans-activation semble souvent résulter de la production du ligand EGF à la surface cellulaire, stimulée par les RCPGs, et de l'activation du RTK de façon **autocrine** (Prenzel et al. 1999). Chaque ligand connu de l'EGFR (EGF, facteur de croissance transformant  $\alpha$ , EGF liant l'héparine (HB-EGF), amphiréguline,  $\beta$ -celluline et épiréguline) est synthétisé en précurseur membranaire, qui est ensuite protéolysé pour produire un facteur de croissance soluble (Riese and Stern 1998). Le clivage d'au moins un d'entre eux, HB-EGF, a été démontré en réponse à la stimulation d'un RCPG. La libération du complexe  $G\beta\gamma$  induit l'activation d'une métalloprotéase associée à la matrice (MMP) qui libère ensuite le facteur de croissance (Figure 15) (Prenzel et al. 1999). La liaison du HB-EGF aux EGFRs induit la dimérisation des récepteurs et leur trans-phosphorylation subséquente sur des résidus tyrosines parmi leurs domaines intra-cellulaires, suivi du recrutement de protéines adaptatrices à domaines SH2, comme Shc. Ces protéines servent alors de site d'arrimage pour plusieurs autres protéines de signalisation, parmi lesquelles la protéine adaptatrice Grb2 suivi de SOS, une Ras GEF, sont classiquement recrutées et mènent à l'activation subséquente de Ras, qui initie alors la cascade Raf-MEK-ERK1/2 en favorisant la translocation membranaire et l'activation de Raf-1 (Figure 15 et 16).

Les effecteurs des sous-unités  $G\beta\gamma$  régulant la libération de HB-EGF demeurent indéterminés, bien que la  $PI_3K$  et des protéines tyrosine kinases de la famille Src ont chacune été proposées comme intermédiaires en début de la voie (Pierce et al. 2001). La protéolyse du précurseur HB-EGF semble être effectuée par des MMPs de la famille ADAM, dont plusieurs possèdent des motifs consensus de liaison aux domaines SH3 en leurs domaines intra-cellulaires pouvant être impliqués dans l'interaction avec les kinases Src (Schlondorff and Blobel 1999).



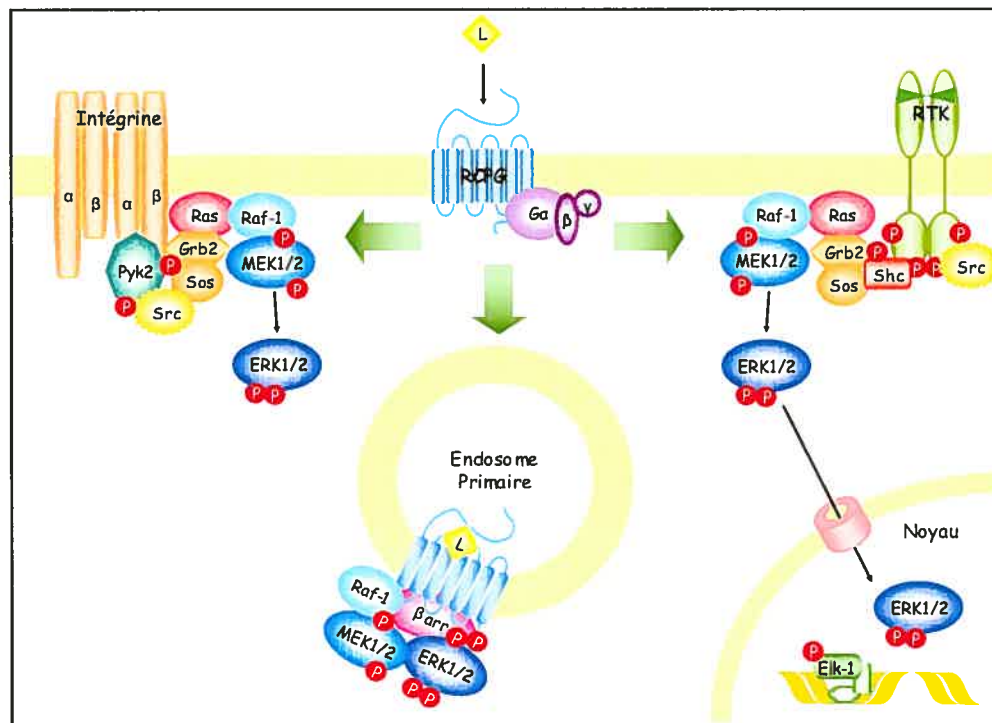
D'autres mécanismes intra-cellulaires peuvent également contribuer à la trans-activation des RTKs par les RCPGs car, par exemple, la trans-activation de l'EGFR par les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>2A</sub> n'est pas affectée par des inhibiteurs de métalloprotéases (Grewal et al. 2001), et aucun modèle de relâche de PDGF à partir d'un pro-ligand membranaire n'a été décrit pour la trans-activation du PDGFR. Quelques autres mécanismes menant à la trans-activation des RTKs par les RCPGs ont alors été proposés, même s'il ne sont très bien compris. Entre autres, l'activation de **protéines tyrosine kinases** comme c-Src, impliquant possiblement leur interaction avec  $\beta$ arrestine, semble pouvoir mener à l'activation des RTKs par phosphorylation directe de résidus tyrosine clés de leurs domaines intra-cellulaires (Luttrell et al. 1997). Aussi, des études suggèrent que la formation de **complexes RCPG/RTK** représente, dans certains cas, une entité signalétique nécessaire à l'intégration des signaux provenant de l'activation de ces deux types de récepteurs (Pyne et al. 2003). En effet, il a été suggéré que le PDGFR $\beta$  ainsi que le récepteur de haute affinité pour le NGF, Trk A, forment des complexes stables avec des RCPGs, les récepteurs de la sphingosine-1-phosphoate et de l'acide lysophosphatidique respectivement, où sont également retrouvés GRK2 et  $\beta$ arrestine 1. De plus, ces complexes semblent mener à l'activation d'ERK1/2 de façon dépendante de G $\beta\gamma$ , probablement impliqué dans le recrutement de GRK2 au récepteur suivi de  $\beta$ arrestine, ainsi que de l'endocytose du complexe lui-même dépendent de c-Src (Waters et al. 2005). En effet, plusieurs études suggèrent un rôle pour l'internalisation des RTKs, conjointement ou indépendamment des RCPGs, dans l'activation d'ERK1/2 suivant la trans-activation (Grimes and Miettinen 2003). La compartimentalisation des RTKs trans-activés ainsi que des RCPGs dans les endosomes représente alors un mécanisme potentiel servant à contrôler l'emplacement, la durée, et la spécificité de leur signalisation.

#### 1.5.4 Rôle de l'échafaudage des MAPKs sur leur localisation et fonction

La grande hétérogénéité des voies de signalisation liant les RCPGs aux MAPKs soulève inévitablement la question de redondance fonctionnelle entre celles-ci. Toutefois, plusieurs résultats expérimentaux suggèrent que cela n'est pas le cas. Plutôt, différents mécanismes d'activation des MAPKs semblent favoriser la formation de réserves distinctes de kinases actives. En ce qui concerne la cascade ERK1/2, trois mécanismes en particulier semblent avoir des rôles spécialisés: la trans-activation de l'EGFR, l'activation d'ERK1/2 lié à la  $\beta$ arrestine échafaud, et l'activation d'ERK1/2 dépendante de l'adhésion focale orchestrée par Pyk2 (Figure 16) (Luttrell 2003a).

Parce qu'ils peuvent être activés en réponse à un très grand spectre de signaux différents, de la stimulation des RCPGs et récepteurs des cytokines aux esters de phorbol et radiations ionisantes, les **EGFRs** représentent un point de convergence pour divers stimuli mitogéniques (Carpenter 2000). Dans certains cas, la réponse mitogénique issue de la stimulation des RCPGs, notamment l'AT<sub>1a</sub>R (Murasawa et al. 1998) et le NK<sub>1</sub>R (Castagliuolo et al. 2000), est en effet attribuée aux signaux dépendants de Ras provenant de la trans-activation des EGFRs. Au contraire, l'activation d'ERK1/2 dépendante de  **$\beta$ arrestine** ne semble pas fournir un stimulus mitogénique. Comme mentionné précédemment, les  $\beta$ arrestines peuvent fonctionner comme échafauds pour certains modules MAPK, et il a été montré que l'activation d'ERK1/2 par certains récepteurs, par exemple PAR2, NK<sub>1</sub>R et AT<sub>1a</sub>R, coïncide avec l'assemblage de complexes multi-protéiques comprenant le récepteur,  $\beta$ arrestine, et ERK1/2 activé (Defea et al. 2000b; Luttrell et al. 2001). De plus, ces complexes ne semblent pas se dissocier au moment de l'activation d'ERK1/2 et peuvent être isolés. Comme les complexes RCPG- $\beta$ arrestine sont internalisés et ciblés aux endosomes, l'activation d'ERK1/2 dépendante de  $\beta$ arrestine mène à la formation d'une réserve cytosolique de cette MAPK qui peut être visualisée en association

avec les endosomes (Defea et al. 2000a; Luttrell et al. 2001). La pertinence fonctionnelle de ces complexes RCPG- $\beta$ arrestine internalisés n'est pas bien comprise. Toutefois, plusieurs protéines impliquées dans la signalisation par les RCPGs, comme  $\beta$ arrestine-1 (Lin et al. 1999), GRK2 (Pitcher et al. 1999; Elorza et al. 2000) et la protéine interagissant avec la sous-unité  $G\alpha$  (GAIP) (Ogier-Denis et al. 2000), sont des substrats pour ERK1/2. Un des rôles d'ERK1/2 lié à  $\beta$ arrestine pourrait ainsi être la régulation de la fonction des RCPGs.



**Figure 16. Spécialisation fonctionnelle de différents mécanismes d'activation d'ERK1/2 par les RCPGs.** Adapté de (Luttrell 2003).

L'interaction entre la signalisation des RCPGs et les RTKs trans-activés produit une réserve d'ERK1/2 activés pouvant être re-localisés au noyau et promouvoir une réponse mitogénique. Au contraire, l'activation d'ERK1/2 via les échafauds  $\beta$ arrestine et complexes d'adhésion focale peut favoriser la formation de réserves cytoplasmiques d'ERK1/2 contribuant à la régulation de l'activité des récepteurs, de l'adhésion cellulaire et de la réorganisation du cytosquelette.

L'attachement des intégrines à la matrice extracellulaire mène à la formation de **points d'adhésion focale**. Le recrutement et l'activation de FAK à ces points lors de leur formation résultent en le recrutement de Grb2-Sos et l'activation d'ERK1/2 dépendante de Ras (Luttrell 2003). Dans certains types cellulaires, ces ERK1/2 activés sont localisés spécifiquement au point d'adhésion focale, où il participe à la régulation de l'adhésion cellulaire et à l'organisation du cytosquelette (Fincham et al. 2000). Un rôle similaire peut ainsi être accompli par Pyk2, qui arbitre l'activation d'ERK1/2 dépendante du  $Ca^{2+}$  dans les cellules adhérentes en réponse à l'activation des RCPGs.

Ainsi, le mécanisme prédominant par lequel un RCPG donné mène à l'activation des MAPKs semble varier selon le type de cellule, et déterminé par le contexte cellulaire dans lequel le récepteur est exprimé. En activant des réserves d'ERK1/2 différemment localisées dans la cellule, que ce soit dans le noyau, à la membrane plasmique aux points d'adhésion focale, ou dans les endosomes, les différents mécanismes de signalisation vont alors déterminer si ERK1/2 sert de façon prédominante à réguler l'expression génique, contrôler le réarrangement du cytosquelette et la motilité cellulaire, ou bien influencer la régulation du récepteur.

## **1.6 Régulation de la fonction des RCPGs et modifications post-traductionnelles: rôle de la palmitoylation**

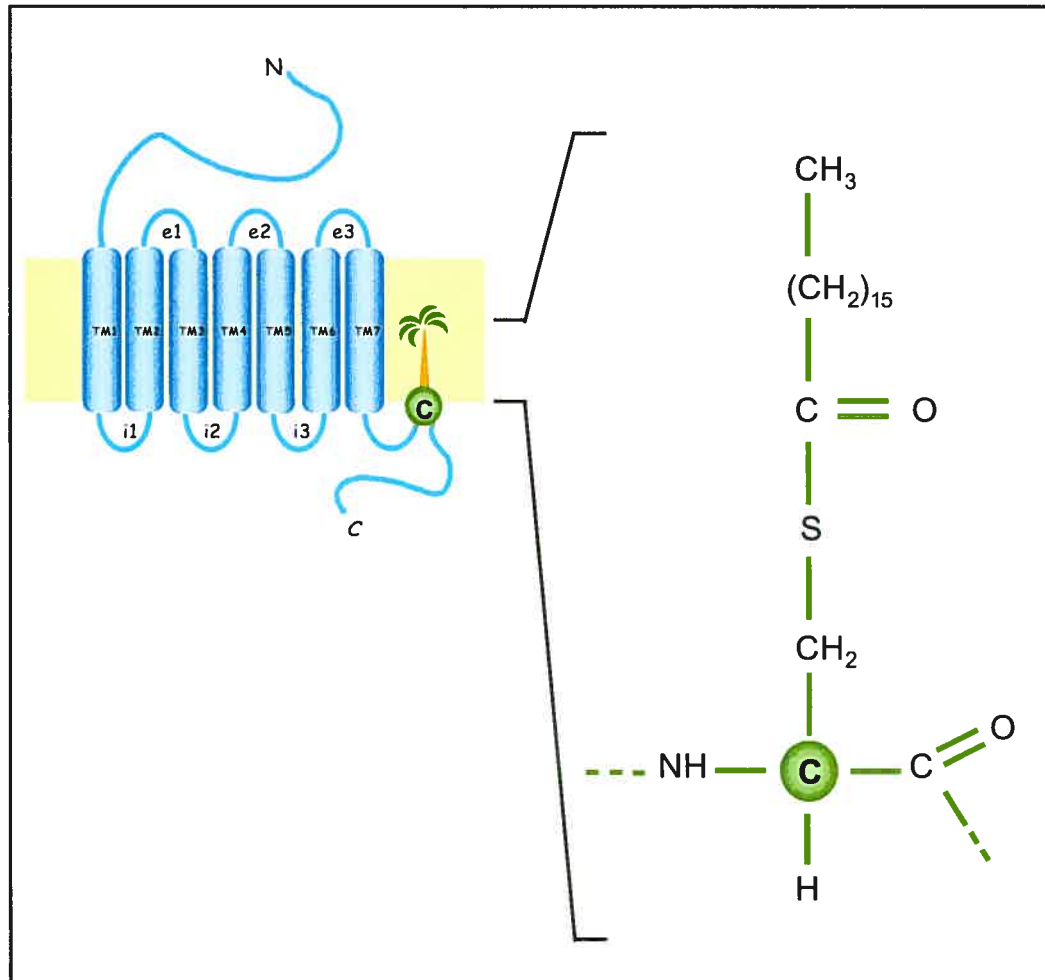
Comme illustré par les multiples mécanismes de signalisation utilisés par les RCPGs pour activer les MAPKs, en plus de l'activation d'effecteurs classiques des protéines G hétéro-trimériques, la fonction des RCPGs peut être complexe et nécessite une régulation très étroite. Celle-ci est surtout effectuée par le biais de modifications post-traductionnelles réversibles comme la phosphorylation, l'ubiquitination et possiblement la palmitoylation. Parmi ces mécanismes de régulation, les rôles de la phosphorylation et de l'ubiquitination

dans la désensibilisation et/ou régulation négative des RCPGs ont été bien caractérisés et décrits en détail dans la section 1.3. Par ailleurs, même si la palmylation semble être une modification post-traductionnelle très conservée parmi les RCPGs, son rôle dans la régulation de la fonction de ces récepteurs demeure questionné.

### 1.6.1 La palmylation des RCPGs

Comme mentionné précédemment, la palmylation est une modification post-traductionnelle, résultant de l'ajout d'un palmitate (acide gras à 16 carbones) sur résidus cystéine, via un lien thioester, qui semble principalement survenir au niveau de la queue C-terminale des RCPGs (Figure 17).

La palmylation a été observée pour la première fois chez la rhodopsine, où la présence d'une à deux moles de palmitate par mole de rhodopsine bovine fut démontrée par l'incorporation de [<sup>3</sup>H]palmitate dans des préparations de segments externes de bâtonnets (O'Brien and Zatz 1984). Des études physico-chimiques, portant sur un fragment peptidique du domaine C-terminal de la rhodopsine bovine, ont ensuite permis l'identification des cystéines 322 et 323 de la queue cytoplasmique comme les sites de palmylation de cette protéine (Ovchinnikov et al. 1988). La comparaison des séquences de plusieurs RCPGs permet alors de constater qu'au moins une des deux cystéines palmylées chez la rhodopsine est conservée dans une position équivalente de la queue cytoplasmique chez la majorité des récepteurs de la famille A, dont la palmylation fut confirmée pour plusieurs d'entre eux par la suite (Tableau II) (Qanbar and Bouvier 2003).



**Figure 17. Représentation schématique d'un RCPG palmitylé.**

Adapté de (Bouvier et al. 1995).

La figure illustre comment la palmitoylation des RCPGs sur résidu cystéine en leur domaine C-terminal peut mener à la formation d'une quatrième boucle intra-cellulaire. La structure chimique du palmitate lié par un thioester, ainsi que sa chaîne de carbones hydrophobe insérée dans la bicouche lipidique de la membrane sont également représentées.

Récepteurs	Alignement de séquence en C-terminal	Références
* bRho	310 NKWFRNCMVTTLCCGKNPLGDD EASTTVSKTETSQVAPA	(Ovdinnikov Y et al 1988)
h $\beta_1$ AR	388 DFRKAFQGLLCCARRAARRRHTATHGDRPPR ASGCLARPGP...	
* h $\beta_2$ AR	329 PDFRIAFQELLCLRSSSLKAYGNGYSSNGNGEQSGYHVEQ...	(O'Dowd et al 1989)
h $\beta_3$ AR	350 PDFRSAFRRLRCGRRLPPECAAAAR PALFSGVPAARSSP...	
h $\alpha_1$ AAR	416 SREFKRAFRLRLRCQRRRRRRRPLWRVYGHWRASTSGLR...	
* h $\alpha_1$ BAR	351 SSKFRAFVRLGRCGRRRRRRRRLGCAYTYRPWTRGGS...	(Stevens et al 2001)
h $\alpha_1$ CAR	330 SQEFKAFQNVLRIOCLRRLKQSSKHALGYTLHPPSQAVEGQH...	
* h $\alpha_2$ AAR	430 NHDFRRAFRRILCRGDRKRIV	(Kennedy et Limbid 1993)
h $\alpha_2$ BAR	431 NQDFRRAFRRILCRPWQTAW	
* hD <sub>1</sub> R	334 NADFRKAFSTLLGCYRLCPATNNAIETVSINNGAAMFSSH...	(Jin et al 1999)
* hD <sub>2</sub> R	430 IEFKAFKILKILHC	(Grunewald et al 1996)
h5HT <sub>1A</sub>	404 NKDFQNAFKKIKCNFCRQ	(Papoucheva et al 2004)
* h5HT <sub>1B</sub>	374 EDFKQAFHKLIRFKCIS	(Ng et al 1993)
h5HT <sub>2A</sub>	385 NKTYRSAFSR YIQCYKKNKPLQLLVNTIPALAYKSSQLQM...	
h5HT <sub>2B</sub>	384 NKTFRDAFGRYITCNRYRATKSVKTLRKRSSKIYFRNPMAENSK...	
h5HT <sub>2C</sub>	373 NKIYRRAFSNYLR CNYKVEKPPVRQIPRVAVALSGRELNVN...	
* m5HT <sub>4A</sub>	318 SFRR AFLIILCCDDERYKRPPILGQTVPCSTTTINGSTHVLRYTVL...	(Ponimaskin et al 2001)
hM1ACh	415 NKAFRDTFRLLLLCRWDKRWRKIPKRPQSVHRTPSKRC	
* hM2ACh	440 NATFKKTFKHLMLCHYKNIGATR	(Hayashi MK et Haga T 1997)
hM3ACh	456 NATFKKTFRHLLLCQYRNIPTAR	
hM4ACh	547 NTFRTTFKTLLLCQODKRRKRKQQYQQRQSVIFHKR VPEQAL	
hM5ACh	499 NR TFRKTFKMLLLQRWKKKKVEEKLYWQGNKLP	
* mGluR4	848 HPEQNVPKRKRSLKAVTAATMSNKFTQKGNFRPNGEAKSEL...	(Alaüf et al 1995)
hmGluR4	848 HPEQNVPKRKRSLKAVTAATMSNKFTQKGNFRPNGEAKSEL...	
hPGE <sub>EP2</sub>	334 RKTVLSKAIKIKCLFCRIGCSRRRESGQHCSDSQR TSSAMSGH...	
hPGE <sub>EP3</sub>	330 RKILLRKFQOIRYHTNNYASSSTSLPCQSSSLMWSHDLER	
hNK <sub>1</sub>	310 DRFR LGFKAAFRCCPF SAGDYEGLEMKSTRYLQYQGSVYK...	
hNK <sub>2</sub>	311 NHRFRSGFR LAFRCQPPWVTPTKEDKLELTP TTSLSSTRVNRCHT...	
hNK <sub>3</sub>	360 NKRFRAGFKRAFRCQPFKVVSSYVELEKTR FHPNRQSSMYT...	
hPAF	297 TKFRKHLTEKFYSMRSSRCKSRATTDVTEVVVFPNQIPGNSL...	
hV1aR	355 SGHLLQDCVQSFPCQONMKEKFNKEDTDSMSRRQTFYSNNR...	
* rV1aR	358 SGHLLQDCVQSFPCQHSMAQKFAKDDSDMSRKTDFLF	(Hawtin et al 2001)
hV1bR	342 NSHLLPRPLRHLACC GGQPRMRR LSDGSLSRHTLLTRSSC...	
* hV2R	328 SSSVSELRSLLCCARGRTPP ASLGPQDESCTTASSSLAKDTSS	(Sadeghiet al 1997)
hOTR	333 TGHFLHEL VQRFLCCSASYLKRRLGETSASKKSNSSSVLSHR...	
hNPY1	323 KNFQRDLQFFNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVS KLSKAS...	
hNPY2	326 MNSNYRKAFLSAFRCQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVNKNS...	
h $\mu$ OR	340 DENFKRCFRFCIPTSSNIEQQNSTIRQNTRDHPSTANTVDRT...	
* r $\mu$ OR	340 DENFKRCFRFCIPTSSNIEQQNSTIRVQNTREHPSTANTVDRT...	(Chen et al 1998)
h $\delta$ OR	324 ENFKRCFRGLCRKPCGRPDSSFSRPREA TARERVACTP SDG...	
h $\kappa$ OR	324 DENFKRCFRDFCPLKMRNERQSTSRVRNTVQDPAYLRDIDG...	
* rLHhCG	616 KAFQRDFLLLSRFGCCKRR AELYRKRKFSA YTSNCKNGFP...	(Kawate et Menon 1994)
* hLHhCG	628 KTRQRDFLLLSKFGCCKRR AELYRKRKFSA YTSNCKNGFTG...	(Zhu et al 1995)
hPAR1	375 SEQRYVSIILCCKESSDPSSYNSSGQLMASKMDTCSSNLNNSL...	
* hTSHR	664 KAFGRDVFILLSKFGICRQAQA YRGQVPPKNSTDIK VQKVT...	(Tanaka et al 1998)
hTRHR	216 RILFLNPIPSDPKENSKTWKN DSTHQNTINLVNTSNRCFNSTV...	
* hET <sub>A</sub> R	374 KKFKNCFQSC LCCCYQSKSLMTS VPMNGT SIQWKNHDQN...	(Hostmeyer et al 1996)
* hET <sub>B</sub> R	390 KRFKNCFKSC LCCWQSFEEKQSLESLEEKQSC LKFKANDH...	(Okamoto et al 1997)
* hA <sub>1</sub> AR	299 FLKIWNDFRCQAPPIDEDLPEERPD	(Gao et al 1999)
* rB2R	342 KRFRKKSREYVYQAI CRKGGCMGESVQMENSMTGLR TSISVD...	(Sokic et al 1999)
* hCCR5	301 GEKFRNYLLVFFQKHIAKRFCKCCSIFQQEAPERASSVYTRST...	(Blampain C et al 2001)
* cH2R	288 ATLNRDFRTAYQQLFR CRPASHNAQETSLRSNSSQLARNQSR...	(Fukushima et al 2001)

**Tableau II. Alignement de séquence du domaine C-terminal de certains RCPGs.**

Les séquences sont alignées en commençant par le premier résidu de la queue C-terminale prédite pour chaque récepteur. **C** indique les cystéines retrouvées parmi les 20 premiers acides aminés de la queue C-terminale; celles en rouge ont été identifiées comme site de palmylation; ... indique la présence d'une séquence additionnelle. \* La palmylation a été confirmée expérimentalement.

De par sa nature hydrophobe, le palmitate s'insère profondément dans la membrane plasmique, contribuant ainsi à l'ancrage des protéines solubles à la membrane (Resh 1999). Avec leurs sept passages trans-membranaires, la localisation des RCPGs à la membrane ne peut être attribuée à cette modification post-traductionnelle. Toutefois, des études, effectuées avec un analogue fluorescent de l'acide palmitique, confirmèrent que les palmitates liés à la rhodopsine sont bien enfouis dans la bicouche lipidique de la membrane (Moench et al. 1994), et mènent à la formation d'une quatrième boucle intra-cellulaire (Figure 17). Plus récemment, la structure cristalline de la rhodopsine bovine (Palczewski et al. 2000) révéla que cette quatrième boucle est, en fait, une hélice amphipatique  $\alpha$  délimitée par la membrane plasmique en N-terminal et les sites de palmylation en C-terminal (Figure 2A). Le fait que la palmylation de la queue cytoplasmique des RCPGs favorise l'ancrage de ce domaine dans la membrane, suggère que sa régulation pourrait avoir d'importantes répercussions sur l'organisation tridimensionnelle de cette région du récepteur.

### 1.6.2 La dynamique de la palmylation

La palmylation est une modification post-traductionnelle réversible, sujette à une régulation dynamique et indépendante de la synthèse protéique (Smotrys and Linder 2004). En effet, par l'analyse de la vitesse de renouvellement du palmitate sur les protéines, des études ont mis en évidence la nature dynamique de la palmylation (McIlhinney et al. 1985; Magee et al. 1987). Le fait que, pendant sa durée de vie, une protéine puisse subir de nombreux cycles de palmylation et de dépalmylation suggère que cette modification post-traductionnelle, tout comme la phosphorylation, peut représenter un mécanisme de régulation cellulaire.

Le cycle de palmylation-dépalmylation rapide des RCPGs a été montré pour la première fois par l'étude de la palmylation du  $\beta_2$ AR (O'Dowd et al. 1989). Il s'avère que la régulation dynamique de la palmylation du  $\beta_2$ AR est intimement liée à son état



d'activation, puisque la stimulation du récepteur par l'agoniste isoprotérénol mène à l'accélération des cycles d'acylation et de déacylation, et promeut la dépalmytation du récepteur (Loisel et al. 1996;Loisel et al. 1999). L'existence des cycles d'acylation-déacylation a aussi été montrée pour la rhodopsine bovine (St Jules and O'Brien 1986), l' $\alpha_2$ AR (Kennedy and Limbird 1994) et le D<sub>1</sub>R (Ng et al. 1994), ainsi que pour plusieurs autres protéines palmylées impliquées dans la signalisation des RCPGs (Qanbar and Bouvier 2003), ou autres (Smotrys and Linder 2004).

Une régulation dynamique de l'acylation des protéines présuppose l'existence d'enzyme(s) membranaires ou cytosoliques pouvant catalyser leur palmytation (palmyl-transférase) et/ou leur dépalmytation (palmyl-thioestérase). Toutefois, les résultats expérimentaux suggérant l'existence de telles enzymes pouvant agir sur les RCPGs ne sont, pour l'instant, que de nature indirecte. Des activités enzymatiques capables de palmyteler plusieurs protéines, incluant la rhodopsine bovine (Veit et al. 1998), ont été observées, mais aucune palmyl-transférase n'a été purifiée à ce jour. D'un autre côté, deux thioestérases capables de dépalmyteler Ras et G $\alpha$  ont pu être purifiées : la protéine palmyl-thioestérase 1 (Camp and Hofmann 1993) et la protéine acyl-thioestérase 1 (Duncan and Gilman 1998). Cependant, aucune thioestérase agissant sur les RCPGs n'a encore été identifiée.

Le fait qu'aucun enzyme n'est été identifié comme palmyl-transférase mène plusieurs groupes à considérer la possibilité que la palmytation survienne de façon spontanée. Et, en effet, le transfert spontané de palmitate, sur des peptides et protéines effectué *in vitro* en l'absence d'enzyme, a été décrit et identifié comme une auto-acylation (Bizzozero.O.A. et al. 1987;Yoshimura et al. 1987;Ross and Braun 1988). Depuis, l'auto-palmytation de plusieurs autres protéines a été rapportée (Qanbar and Bouvier 2003). Cela n'écarte pas la possibilité que la palmytation soit régulée car, en théorie, il suffit de réguler une étape d'une réaction réversible afin de réguler la réaction complète. Si la palmytation survient spontanément, c.-à-d. de façon non enzymatique, la régulation de la réaction inverse devrait suffire à réguler le processus dynamique de la palmytation. De plus, même

si l'intégrité structurale des protéines ne semble pas requise, l'auto-acylation ne se produit pas au hasard sur n'importe quel peptide contenant une cystéine. En effet, des études révèlent que les résidus d'acides aminés, entourant la cystéine palmylée, influencent la vitesse et l'efficacité de la réaction (Bizzozero et al. 2001; Belanger et al. 2001), avec certains résidus la favorisant et d'autres inhibant la palmylation. Utilisant un peptide dérivé du  $\beta_2$ AR, une étude effectuée *in vitro* démontre ainsi que des résidus basiques et hydrophobes promeuvent l'auto-acylation, alors que des résidus acides sont inhibiteurs (Belanger et al. 2001).

### 1.6.3 Rôle fonctionnel de la palmylation des RCPGs

En dépit de l'étonnante conservation de la palmylation des RCPGs et du nombre grandissant d'études effectuées sur ce sujet, aucun rôle général n'a pu y être attribué à ce jour. En effet, la palmylation des RCPGs semble affecter de manière différentielle plusieurs processus biologiques, incluant leur expression et leur acheminement à la surface cellulaire, leur efficacité de couplage aux protéines G hétéro-trimériques, leur phosphorylation et désensibilisation, leur internalisation, ainsi que leur régulation négative (Qanbar and Bouvier 2003).

Entre autres, la mutation des sites de palmylation de certains récepteurs semble affecter leur **expression** à la membrane plasmique. Ceci a été rapporté pour les récepteurs CC des chimiokines de type 5 (CCR5) (Blanpain et al. 2001a; Percherancier et al. 2001), H<sub>2</sub> histaminique (H<sub>2</sub>R) (Fukushima et al. 2001), V<sub>2</sub>R (Schulein et al. 1996; Sadeghi et al. 1997), de la thyrotropine (TSHR) (Kosugi and Mori 1996; Murasawa et al. 1998), et de l'hormone lutéinisante/choriogonadotropine humaine (LH/hCG) (Zhu et al. 1995). Un rôle de la palmylation des RCPGs dans la maturation de ces récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique est ainsi une possibilité. Toutefois, même si quelques études suggèrent que celle-ci survienne au niveau du réticulum endoplasmique, des évidences provenant d'autres

études pointent plutôt en direction des compartiments golgiens (Qanbar and Bouvier 2003). Les effets observés pourraient alors être simplement dus à la mutation de la cystéine en soit, plutôt que de la perte de palmylation, et que celle-ci soit impliquée dans le repliement de la protéine (Gromiha and Selvaraj 2004).

Dans le cas du  $\beta_2$ AR, la mutation du site majeur de palmylation (cystéine 341) conduit au **découplage** fonctionnel du récepteur (O'Dowd et al. 1989b;Moffett et al. 1993). Une telle perte de couplage aux protéines G hétéro-trimériques résultant de la perte de palmylation a également été observée pour les récepteurs  $ET_A$ R (Horstmeyer et al. 1996),  $ET_B$ R (Okamoto et al. 1998) et  $D_1$ R (Jensen et al. 1995), ainsi que les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine m2 (Hayashi and Haga 1997), de la somatostatine de type 5 (SSTR5) (Hukovic et al. 1998), et 5-hydroxytryptamine de type 1A (Papoucheva et al. 2004). De façon intéressante, dans certains cas, la perte de palmylation semble avoir différents effets sur les diverses voies de signalisation engagées par un récepteur. Un tel couplage sélectif a été montré pour l' $ET_A$ R, où la mutation des sites de palmylation de ce récepteur n'affecte pas son couplage à Gs et l'activation de l'adénylyl cyclase, tandis que le récepteur mutant non-palmylé est incapable de stimuler Gq et de mener à l'activation de la PLC et ERK1/2, contrairement à l' $ET_A$ R sauvage (Horstmeyer et al. 1996;Cramer et al. 2001).

Pour le  $\beta_2$ AR, la perte de couplage du mutant non palmylé semble être due à une augmentation de son état de **phosphorylation** (Moffett et al. 1993). En effet, un  $\beta_2$ AR mutant dépourvu de palmylation présente une hyper-phosphorylation de base. Comme les sites de phosphorylation par PKA sont situés très près du site de palmylation du  $\beta_2$ AR, il a été suggéré que les sites de phosphorylation ne sont pas accessibles à la kinase dans les conditions basales, mais qu'ils le deviennent dans le récepteur non palmylé (Moffett et al. 1996). En considérant l'observation que la stimulation du  $\beta_2$ AR par un agoniste mène à sa dépalmylation (décrit ci haut), le modèle d'une régulation concertée des deux modifications post-traductionnelles a été suggéré (Moffett et al. 2001). La palmylation

peut ainsi être vue comme un commutateur moléculaire régulant l'accessibilité des sites de phosphorylation impliqués dans la désensibilisation du récepteur, et non le couplage avec la protéine G hétéro-trimérique. Une telle augmentation de la phosphorylation basale résultant de la mutation de présumés sites de palmylation a aussi été observée pour les récepteurs A<sub>3</sub> de l'adénosine (Palmer and Stiles 2000) et 5-HT<sub>4A</sub> (Ponimaskin et al. 2005).

Une observation similaire, suggérant un lien fonctionnel entre la palmylation et la phosphorylation, provient d'études structurales effectuées en spectroscopie de masse, où la palmylation et la phosphorylation de sites voisins sur le B2R semblent s'exclure mutuellement. Ceci supporte alors l'hypothèse que la phosphorylation du récepteur peut seulement survenir après dépalmylation (Soskic et al. 1999). Aussi, à l'inverse des observations précédemment décrites, des récepteurs V1a de la vasopressine (V1aR) (Hawtin et al. 2001) et CCR5 (Kraft et al. 2001) mutants non palmylés présentent une réduction de la phosphorylation induite par l'agoniste. Pour ces deux récepteurs, la diminution de la phosphorylation est accompagnée par une réduction d'internalisation, supportant l'hypothèse d'une régulation coordonnée de la palmylation, de la phosphorylation, et de l'endocytose.

Comme pour la phosphorylation et la désensibilisation, plusieurs récepteurs mutants dépourvus de palmylation présentent un défaut d'**endocytose** induit par l'agoniste. Ceci a été observé pour les récepteurs SSTR5 (Hukovic et al. 1998), CCR5 (Kraft et al. 2001), B2R (Pizard et al. 2001), de l'hormone de relâche des thyrotropines (TRHR) (Nussenzveig et al. 1993; Groarke et al. 2001), ainsi que le V2R dans certaines conditions expérimentales (Schulein et al. 1996). Dans le cas du TRHR, des études en microscopie de fluorescence indiquent que le récepteur mutant non-palmylé, démontrant une diminution d'endocytose, n'induit pas une translocation efficace de  $\beta$ arrestine à la membrane (Groarke et al. 2001). Même si cela reste à confirmer, ces études suggèrent que la palmylation d'un RCPG peut jouer un rôle régulateur de l'interaction récepteur- $\beta$ arrestine. À l'inverse, la mutation des cystéines palmylées du récepteur LH/hCG est accompagnée par une augmentation de sa

vitesse d'internalisation, qui semble être dépendante de  $\beta$ arrestine (Kawate and Menon 1994). Considérant que la phosphorylation des RCPGs augmente leur affinité pour  $\beta$ arrestine, une augmentation de phosphorylation basale des récepteurs mutants LH/hCG dépourvus de palmylation pourrait possiblement expliquer l'augmentation d'endocytose de ces récepteurs.

Sur la même voie, la mutation des sites de palmylation du récepteur LH/hCG (Kawate et al. 1997) ainsi que du récepteur H2R (Fukushima et al. 2001) augmente leur **régulation négative**. Par contre, un effet opposé a été montré pour la mutation de la cystéine palmylée du récepteur  $\alpha_{2A}$ -adrénergique ( $\alpha_{2A}$ AR), où aucune régulation négative du récepteur mutant n'a été observée suite à une stimulation soutenue par l'agoniste (Eason et al. 1994). De façon intéressante, un autre variant de l' $\alpha_{2A}$ AR,  $\alpha_{2C}$ , qui est naturellement non palmylé, ne subit pas non plus de régulation négative lors d'une stimulation soutenue avec un agoniste. Il reste maintenant à déterminer si ces effets apparemment opposés de la palmylation sur la régulation négative peuvent être reliés aux différents effets qu'elle peut avoir sur l'internalisation des récepteurs et l'interaction avec  $\beta$ arrestine.

Ainsi, les études menées à ce jour suggèrent que la palmylation des RCPGs tient différents rôles selon la nature du récepteur étudié. Ceci peut sembler incohérent à priori, mais compte tenu de la diversité fonctionnelle retrouvée parmi les membres de cette famille de récepteurs, il est plausible qu'une modification post-traductionnelle puissent avoir diverses effets dépendant de la fonction impliquée.

## 1.7 Modèles d'étude

Afin d'étudier l'activation et la régulation des MAPKs ERK1/2 par les RCPGs, deux modèles ont été utilisés : Le V2R en particulier, dont la signalisation par les MAPKs a été très peu étudiée et dont la palmylation ne semble pas affecter ses autres fonctions; et le

$\beta_2$ AR, dont la pharmacologie bien caractérisée, ainsi que la disponibilité d'un éventail de ligands d'efficacités distinctes, en fait un modèle de choix pour l'étude de l'efficacité des ligands envers l'activation des MAPKs.

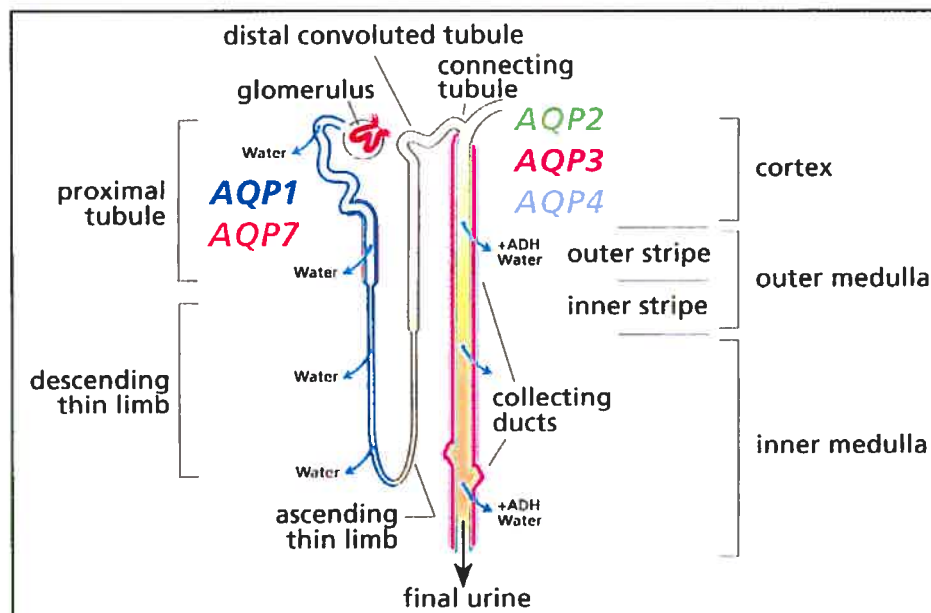
### 1.7.1 Le V2R

Le V2R fait partie d'une sous-famille de RCPGs liant l'arginine vasopressine (AVP). Celle-ci est un peptide cyclique de neuf acides aminés, aussi connu sous le nom d'hormone anti-diurétique (ADH), synthétisé dans des neurones spécialisés de l'hypothalamus, et relâché dans le courant sanguin au niveau de la glande pituitaire (Gainer 1998). La relâche d'AVP dans le sang est stimulée par l'activation de récepteurs osmotiques capables de détecter de légères augmentations d'osmolalité plasmatique. Trois récepteurs de la vasopressine ont été caractérisés jusqu'à présent (Birbaumer 2000). D'une part, les récepteurs V1a (vasculaire) et V1b ou V3 (pituitaire) sont couplés sélectivement à la famille Gq/11 (Laszlo et al. 1991), menant à l'activation de différents isoformes de PLC. D'autre part, le V2R (rénal) est couplé sélectivement à Gs, menant à l'activation de l'adénylyl cyclase (Laszlo et al. 1991). C'est par l'intermédiaire de ce dernier récepteur que l'AVP effectue principalement son action anti-diurétique.

#### *1.7.1.1 Importance physiologique du V2R*

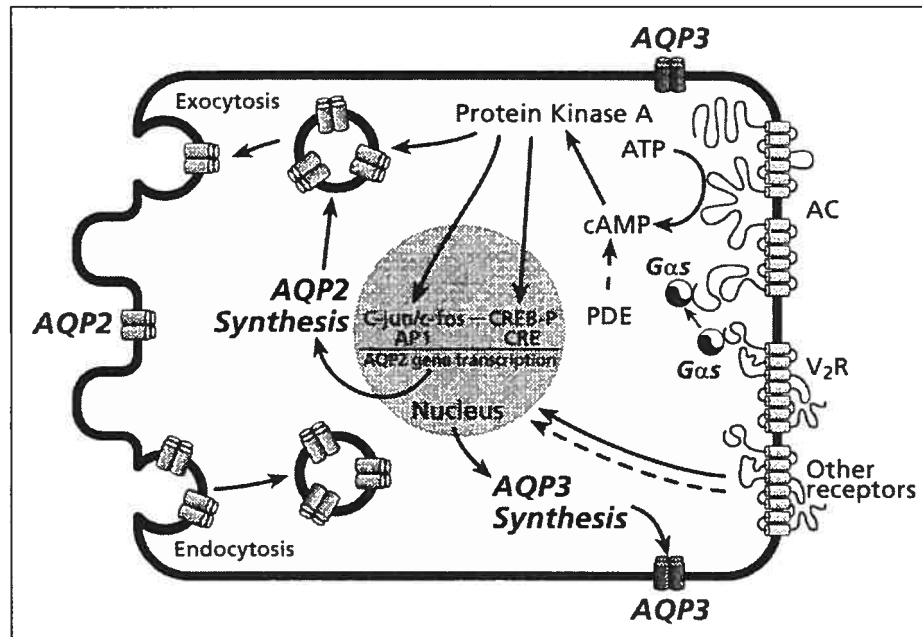
Le V2R est exclusivement exprimé au niveau du rein, plus particulièrement à la membrane basolatérale des cellules principales du tube collecteur (néphron distal) (Terada et al. 1993), où il module leur perméabilité à l'eau (Inoue et al. 2001). En absence d'AVP, la perméabilité à l'eau du tube collecteur est relativement faible comparée au tubule proximal et au bras mince descendant de la boucle de Henle, où le canal à eau aquaporine 1 (AQP1) est constitutivement exprimé aux membranes apicales et basolatérales (Nielsen et al. 1993) (Figure 18). En présence d'AVP, la perméabilité à l'eau du tube collecteur peut

être augmentée de façon drastique (en quelques minutes), ce qui est effectué par l'intermédiaire du V2R présent à la membrane basolatérale (Grantham and Burg 1966; Knepper 1997). Cette réponse rapide à l'AVP est due à la translocation réversible des canaux à eau AQP2, qui se fait à partir d'une réserve de vésicules intra-cellulaires et de façon dépendante de la production d'AMPC et de PKA (Kuwahara et al. 1995), à la membrane plasmique apicale des cellules principales du tube collecteur (Figure 19) (Nielsen et al. 1995). L'AVP augmente aussi la capacité de réabsorption de l'eau du rein en régulant le transporteur d'urée UT1 (Shayakul et al. 1996a) et en augmentant la perméabilité du tube collecteur au sodium (Inoue et al. 2001). De plus, l'AVP régule également la perméabilité du tube collecteur à long terme, en stimulant la synthèse d'ARNm encodant l'AQP2 et l'AQP3 (Terris et al. 1996).



**Figure 18. Structure du néphron.** (Nielsen et al. 2002)

La localisation des différentes aquaporines (AQP) est indiquée. Au niveau du tube collecteur, l'AQP2 est retrouvée abondamment dans la membrane apicale des cellules principales, alors que l'AQP3 et l'AQP4 sont présentes à la membrane basolatérale.



**Figure 19. Représentation schématique de l'effet d'AVP, qui augmente la perméabilité à l'eau des cellules principales du tube collecteur.** (Nielsen et al. 2002)

L'AVP agit sur les V2Rs dans la membrane plasmique basolatérale qui, par la production d'AMPc et l'activation subséquente de PKA, mène à la translocation d'AQP2 à la membrane apicale ainsi qu'à la transcription de son gène. Abréviations: AC: adénylyl cyclase; PDE: Phosphodiesterase; CRE: Élément de réponse à l'AMPc; CREB-P: protéine liant CRE.

L'importance physiologique du V2R est illustrée par le fait que des mutations dans le gène l'encodant, réduisant son expression ou son couplage, sont responsables de 95% des cas de diabète insipide néphrogénique (NDI), une maladie caractérisée par une polyurie pouvant causer une déshydratation sévère et la mort: en l'absence de signalisation induite par l'AVP, le rein ne peut concentrer l'urine et réguler l'homéostasie de l'eau (Morello and Bichet 2001). Même si le NDI est une maladie rare, plus de 130 mutations différentes, causant une perte de fonction du V2R, ont été identifiées (Birnbaumer 1999). La majorité de



ces récepteurs mutants ne sont pas transportés à la membrane cellulaire et sont retenus dans des compartiments intra-cellulaires (Morello and Bichet 2001). Toutefois, l'utilisation d'antagonistes non peptidiques sélectifs du V2R peut mener à un sauvetage partiel de la fonction des récepteurs (Morello et al. 2000). Il a été suggéré qu'en pénétrant la cellule et en liant les V2Rs mutants repliés incorrectement, les antagonistes agiraient en chaperon pharmacologiques, stabilisant le récepteur dans une conformation permettant sa relâche de l'appareil de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Le récepteur stabilisé serait alors acheminé à la surface cellulaire où, suite à la dissociation de l'antagoniste, il pourrait lier l'AVP et promouvoir la transduction du signal.

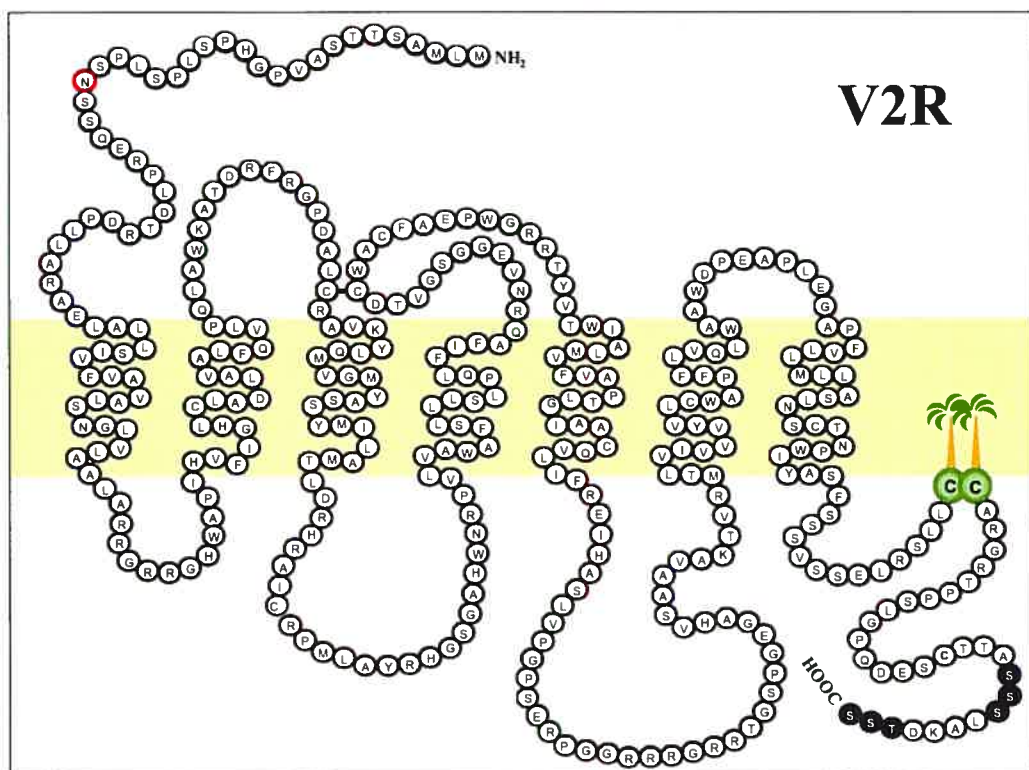
Plusieurs études ont également suggéré que l'augmentation ou la diminution chronique d'AVP plasmatique puisse jouer un rôle important dans l'établissement de déséquilibres des fluides corporels associés à certaines conditions pathophysiologiques, incluant la défaillance cardiaque congestive, la cirrhose du foie et la défaillance rénale chronique (Inoue et al. 2001). En effet, dans ces conditions où la concentration plasmatique d'AVP est altérée, la défaillance cardiaque congestive ainsi que la cirrhose hépatique sont associées avec une rétention d'eau pathologique, due à la surexpression d'AQP2 (Xu et al. 1997; Fujita et al. 1995); alors que la défaillance rénale chronique est associée à une déficience dans la réabsorption de l'eau stimulée par l'AVP au niveau du tube collecteur rénal, due à une diminution de l'expression d'AQP2 et AQP3 (Kwon et al. 1998). Le V2R semble aussi fortement impliqué dans l'établissement de maladies rénales kystiques, un groupe de troubles génétiques causant la défaillance rénale, et même la mort infantile ou adulte, où le développement et la progression de ces maladies sont inhibés par des antagonistes du V2R (Gattone et al. 2003). Enfin, le V2R ainsi que les V1aR et V1bR sont exprimés dans plusieurs cellules cancéreuses où ils sont responsables des multiples effets de l'AVP sur le métabolisme et la croissance tumorale (North 2000).

### *1.7.1.2 Structure, signalisation et régulation du V2R*

Comme la majorité des RCPGs, les domaines extra-cellulaires du V2R sont modifiés par glycosylation et, possiblement, par la formation de ponts disulfures. De façon intrigante, alors que la glycosylation des protéines excrétées joue normalement un rôle dans leur repliement et le contrôle de qualité au niveau du réticulum endoplasmique (Spiro 2002; Helenius and Aebi 2004), la glycosylation du V2R ne semble pas être requise pour l'expression d'un récepteur fonctionnel. En effet, le V2R subit entre autre une N-glycosylation (attachement de sucres sur des résidus asparagines via leur groupement amine) au niveau de l'asparagine N22 (Figure 20), mais le rôle de celle-ci demeure inconnu puisque la mutation de ce site de glycosylation n'affecte ni l'expression du V2R à la surface cellulaire, ni sa fonction (Innamorati et al. 1996; Sadeghi and Birnbaumer 1999). Une étude rapporte également la présence d'O-glycosylation du V2R, c.-à-d. l'attachement de sucres à des acides aminés comportant un groupe hydroxyl. Même si le ou les sites spécifiques d'O-glycosylation n'ont pas été identifiés, la perte de cette glycosylation n'affecte pas non plus la fonction du récepteur (Sadeghi and Birnbaumer 1999). Au niveau de ses boucles e2 et e3, le V2R possède également deux cystéines conservées (C112, C192) qui sont crues impliquées dans la formation d'un pont disulfure. Celles-ci sont possiblement impliquées dans le processus de maturation du récepteur, puisque leur mutation engendre des récepteurs non fonctionnels, localisés à l'intérieur de la cellule (Schulein et al. 2000).

Dans sa partie intra-cellulaire, au niveau de la queue C-terminale en particulier, le V2R est modifié par palmylation, ainsi que par phosphorylation de façon dépendante du ligand. Deux sites majeurs de palmylation du V2R ont été identifiés: les cystéines C341 et C342 (Figure 20) (Sadeghi et al. 1997). Le rôle de la palmylation du V2R n'est toutefois pas clair, puisque deux études ont rapportées des effets différents suite à la mutation des cystéines palmylées. Dans un cas, la perte de palmylation du V2R semble affecter l'endocytose du récepteur dépendante de l'AVP (Schulein et al. 1996a), alors que dans l'autre cas, la mutation des sites de palmylation ne semble affecter aucunes fonctions du

V2R ni mécanismes de régulation, uniquement l'expression du récepteur à la surface cellulaire (Sadeghi et al. 1997). Pour ce qui est de la phosphorylation du V2R, celui-ci semble uniquement phosphorylé au niveau de sa queue C-terminale par les GRKs (Berrada et al. 2000) (Ren et al. 2005), particulièrement au niveau de deux groupements de sérines et thréonines (Figure 20) (Innamorati et al. 1997). Le V2R ne semble pas être un substrat pour les kinases dépendantes des seconds messagers.



**Figure 20. Composition de la séquence peptidique du V2R humain et son organisation topographique à la membrane plasmique.**

Les deux cystéines palmitylées C341 et C342 sont représentées en vert, ancrées à la membrane par les palmitates (palmiers). Le site de N-glycosylation N22 est encerclé en rouge et les sites de phosphorylation par des GRKs sont en noir.

La voie de signalisation engendrée par le V2R la mieux caractérisée est sans aucun doute celle menant à la stimulation de l'adénylyl cyclase. Comme mentionné précédemment, le V2R démontre un couplage préférentiel à Gs, menant à la stimulation de l'adénylyl cyclase et à la production d'AMPc dépendante de l'AVP, pour lequel il possède une affinité de l'ordre du nM (Tahara et al. 1998). Le V2R semble également pouvoir se coupler à Gq et mener à l'activation de la PLC mais, dans certains cas, seulement lorsque exprimé à plus de 100 000 sites par cellule (Zhu et al. 1994), ce qui correspond au niveau endogène du V2R exprimé à la membrane des cellules principales du tube collecteur (Kirk 1988). On peut ainsi penser que dans des conditions normales *in vivo*, le V2R se couple exclusivement à Gs. Même si la stimulation de l'adénylyl cyclase est la voie de signalisation du V2R qui est la mieux caractérisée, quelques études ont rapporté que les MAPKs ERK1/2 peuvent également être activées suite à la stimulation du V2R par l'AVP (Thibonnier et al. 1998).

De récentes études ont permis de mettre en évidence les mécanismes de régulation du V2R. Suite à une stimulation par l'AVP, très rapidement, le V2R est fortement phosphorylé par les GRKs, notamment GRK5, au niveau de sa queue C-terminale, subissant uniquement une désensibilisation homologe (Berrada et al. 2000). L'activation du récepteur et sa phosphorylation induisent le recrutement de  $\beta$ arrestine, qui promeut ensuite l'endocytose du V2R de façon dépendante de sa propre ubiquitination (Shenoy and Lefkowitz 2003). Comme mentionné dans la section 1.3, la phosphorylation de trois sérines regroupées dans la queue C-terminale du V2R est impliquée dans l'établissement d'une interaction stable du récepteur avec  $\beta$ arrestine, qui persiste après l'endocytose (Innamorati et al. 1998; Oakley et al. 2001). Le V2R, dont la localisation dans les endosomes persiste ensuite pendant des heures, est alors soit resensibilisé et recyclé très lentement à la membrane, soit dégradé (Oakley et al. 1999; Luttrell and Lefkowitz 2002). Par contre, ceci ne représente peut-être pas le mécanisme privilégié de régulation du V2R *in vivo* puisqu'une étude rapporte le clivage protéolytique du récepteur dans une préparation membranaire de

rein bovin, par une métalloprotéase membranaire, de façon dépendante de l'AVP (Kojro and Fahrenholz 1995).

### 1.7.2 Le $\beta_2$ AR

Le  $\beta_2$ AR fait partie d'une sous-famille de RCPGs, les récepteurs adrénérgiques (AR), liant l'adrénaline et la noradrénaline. Ces hormones sont sécrétées par les surrénales, mais la noradrénaline, qui sert également de neurotransmetteur, est aussi sécrétée par certaines terminaisons nerveuses sympathiques. En se liant aux divers récepteurs adrénérgiques, ces catécholamines régulent entre autre la fréquence et la contraction cardiaque, la contraction bronchiale, ainsi que le métabolisme du glycogène et des graisses (Strasser et al. 1992). Neuf sous-types de récepteurs adrénérgiques ont été clonés, incluant trois  $\alpha_1$ -, trois  $\alpha_2$ - et trois  $\beta$ ARs. De façon générale, les  $\alpha_1$ ARs sont couplés à Gq/11 et sont retrouvés dans le coeur, les vaisseaux sanguins ainsi que les muscles lisses ; les  $\alpha_2$ ARs sont couplés à Gi/o et sont retrouvés au niveau du système nerveux central, des vaisseaux coronariens, du pancréas ainsi que des plaquettes; tandis que les  $\beta$ ARs se couplent principalement à Gs et sont tous présents au niveau du coeur, en plus du  $\beta_3$ AR qui est aussi exprimé dans les adipocytes, et le  $\beta_2$ AR qui est également retrouvé au niveau des vaisseaux sanguins, des poumons et du rein (Lefkowitz and Caron 1990).

#### *1.7.2.1 Importance physiologique du $\beta_2$ AR*

Bien que viable, le knock-out du  $\beta_2$ AR confirma son implication dans la régulation d'une variété de réponses biologiques, incluant la relaxation des muscles lisses du système vasculaire périphérique et du système respiratoire, ainsi que la fréquence et la contraction cardiaque (Chruscinski et al. 1999). De plus, la surexpression transgénique du  $\beta_2$ AR à de très hauts niveaux engendra un phénotype de cardiomyopathie rapide ainsi que progressif, en cohérence avec la toxicité pathologique causée par un excès de stimulation  $\beta$ -

adrénergique (Liggett et al. 2000). En effet, l'hypertrophie cardiaque, en réponse à une augmentation de la charge de travail du coeur, est entre autres caractérisée par des anomalies marquées de la fonction  $\beta$ -adrénergique, qui semblent être dues en partie à l'expression élevée de GRK2 au niveau du myocarde (Choi et al. 1997). Une telle augmentation de l'expression de GRK2 a également été observée dans le coeur humain défaillant (Ungerer et al. 1994), où le  $\beta_1$ - et le  $\beta_2$ AR sont tous deux découplés de leur protéine G, subissant une désensibilisation et une régulation négative prononcée (Bristow et al. 1989; Rockman et al. 2002). Même si les mécanismes moléculaires exactes sous-jacents les effets bénéfiques des  $\beta$ -bloqueurs dans la défaillance cardiaque ne sont toujours pas connus en détail (Lopez-Sendon et al. 2004), il semble vraisemblable que ces antagonistes  $\beta$ -adrénergiques, en interférant avec la stimulation chronique du système chez les individus avec une fonction cardiaque diminuée, agissent, entre autres, en prévenant cette régulation négative des  $\beta$ ARs.

#### ***1.7.2.2 Structure, signalisation et régulation du $\beta_2$ AR***

Tout comme le V2R et la majorité des RCPGs, le  $\beta_2$ AR est glycosylé au niveau de ses domaines extra-cellulaires (Figure 21) (Dohlman et al. 1987). Alors que la glycosylation du  $\beta_2$ AR ne semble pas être nécessaire à sa fonction signalétique, la glycosylation des résidus asparagine N6 et N15 du domaine N-terminal semble, toutefois, être impliquée dans l'expression du récepteur à la surface cellulaire (Rands et al. 1990), et celle du résidu asparagine N187 de la boucle e2, semble jouer un rôle dans la régulation négative du récepteur, plus spécifiquement dans son ciblage vers les lysosomes (Mialet-Perez et al. 2004).

Comme mentionné précédemment, le  $\beta_2$ AR subit également des modifications au niveaux de ses domaines intra-cellulaires: la palmylation et la phosphorylation (Dohlman et al. 1987). Un seul site majeur de palmylation du  $\beta_2$ AR a été identifié, la cystéine C341 (O'Dowd et al. 1989b). Survenant à proximité de sites phosphorylés par PKA (Figure 21), la

palmitoylation du  $\beta_2$ AR semble être impliquée dans la régulation de l'accessibilité de ces sites par l'enzyme (Moffett et al. 1996;Moffett et al. 2001). Pour plus de détail sur la palmitoylation du  $\beta_2$ AR, se reporter à la section 1.6.3.

Pour ce qui est de la phosphorylation du  $\beta_2$ AR, contrairement au V2R, celui-ci semble pouvoir être phosphorylé par une multitude de kinases, principalement au niveau de la queue C-terminale, incluant celles dépendantes de seconds messagers, PKA et PKC, ainsi que GRK2 et GRK5, et des tyrosines kinases (Benovic 2002). Toutes ces kinases semblent impliquées, bien que par des mécanismes différents, dans la désensibilisation du  $\beta_2$ AR que ce soit de façon hétérologue (PKA et PKC) ou homologue (GRKs). Aussi, des études suggèrent que la phosphorylation du  $\beta_2$ AR par PKA et les GRKs, de façon dépendante de l'agoniste, survient de manière concertée, menant au découplage et à la désensibilisation rapide du récepteur (Lohse et al. 1990;Moffett et al. 2001). De façon intrigante, quelques études rapportent également la phosphorylation du  $\beta_2$ AR sur résidus tyrosines suite à une stimulation par l'insuline ou par le facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF) (Hadcock et al. 1992;Valiquette et al. 1995;Karooor et al. 1998). Toutefois, la nature de la ou des tyrosines kinases directement impliquées ainsi que le rôle de cette phosphorylation dans la régulation de la fonction du  $\beta_2$ AR demeurent incompris.

Tout comme le V2R, la voie de signalisation engendrée par le  $\beta_2$ AR la mieux caractérisée est celle menant à la production d'AMPC, induite par la stimulation de Gs et de l'activité adénylyl cyclase. Toutefois, de façon dépendante de sa phosphorylation par PKA, le  $\beta_2$ AR peut également se coupler à Gi/o (Daaka et al. 1997). En effet, en plus d'induire le découplage du récepteur envers Gs, menant à la désensibilisation de la voie adénylyl cyclase, la phosphorylation par PKA sert également de commutateur qui induit une augmentation de l'affinité du  $\beta_2$ AR avec Gi/o. L'activation subséquente de Gi/o et la relâche des sous-unités G $\beta\gamma$  contribue ensuite à l'activation des MAPKs (voir section 1.5.2).





Comme mentionné plus haut, la phosphorylation et potentiellement la palmitoylation du  $\beta_2$ AR contribuent à la régulation de ses fonctions. Alors que la phosphorylation par PKA influence la spécificité de couplage du  $\beta_2$ AR aux protéines G hétéro-trimériques, la phosphorylation par les GRKs favorise son interaction avec  $\beta$ arrestine, qui contribue à la désensibilisation homologue du récepteur et orchestre son endocytose, de façon dépendante de son ubiquitination, via les puits de clathrine (Kohout et al. 2001; Shenoy et al. 2001). Au moment de l'endocytose,  $\beta$ arrestine est déubiquitinée et se dissocie du  $\beta_2$ AR, qui est ensuite resensibilisé et réacheminé à la membrane plasmique (Pippig et al. 1995; Shenoy and Lefkowitz 2003). Alors que GRK2 semble être la GRK majoritairement impliquée dans la phosphorylation du  $\beta_2$ AR induite par l'agoniste, la phosphorylation de sites spécifiques par GRK5 est potentiellement impliquée dans la régulation de l'interaction du récepteur avec des protéines à domaines PDZ. En effet, il a été montré que la phosphorylation par GRK5 de la sérine S411, comprise dans la séquence consensus de liaison aux domaines PDZ à l'extrémité C-terminale du  $\beta_2$ AR (DSL<sub>1</sub>), interfèrent dans l'interaction du récepteur avec le domaine PDZ de NHERF (Cao et al. 1999). Dans l'optique où cette interaction du  $\beta_2$ AR avec NHERF dépendante de l'agoniste semble être impliquée dans le recyclage des récepteurs internalisés, la phosphorylation de la sérine S411 par GRK5 pourrait contribuer au ciblage des récepteurs dans les lysosomes.

## **1.8 Objectifs de la thèse**

### **1.8.1 Objectif général**

Étudier l'activation et la régulation de la voie MAPK ERK1/2 par les RCPGs.

### **1.8.2 Objectifs spécifiques**

- 1° Étudier la régulation de l'activité ERK1/2 par différents ligands du  $\beta_2$ AR et du V2R présentant des efficacités distinctes envers l'activité adénylyl cyclase (article 1);
- 2° Étudier l'effet de l'absence de palmitoylation aux sites majeurs du V2R sur l'activation d'ERK1/2 induite par l'AVP (article 2);
- 3° Identifier la voie de signalisation menant à l'activation d'ERK1/2 engendrée par la stimulation du V2R par l'AVP (article 3);
- 4° Développer un biosenseur pour l'étude de l'activation de  $\beta$ arrestine ainsi que l'étude générale de l'activité des RCPGs (article 4).

## ***2. RÉSULTATS***

## 2.1 Article 1

### **$\beta$ -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors.**

Mounia Azzi, Pascale G Charest, Stéphane Angers, Guy Rousseau, Trudy Kohout, Michel Bouvier et Graciela Pineyro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:11406 (2003).

Comme mentionné dans l'introduction (section 1.1.2), la définition d'efficacité du ligand se rapporte encore à la signalisation classique des RCPGs via les protéines G hétéro-trimériques, où les agonistes stabilisent les récepteurs dans des conformations actives, alors que la liaison d'agonistes inverses favorisent la stabilisation de conformations inactives. Avec le nombre grandissant d'études rapportant l'activation des MAPKs par les RCPGs de façon dépendante d'échafauds protéiques comme  $\beta$ arrestine (Luttrell 2003; Shenoy and Lefkowitz 2003), nous avons voulu vérifier si ce paradigme d'efficacité était transférable à des effets de ligand mettant en jeu la formation de tels complexes métastables. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'effet produit par des agonistes inverses sur l'activité des MAPKs ERK1/2 modulée par les RCPGs.

Étant donné la disponibilité d'un grand éventail de ligands synthétiques du  $\beta_2$ AR possédant des efficacités distinctes envers l'activation de l'adénylyl cyclase, cette étude a principalement été effectuée avec ce récepteur. Ainsi, l'effet de traitements par les agonistes inverses propranolol et ICI 118551, ainsi que l'antagoniste timolol (Chidiac et al. 1994), sur l'activité ERK1/2 régulé par le  $\beta_2$ AR a été comparé à une stimulation par l'agoniste synthétique isoprotérénol (Chidiac et al. 1994; Daaka et al. 1997).

En ce qui concerne le V2R, quelques antagonistes non-peptidiques spécifiques pour ce récepteur ont été rapportés (Serradeil-Le et al. 1996), (Chan et al. 1998) mais ce n'est que

peu avant le début de la présente étude où un ligand d'efficacité négative, envers l'activité adénylyl cyclase couplée au V2R, a été identifié (Morin et al. 1998). En effet, en utilisant un V2R mutant constitutivement actif, cette étude a permis de mettre en évidence l'activité agoniste inverse du ligand SR121463, auparavant identifié comme un antagoniste sélectif du V2R (Serradeil-Le et al. 1996). Comme l'activation des MAPKs ERK1/2 par le V2R avait aussi récemment été rapportée (Thibonnier et al. 1998), nous avons donc testé, dans la présente étude, l'effet du SR121463 sur l'activité ERK1/2 modulée par le V2R.

Ma contribution à ces travaux est principalement au niveau de l'élaboration de l'approche expérimentale ainsi que de la réalisation des expériences (~35%).

# $\beta$ -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors

Mounia Azzi\*, Pascale G. Charest\*, Stéphane Angers\*, Guy Rousseau†, Trudy Kohout‡, Michel Bouvier\*<sup>§</sup>, and Graciela Piñeyro<sup>¶</sup>

\*Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7; †Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, QC, Canada H3J 1C5; ‡Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Box 3821, Durham, NC 27710; and §Département de Psychiatrie, Centre de Recherche Fernand-Seguin, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H1N 3V2

Edited by Robert J. Lefkowitz, Duke University Medical Center, Durham, NC, and approved July 22, 2003 (received for review November 1, 2002)

It is becoming increasingly clear that signaling via G protein-coupled receptors is a diverse phenomenon involving receptor interaction with a variety of signaling partners. Despite this diversity, receptor ligands are commonly classified only according to their ability to modify G protein-dependent signaling. Here we show that  $\beta_2$ AR ligands like ICI118551 and propranolol, which are inverse agonists for Gs-stimulated adenylyl cyclase, induce partial agonist responses for the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 thus behaving as dual efficacy ligands. ERK1/2 activation by dual efficacy ligands was not affected by ADP-ribosylation of G $\alpha_i$  and could be observed in S49-cyc<sup>-</sup> cells lacking G $\alpha_s$  indicating that, unlike the conventional agonist isoproterenol, these drugs induce ERK1/2 activation in a Gs/i-independent manner. In contrast, this activation was inhibited by a dominant negative mutant of  $\beta$ -arrestin and was abolished in mouse embryonic fibroblasts lacking  $\beta$ -arrestin 1 and 2. The role of  $\beta$ -arrestin was further confirmed by showing that transfection of  $\beta$ -arrestin 2 in these knockout cells restored ICI118551 promoted ERK1/2 activation. ICI118551 and propranolol also promoted  $\beta$ -arrestin recruitment to the receptor. Taken together, these observations suggest that  $\beta$ -arrestin recruitment is not an exclusive property of agonists, and that ligands classically classified as inverse agonists rely exclusively on  $\beta$ -arrestin for their positive signaling activity. This phenomenon is not unique to  $\beta_2$ -adrenergic ligands because SR121463B, an inverse agonist on the V2 vasopressin receptor-stimulated adenylyl cyclase, recruited  $\beta$ -arrestin and stimulated ERK1/2. These results point to a multistate model of receptor activation in which ligand-specific conformations are capable of differentially activating distinct signaling partners.

The signaling unit for G protein-coupled receptors (GPCRs) has been classically defined as consisting of the receptor, a heterotrimeric G protein and enzymatic or channel effectors controlling second messenger production or ion fluxes that regulate cell function. More recently it has become clear that GPCRs may also stimulate a variety of signaling systems that regulate cell proliferation and differentiation such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) 3, and p38 (1). In many cases, mitogenic signals generated by GPCRs involve classical second messenger-dependent pathways (2), but in others, they require the formation of metastable complexes that comprise the receptor, accessory proteins such as  $\beta$ -arrestins or ASK1 and effectors molecules such as Src, Ras, ERK1/2, JNK, and MAPK kinase 4 (MKK4) (3–6).

Despite this growing diversity in GPCR signaling mechanisms, our definition of drug efficacy is still linked to a scheme considering only the regulation of the classical G protein signaling. Within this framework, agonists are defined as drugs that stabilize an active receptor conformation that induces G protein activation, whereas inverse agonists favor an inactive receptor state that reduces spontaneous G protein signaling (7). The

question that now arises is whether this same paradigm may be transferred to drug effects generated through the formation of metastable complexes involving scaffolding proteins such as  $\beta$ -arrestin. Because all studies describing  $\beta$ -arrestin-mediated MAPK signaling have concentrated on agonist drugs, little is known of how ligands that are commonly classified as inverse agonists may regulate the scaffold assembly that is crucial for such signaling.

In the present study, this question was addressed by assessing whether  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR) ligands with proven inverse efficacy on adenylyl cyclase (AC) activity could also regulate MAPK activation via receptor-mediated scaffold formation. We found that, despite being inverse agonists in the AC pathway, ICI118551, and propranolol induced the recruitment of  $\beta$ -arrestin leading to the activation of the ERK cascade. Such observations indicate that the same drug acting on a unique receptor can have opposite efficacies depending on the signaling pathway considered.

## Materials and Methods

**Expression Vectors.** *Wild-type  $\beta_2$ AR and V2 vasopressin receptor (V2R).* Wild-type human  $\beta_2$ AR, V2R, and hemagglutinin (HA)-tagged (YPYDVPDYA)  $\beta_2$ AR sequences were subcloned into a modified pcDNA3 vector (Invitrogen) in which the cytomegalovirus promoter was replaced by a Rous sarcoma virus promoter as described (8).

*V2R-GFP and  $\beta_2$ AR-GFP.* The coding sequence of the green fluorescent protein variant GFP10 (9) was inserted in-frame 3' of the wild-type V2R sequence into pcDNA3-V2R so that a 14-aa linker (GSGTAGPGSPPVAT), separates the carboxyl tail of the receptor and the initiator methionine of GFP10. For the  $\beta_2$ AR-GFP, a GFP10 *AgeI/BsrGI* fragment was subcloned into the *AgeI/BsrGI* site of pGFP-N1-His $\beta_2$ AR-YFP (10) to yield pGFP-N1-His $\beta_2$ AR-GFP10.

*$\beta$ -Arrestin-Rluc.* The rat  $\beta$ -arrestin 2 coding sequence was inserted in-frame 5' of the *Renilla* luciferase sequence in the pRluc vector (Perkin-Elmer) so that a 7-aa linker (GAGALAT) separates the carboxyl terminal of  $\beta$ -arrestin and the initiator methionine of Rluc.

*$\beta$ -Arrestin-YFP.* The rat  $\beta$ -arrestin 2 coding sequence was amplified out of its original vector with two *NheI* site-containing primers to generate a stop codon-free fragment that was then subcloned in-frame 3' into the *NheI* site of a yellow variant GFP-topaz

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: GPCRs, G protein-coupled receptors; MAPK, mitogen-activated protein kinase;  $\beta_2$ AR,  $\beta_2$ -adrenergic receptor; AC, adenylyl cyclase; ERK, extracellular-regulated kinase; MEF, mouse embryonic fibroblast; V2R, type 2 vasopressin receptor; HA, hemagglutinin; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; KO, knockout; DKO, double KO.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

© 2003 by The National Academy of Sciences of the USA

vector (pGFP-N1-Topaz, Packard; ref. 10). All constructs were confirmed by sequencing.

**Cell Culture and Transfections.** Mouse embryonic fibroblasts (MEFs), HEK293 and Cos1 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 0.1 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 0.25  $\mu$ g/ml fungizone. S49 mouse lymphoma T cells were grown in DMEM as above but supplemented with 10% heat-inactivated horse serum. Freshly dispersed cardiomyocytes were prepared as described (11). Calcium phosphate precipitation and G418 selection pressure (450  $\mu$ g/ml) were used to produce stable HEK293 cell lines expressing  $\beta_2$ AR or V2R. MEFs were transiently transfected by using FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals) according to supplier's specifications. All other transient transfections were carried out by calcium phosphate precipitation. Cells were cultivated under sterile conditions at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

**MAPK Activity, cAMP Accumulation, and Gene Reporter Assays.** For ERK1/2 phosphorylation assays, cells were grown in six-well plates, serum-starved overnight and then incubated in PBS, at 37°C in the presence of different ligands. Cells were lysed in sample buffer and separated on SDS/10% PAGE, according to the method of Laemmli (12). Proteins were transferred onto nitrocellulose and Western blot analysis carried out by using a 1:5,000 dilution of mouse monoclonal antiphospho-ERK1/2 antibody (Santa Cruz Biotechnology). Total ERK protein was determined by using a 1:20,000 dilution of anti-ERK antibody (Santa Cruz Biotechnology). Blots were then probed with anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, visualized by using enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Pharmacia) and quantified by densitometric analysis. ERK1/2 phosphorylation was normalized according to the loading of proteins by expressing the data as a ratio of phospho-ERK1/2 over total ERK1/2. Results were expressed as percentage of the value obtained in nonstimulated cells.

For cAMP accumulation assays, cells were incubated for 16 h with [<sup>3</sup>H]adenine (2  $\mu$ Ci/ml; 1 Ci = 37 GBq) and washed twice before stimulation with the indicated drugs at 37°C. After a 15-min incubation, the reaction was stopped by adding 1 ml of ice-cold 5% trichloroacetic acid and 1 mM of unlabeled cAMP. [<sup>3</sup>H]cAMP was then separated from [<sup>3</sup>H]ATP by sequential chromatography over Dowex and Alumina columns. cAMP accumulation was calculated as ([<sup>3</sup>H]cAMP cpm / ([<sup>3</sup>H]cAMP cpm + [<sup>3</sup>H]ATP cpm))  $\times$  1,000 and expressed as a percentage of nonstimulated cells.

For gene reporter assays, HEK293 cells stably expressing the  $\beta_2$ AR were transiently transfected with pFA-Elk1 and pFR-Luc reporter plasmids of the PathDetect Reporting System (Stratagene), by using calcium phosphate precipitation procedure. After a 6-h incubation with the indicated ligands, luciferase activity was measured in cell lysates by using a firefly luciferase assay kit (Promega) and a LumiCount luminometer (Packard), as described (13).

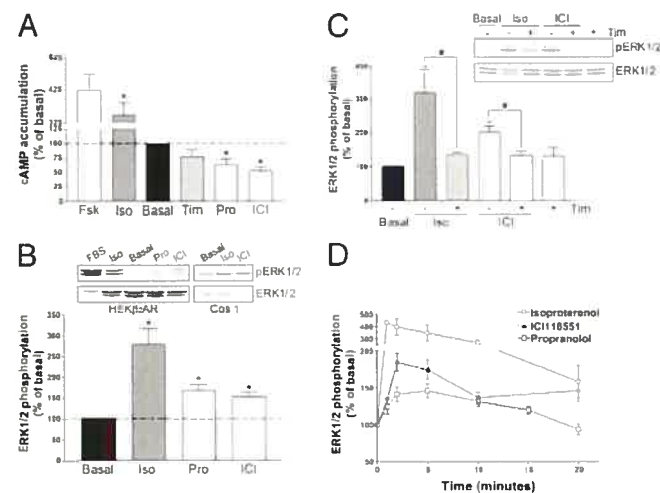
**Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Assay.** BRET is a proximity assay based on the nonradiative transfer of energy between a donor (luciferase) and an acceptor (GFP). It was used to assess  $\beta$ -arrestin recruitment to  $\beta_2$ AR or V2R as described (10). Briefly, fusion proteins consisting of the GFP-10 variant (9), covalently attached to the carboxyl tail of the receptor of interest ( $\beta_2$ AR-GFP; V2R-GFP), were coexpressed with  $\beta$ -arrestin 2 fused at its carboxyl terminus to Rluc ( $\beta$ -arrestin-Rluc). After incubation of the transfected cells with different ligands, Deep Blue coelenterazine (Packard) was added at a final concentration of 5  $\mu$ M and readings were collected by using a

modified top-count apparatus (BRETCount, Packard) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370- to 450- and 500- to 530-nm windows. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by the Receptor-GFP (500–530 nm) over the light emitted by the  $\beta$ -arrestin-2-Rluc (370–450 nm). The values were corrected by subtracting the background signal detected when the  $\beta$ -arrestin-2-Rluc construct was expressed alone.

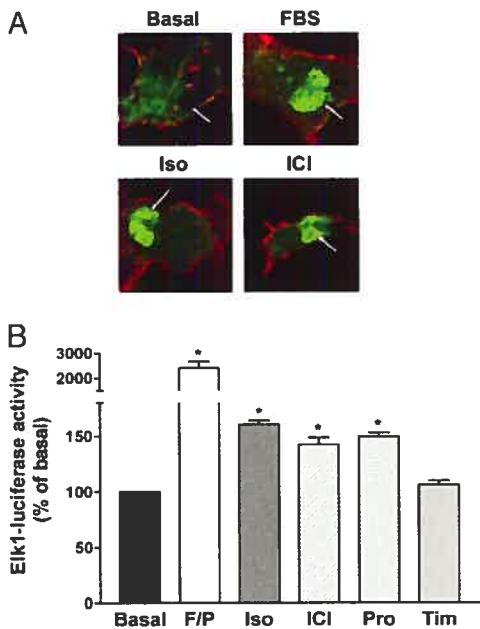
**Immunofluorescence and Confocal Microscopy.** Immunofluorescence microscopy was carried out in Cos1 cells transiently transfected either with a HA-tagged  $\beta_2$ V2R chimera (consisting of the first 341 aa of the  $\beta_2$ AR and the last 29 aa of the V2) and  $\beta$ -arrestin-2-GFP or HA-tagged  $\beta_2$ AR and ERK2 GFP by using FuGENE 6. Immunolabeling of the HA-tagged  $\beta_2$ V2R and  $\beta_2$ AR was carried out in nonpermeabilized cells by using the anti-HA (12CA5; 1:100) antibody. Immunoreactivity was revealed by using a Texas red-conjugated secondary antibody.  $\beta$ -arrestin-GFP and ERK2-GFP were visualized by direct fluorescence detection. Quantitative assessment of nuclear translocation of ERK2-GFP was carried out by counting the number of cells in which GFP fluorescence colocalized with the nuclear marker To-Pro-3 iodine (Molecular Probes). All confocal microscopy images were acquired on a Leica HM IRBE laser-scanning microscope with a  $\times$ 100 objective.

## Results and Discussion

HEK293 fibroblasts stably expressing the  $\beta_2$ AR were used to compare the effects of different  $\beta_2$ AR ligands on the classical G $\alpha$ s-mediated activation of the AC pathway and the MAPK cascade. As previously reported (14, 15), isoproterenol behaved as an agonist in the two systems, leading to increased cAMP production and ERK1/2 phosphorylation (Fig. 1A and B). Also in agreement with previous reports (14), propranolol and ICI118551 produced inverse agonist effects for the AC pathway,



**Fig. 1.** Signaling efficacy of  $\beta_2$ AR ligands. HEK293 cells stably expressing the  $\beta_2$ AR (HEK $\beta_2$ AR) were treated with the indicated drugs (1  $\mu$ M), and cAMP accumulation (A) and ERK1/2 phosphorylation (B) were assessed after a 15-min and a 5-min incubation, respectively. Results are expressed as percentage of the value obtained in nonstimulated cells and represent the mean  $\pm$  SEM of three to eight independent experiments. \*,  $P < 0.01$  compared with basal. (B Inset) Representative examples of ERK1/2 phosphorylation experiments carried out in HEK $\beta_2$ AR and Cos1 cells. (C) Competitive antagonism of timolol (10  $\mu$ M) on isoproterenol-mediated (10 nM) and ICI118551-mediated (10 nM) ERK1/2 phosphorylation ( $n = 8-10$ ; \*,  $P < 0.05$  compared with basal cells; #,  $P < 0.05$  for the indicated comparison). (D) Kinetics of ERK1/2 activation by different  $\beta_2$ AR ligands (1  $\mu$ M) in HEK $\beta_2$ AR (circles) and canine cardiomyocytes (squares) ( $n = 4-7$ ).

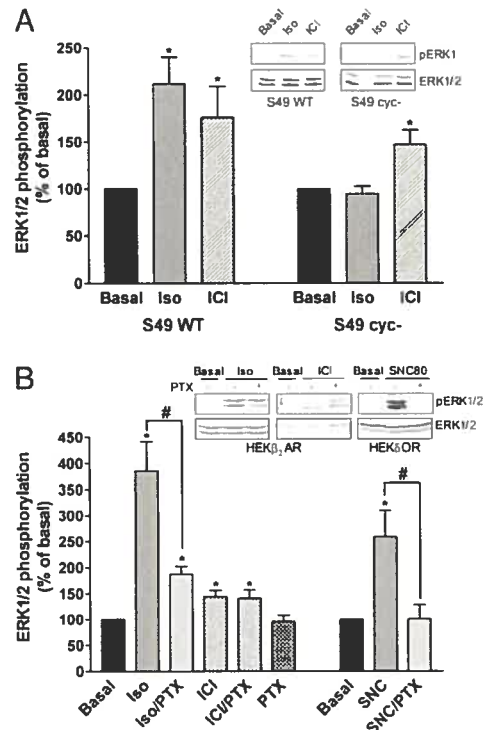


**Fig. 2.** Nuclear translocation of activated ERK. (A) Subcellular redistribution of ERK2-GFP after FBS, isoproterenol (Iso) and ICI118551 (ICI) treatments. Cos1 cells transiently expressing HA- $\beta_2$ AR and ERK2-GFP were stimulated or not for 20 min with 10% FBS or 10  $\mu$ M Iso or ICI. Arrows indicate the nucleus. Under basal conditions, 13% of the cells showed colocalization of ERK2-GFP with the nuclear marker To-Pro-3 iodine. After drug treatments, this value increased to 84% for FBS, 72% for Iso, and 67% for ICI. (B) Gene reporter assay for Elk-regulated transcription. Luciferase activity was measured after a 6-h incubation with 10  $\mu$ M Iso, ICI, propranolol (Pro), or timolol (Tim). Stimulation with 10% FBS and 1  $\mu$ M phorbol 12-myristate 13-acetate (F/P) was used as a positive control. Data are expressed as percentage of the value obtained in nonstimulated cells and represent the mean  $\pm$  SEM of four to six independent experiments; \*,  $P < 0.01$  compared with basal.

inhibiting cAMP production by 35% and 50%, respectively (Fig. 1A). However, these two compounds were found to be agonists at the MAPK cascade, with propranolol inducing a 67% increase and ICI118551 inducing a 52% increase in ERK1/2 phosphorylation (Fig. 1B). Timolol, was devoid of intrinsic activity in the two pathways (Fig. 1A and C) but competitively blocked both inverse agonist (ref. 14 and data not shown) and agonist (Fig. 1C) effects of ICI118551.

Opposing effects of ICI118551 and propranolol on AC and MAPK activity cannot be attributed to an artifact related to receptor overexpression in HEK293 cells because their dual actions were also observed in Cos1 (Fig. 1B Inset), S49 cells (see below), and cardiomyocytes (Fig. 1D) all of them endogenously expressing low levels of  $\beta_2$ AR. The activation kinetics of MAPK by isoproterenol, ICI118551, and propranolol were similar; activation was fast and transient, and reached a peak between 1 and 2 min after drug addition (Fig. 1D). However, the effects of ICI118551 and propranolol appear to be slightly slower because their maximal activity was observed at 2 min rather than at 1 min, as for isoproterenol.

Consistent with the known longer-term nuclear translocation of activated ERK, both isoproterenol and ICI118551 promoted targeting of ERK2-GFP to the nucleus after a 20-min treatment with the drugs (Fig. 2A). As is the case for isoproterenol, ERK nuclear translocation promoted by dual efficacy drugs ICI118551 and propranolol also has functional consequences as illustrated by increased Elk-dependent transcriptional activity (Fig. 2B). Given the role played by ERK in  $\beta$ -adrenergic-mediated cardiac fibroblast hypertrophy and the general use of  $\beta_2$ AR antagonists



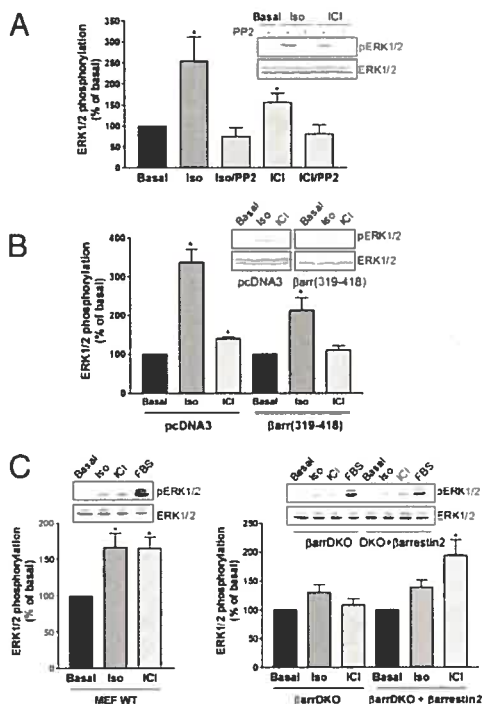
**Fig. 3.** Role of Gs and Gi in isoproterenol and ICI118551-mediated ERK1/2 activation. ERK1/2 phosphorylation was assessed in S49 wild-type (S49 WT) and S49 cyc<sup>-</sup> cells endogenously expressing the  $\beta_2$ AR (A) or in HEK293 cells stably transfected with the  $\beta_2$ AR (HEK $\beta_2$ AR) and treated or not with 100 ng/ml pertussis toxin (PTX) for 16 h (B). Cells were stimulated with 1  $\mu$ M isoproterenol (Iso) or ICI118551 (ICI) for 5 min. The efficacy of PTX pretreatment was controlled by its ability to block ERK1/2 activation in HEK293 cells expressing the Gi/o-coupled  $\delta$ -opioid receptor (HEK $\delta$ OR) by the  $\delta$ OR agonist SNC80 (1  $\mu$ M; 5 min). Results are expressed as percentage of the value obtained in nonstimulated cells and represent the mean  $\pm$  SEM of three to eight independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with basal; #,  $P < 0.05$  for the indicated comparison. Insets show representative experiments.

and inverse agonists in the treatment of hypertension and heart failure (16), the agonistic properties of these compounds on the ERK pathway could have clinically relevant implications.

Because both G $\alpha_s$  (2, 15, 17) and G $\alpha_i$  (15, 18) have been shown to contribute to MAPK activation by the conventional agonist isoproterenol, we sought to determine whether this was also the case for drugs with dual efficacy like propranolol or ICI118551. The possible role of G $\alpha_s$  was assessed by comparing the effects of ICI118551 and isoproterenol in S49 wild-type and S49 cyc<sup>-</sup> cells that lack G $\alpha_s$  (19). As shown in Fig. 3A, both isoproterenol and ICI118551 promoted ERK phosphorylation in wild-type S49 cells, but only ICI118551 activated the kinase in the cyc<sup>-</sup> cells, indicating that G $\alpha_s$  is not needed for MAPK activation by dual efficacy drugs. To test the potential implication of G $\alpha_i$ /o, HEK293 cells were pretreated with pertussis toxin (PTX). The treatment abolished MAPK activation by a typical G $\alpha_i$ /o coupled  $\delta$ -opioid receptor but was without effect on ERK phosphorylation induced by ICI118551 (Fig. 3B), ruling out a role for G $\alpha_i$ /o in this response. In keeping with previous observations (15, 18) where MAPK activation by isoproterenol has been shown to require the sequential activation of G $\alpha_s$  and G $\alpha_i$ /o, the agonist response was not only absent in the S49 cyc<sup>-</sup> cells, but was also significantly inhibited by PTX treatment.

Taken together, these results indicate that unlike isoproterenol, ICI118551 activates the MAPK signaling pathway independently of G $\alpha_i$  and G $\alpha_s$ . The lack of G protein involvement is





**Fig. 4.** Involvement of Src and  $\beta$ -arrestin in isoproterenol- and ICI118551-mediated ERK1/2 activation. ERK1/2 phosphorylation was assessed in HEK293 cells stably expressing the  $\beta_2$ AR pretreated or not with the cell-permeable Src tyrosine kinase inhibitor, PP2 (50  $\mu$ M, 1 h) (A), or transiently transfected with the  $\beta$ -arrestin dominant negative  $\beta$ arr(319–418) or the empty vector pcDNA3 as a control (B). (C) ERK1/2 phosphorylation was assessed in mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from wild-type mice (WT) and from KO mice lacking both  $\beta$ -arrestin 1 and 2 ( $\beta$ arrDKO) that were transiently transfected with the human HA- $\beta_2$ AR. Expression levels of 150–250 fmol of  $\beta_2$ AR per mg of protein were reached in both WT and KO cells. For rescue experiments,  $\beta$ arrDKO MEF were cotransfected with HA- $\beta_2$ AR and  $\beta$ -arrestin 2 ( $\beta$ arrDKO +  $\beta$ -arrestin 2). In all cases, cells were stimulated for 5 min with 1  $\mu$ M isoproterenol (Iso) or ICI118551 (ICI). Data are expressed as percentage of the value obtained in nonstimulated cells and represent the mean  $\pm$  SEM of three to eight independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with basal. Insets show representative experiments.

further supported by the observation that overexpression of the carboxyl tail of GRK2, which acts as a scavenger of G $\beta\gamma$  (20), did not modify ICI118551-stimulated ERK1/2 phosphorylation (data not shown). G protein-independent activation of MAPK has been recently documented for mutants of the angiotensin II type 1 receptors that fail to couple to their cognate G proteins (21). This finding may indicate that G protein-independent MAPK signaling is a general feature of heptahelical receptors, unveiled when G protein coupling is prevented either as a result of mutations or after the stabilization of the receptor by ligands such as ICI118551 or propranolol that inhibit receptor–G protein interaction.

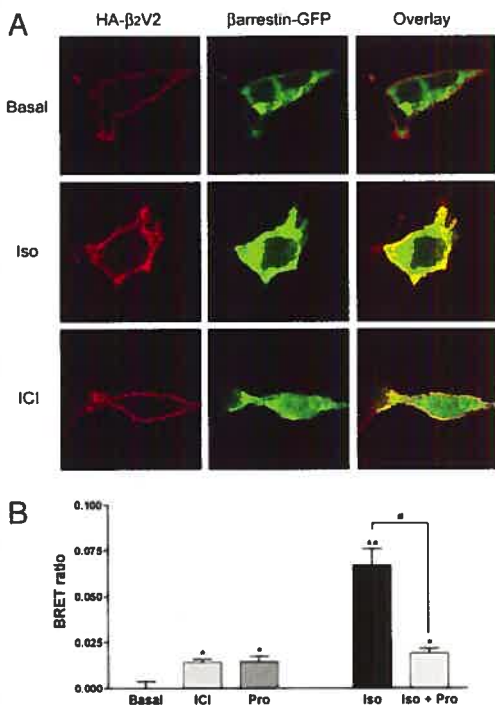
The nonreceptor tyrosine kinase Src is an intermediate in diverse pathways leading to MAPK activation by GPCRs (1, 3, 22) whether they involve G protein signaling (15) or not (21). As shown in Fig. 4A, G protein-independent activation of ERK by ICI118551 was also found to involve Src activation because it was blocked by the selective Src inhibitor PP2. Several mechanisms of Src activation by GPCRs have been proposed (1). For the  $\beta_2$ AR, isoproterenol stimulation has been shown to promote the recruitment of Src through an indirect interaction that involves the proline-rich motif of  $\beta$ -arrestin and the Src homology 3 domain of Src (3). In addition to its adaptor role, bridging the receptor and Src,  $\beta$ -arrestin has been shown to function as a

scaffold protein organizing the assembly of Raf, MAP/ERK kinase, ERK/ASK1, MKK4, and JNK3 modules for an increasing number of GPCRs (4–6, 23). We therefore examined the role of  $\beta$ -arrestin in promoting ERK1/2 activity by ICI118551. To do so, we first used a dominant negative mutant corresponding to the carboxyl-terminal fragment ( $\beta$ arr319–418) of  $\beta$ -arrestin, previously shown to decrease ERK1/2 activation by isoproterenol (24). Similar to the isoproterenol response, ICI118551 activation of ERK1/2 was inhibited by  $\beta$ arr319–418 (Fig. 4B), suggesting that  $\beta$ -arrestin also mediates the MAPK stimulation by dual efficacy drugs. The role of  $\beta$ -arrestin in ERK1/2-activation by ICI118551 was further documented by using MEFs derived from knockout (KO) animals lacking  $\beta$ -arrestin 1 and 2 ( $\beta$ arr-DKO) (25). In contrast with the significant ERK phosphorylation induced by isoproterenol and ICI118551 in wild-type MEFs, neither drug activated the MAPK pathway in the  $\beta$ arr-DKO cells (Fig. 4C). However, the ERK1/2 response to ICI118551 was restored on transient transfection of  $\beta$ -arrestin 2 into double KO (DKO) cells (Fig. 4C) confirming its role as an adaptor/scaffolding protein in this pathway.

$\beta$ -arrestins have been extensively characterized as regulators of agonist-induced GPCR signaling (26), and their role in agonist-promoted desensitization and receptor internalization are well defined. Classically,  $\beta$ -arrestins are recruited to the membrane by the agonist-occupied state of the receptor. Once this association takes place, the receptor is uncoupled from the G protein (27) and targeted to the endocytic compartment (28) via direct interactions with proteins of clathrin-coated pits (29–31). The observation that ICI118551 relies on  $\beta$ -arrestin to induce MAPK activation suggests that, in addition to classical agonists, some drugs normally classified as “inverse agonists” can also promote the recruitment of  $\beta$ -arrestin.

This hypothesis was tested by assessing ligand-promoted  $\beta$ -arrestin recruitment using immunofluorescence microscopy. In Cos1 cells coexpressing HA-tagged  $\beta_2$ AR and  $\beta$ -arrestin-GFP, a modest translocation of  $\beta$ -arrestin to the membrane could be observed on stimulation with isoproterenol but not ICI118551 or propranolol (data not shown). We reasoned that this negative result could be caused by a combination of factors. First, the  $\beta_2$ AR belongs to a class of GPCRs known to have relatively low affinity for  $\beta$ -arrestin, leading to only transient complexes between the two proteins (31). Second, when compared with isoproterenol, ICI118551 and propranolol display partial agonistic activities toward MAPK signaling and their reduced efficacy could have caused incomplete  $\beta$ -arrestin recruitment that went undetected. To overcome these limitations, we took advantage of the fact that V2R interacts more tightly than  $\beta_2$ AR with  $\beta$ -arrestin (31). Because this property has been mapped to the last 10 aa of the V2R tail, we used a receptor chimera consisting of the first 341 aa of the  $\beta_2$ AR fused to the last 29 aa of the V2R. This chimera has previously been shown to have high affinity for  $\beta$ -arrestin (31). As shown in Fig. 5A, isoproterenol and ICI118551 promoted a robust translocation of  $\beta$ -arrestin-GFP to the membrane of Cos1 cells expressing the chimeric  $\beta_2$ V2R. In contrast, vasopressin, which does not bind the chimera, was without effect on  $\beta$ -arrestin cell distribution (data not shown).

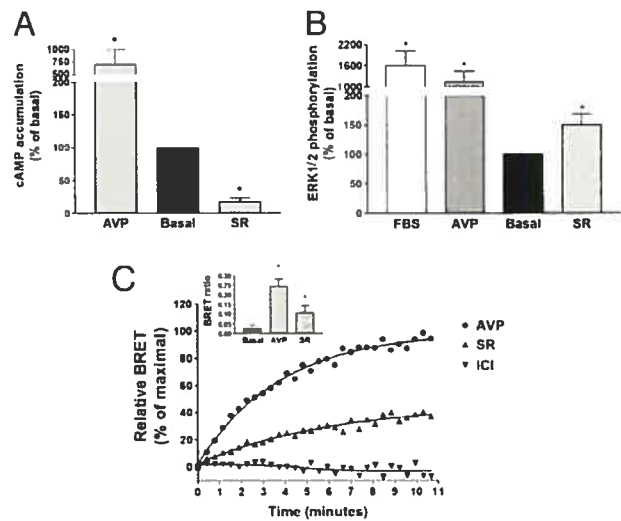
The results presented above are consistent with the notion that binding of compounds such as ICI118551 and propranolol can stabilize a receptor conformation that allows  $\beta$ -arrestin binding to a chimeric  $\beta_2$ V2R receptor, but did not prove that this can occur for the wild-type  $\beta_2$ AR. To directly assess the physical interaction between the ligand-bound  $\beta_2$ AR itself and  $\beta$ -arrestin, we turned to a more sensitive assay based on BRET. For this,  $\beta_2$ AR-GFP and  $\beta$ -arrestin-Rluc were transiently coexpressed in HEK293 cells. As shown in Fig. 5B, isoproterenol, propranolol, and ICI118551 all induced  $\beta$ -arrestin recruitment, as indicated by an increase in the BRET signal. Consistent with the partial



**Fig. 5.**  $\beta$ -arrestin recruitment. (A) Cos1 cells transiently expressing the HA-tagged  $\beta_2$ V2R chimera and  $\beta$ -arrestin-2-GFP were stimulated or not for 15 min with 10  $\mu$ M isoproterenol (Iso) or ICI118551 (ICI). Subcellular distribution was then assessed by fluorescence microscopy using Texas red-conjugated antibodies for the HA- $\beta_2$ V2R and direct fluorescence for the  $\beta$ -arrestin-GFP. (B) BRET was determined in HEK293 cells transiently coexpressing  $\beta_2$ AR-GFP and  $\beta$ -arrestin-Rluc after incubation with 1  $\mu$ M isoproterenol (Iso), ICI118551 (ICI), or propranolol (Pro) for 1 h at room temperature. Competitive antagonism of Pro on Iso-mediated  $\beta$ -arrestin recruitment was measured after pretreatment of the cells with 10  $\mu$ M Pro for 15 min before stimulation with 0.1  $\mu$ M Iso. Data are expressed as BRET ratio and represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with nonstimulated cells (basal); \*\*,  $P < 0.01$  compared with nonstimulated cells (basal); #,  $P < 0.001$  for the indicated comparison.

agonist effect of ICI118551 and propranolol on the MAPK activity, BRET increases promoted by these compounds were significantly smaller than the one induced by isoproterenol. This low efficacy of propranolol in promoting  $\beta$ -arrestin recruitment is consistent with previous immunofluorescence results showing that propranolol can inhibit isoproterenol-induced  $\beta$ -arrestin mobilization (29). Such an inhibition is also seen in the BRET experiments where propranolol reduced the signal induced by isoproterenol to the level attained on stimulation with propranolol alone (Fig. 5B).

Taken together, our observations suggest that, although they are inverse agonists on the  $G_{\alpha s}$ -stimulated AC cascade, compounds such as ICI118551 and propranolol have partial agonist efficacy on the  $\beta$ -arrestin-dependent MAPK pathway. These findings are not consistent with a classical view proposing a unique "activated" receptor conformation involved in G protein coupling and  $\beta$ -arrestin recruitment. They are more in keeping with the emerging concept that distinct active conformations may be stabilized by different ligands (32) and that some of these conformations may favor activation of one effector over another (33) or induce differential recruitment of  $\beta$ -arrestin (34, 35). For the systems considered herein, classical agonists like isoproterenol would stabilize a receptor state capable of activating  $G_{\alpha s}$  and of promoting the recruitment of  $\beta$ -arrestin, whereas the conformation stabilized by ICI118551 or propranolol would interdict productive G protein coupling but favor  $\beta$ -arrestin



**Fig. 6.** MAPK activation and  $\beta$ -arrestin recruitment by the V2R ligand SR121463B. HEK293 cells stably expressing the V2R were treated with 1  $\mu$ M Arg-vasopressin (AVP), SR121463B (SR), or 10% FBS, and cAMP accumulation (A) and ERK1/2 phosphorylation (B) were assessed after 15 and 5 min of incubation, respectively. Results are expressed as percentage of the value obtained in nonstimulated cells and represent the mean  $\pm$  SEM of three to four independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with basal. (C) BRET was determined in HEK293 cells transiently coexpressing V2R-GFP and  $\beta$ -arrestin-Rluc in the presence of 1  $\mu$ M AVP (●), SR (▲), or ICI (▼) for the indicated times. Data are expressed as percentage of the maximal BRET signal promoted by AVP and are representative of two to four independent experiments. (Inset) BRET ratio after a 5-min stimulation with 1  $\mu$ M AVP or SR. Data represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with nonstimulated cells (basal).

engagement. Previous reports showing that some GPCR antagonists can promote receptor endocytosis (36, 37), a phenomenon normally triggered by agonists, could also find their explanation in the concept of discrete receptor conformations that have only some of the properties of the fully active state. The idea that  $\beta$ -arrestin may interact with several distinct receptor conformations is also consistent with the observations that not only agonists (38) but also certain GPCR antagonists (39) display high affinity for the  $\beta$ -arrestin-bound form of the receptor.

In addition to demonstrating that ligands may have dual efficacies depending on the effector system considered, our study clearly shows that a single receptor can activate the MAPK through distinct mechanisms. Indeed, although both  $G_s$  and  $\beta$ -arrestin were found to be involved in the isoproterenol-mediated activation, only  $\beta$ -arrestin contributes to the activation by ICI118551 and propranolol. Whether this difference in the MAPK activation mechanism between the two classes of ligands could underlie the modest difference in the activation kinetics observed in Fig. 1D remains to be determined.

To assess whether dual efficacy was unique to  $\beta_2$ AR ligands or whether it could be a general concept applicable to other seven transmembrane domain receptors, AC and MAPK regulation by V2R drugs was also examined. As shown in Fig. 6A and B, SR121463B, a non-peptide V2R selective ligand, induced an inverse agonist response on the AC pathway but clearly stimulated MAPK activity in HEK293 cells stably expressing the human V2R, an observation that extends the concept of dual efficacy ligands to another GPCR. Similarly to what was observed for ICI118551 and propranolol at the  $\beta_2$ AR, SR121463B promoted the recruitment of  $\beta$ -arrestin to the V2R. Indeed, a time-dependent recruitment could be detected by BRET in HEK293 cells transiently coexpressing V2R-GFP and  $\beta$ -arrestin-Rluc (Fig. 6C). In agreement with the partial agonist activity of

SR121463B on the MAPK activity, its  $\beta$ -arrestin recruitment was also partial, with a BRET signal that reached 38% of the vasopressin-induced response. As expected, ICI118551 was without effect on the recruitment of  $\beta$ -arrestin to the V2R, confirming the selectivity of the response.

Overall, the results of the present study point to a general multistate model of receptor activation in which ligand-specific conformations are capable of differential activation of distinct signaling partners. This is reminiscent of the concept of "trafficking of receptor stimulus" (33, 40) previously proposed to explain that ligands can activate diverse effectors with distinct rank order of potencies and/or efficacies. However, results presented herein add a new level of complexity, showing that a ligand can have opposing efficacies on two effector systems engaged by the same receptor, indicating that the "direction" of response can be influenced by the effector considered. The study also confirms  $\beta$ -arrestin in its role as a genuine signaling partner

that can be involved in the G protein-independent signaling of seven transmembrane domain receptors.

We thank M. Lagacé for critical reading of the manuscript and A. Laperriere for expert technical assistance. MEF  $\beta$ -arrestin KO cells were a gift of R. J. Lefkowitz [Howard Hughes Medical Institute (HHMI), Duke University, Durham, NC], the  $\beta_2$ V2R construct was kindly provided by M. Caron (HHMI, Duke University), ERK2-GFP by K. DeFea (University of California, San Francisco), and rat  $\beta$ -arrestin 2 by S. Ferguson (Roberts Research Institute, University of Western Ontario, London, ON, Canada). This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada. M.A. retains a fellowship from the Canadian Hypertension Society, and P.G.C. retains a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada and Fonds de Recherche en Sante du Quebec (FRSQ); G.P. is recipient of a fellowship from FRSQ; and M.B. holds a Canada Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

- Gutkind, J. S. (2000) *Sci. STKE* 40, RE1.
- Schmitt, J. M. & Stork, P. J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 25342–25350.
- Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., et al. (1999) *Science* 283, 655–661.
- DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D. & Bunnett, N. W. (2000) *J. Cell. Biol.* 148, 1267–1281.
- McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J. & Lefkowitz, R. J. (2000) *Science* 290, 1574–1577.
- Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. & Lefkowitz, R. J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2449–2454.
- Kenakin, T. (2001) *FASEB J.* 15, 598–611.
- Adam, L., Bouvier, M. & Jones, T. L. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 26337–26343.
- Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. & Bouvier, M. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 44925–44931.
- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M. & Bouvier, M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3684–3689.
- Laurent, C. E., Cardinal, R., Rousseau, G., Vermeulen, M., Bouchard, C., Wilkinson, M., Armour, J. A. & Bouvier, M. (2001) *Am. J. Physiol.* 80, R355–R364.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680–685.
- Blaukat, A., Pizard, A., Rajerison, R. M., Alhenc-Gelas, F., Muller-Esterl, W. & Dikic, I. (1999) *FEBS Lett.* 451, 337–341.
- Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M. & Bouvier, M. (1994) *Mol. Pharmacol.* 45, 490–499.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (1997) *Nature* 390, 88–91.
- Murray, D. R. & Dugan, J. (2000) *Cardiol. Rev.* 8, 340–347.
- Wan, Y. & Huang, X. Y. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 14533–14537.
- Zamah, A. M., Delahunty, M., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 31249–31256.
- Salomon, M. R. & Bourne, H. R. (1981) *Mol. Pharmacol.* 19, 109–116.
- Luttrell, L. M., van Biesen, T., Hawes, B. E., Koch, W. J., Touhara, K. & Lefkowitz, R. J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 16495–16498.
- Seta, K., Nanamori, M., Modrall, J. G., Neubig, R. R. & Sadoshima, J. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 9268–9277.
- Maudsley, S., Pierce, K. L., Zamah, A. M., Miller, W. E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J. & Luttrell, L. M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 9572–9580.
- DeFea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O. & Bunnett, N. W. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11086–11091.
- Pierce, K. L., Maudsley, S., Daaka, Y., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1489–1494.
- Kohout, T. A., Lin, F. S., Perry, S. J., Conner, D. A. & Lefkowitz, R. J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1601–1606.
- Pierce, K. L. & Lefkowitz, R. J. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 727–733.
- Benovic, J. L., Bouvier, M., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1988) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4, 405–428.
- Scott, M. G., Benmerah, A., Muntaner O. & Marullo, S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 3552–3559.
- Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Menard, L. & Caron, M. G. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 18302–18305.
- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. & Benovic, J. L. (1996) *Nature* 383, 447–450.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 32248–32257.
- Ghanouni, P., Gryczynski, Z., Steenhuis, J. J., Lee, T. W., Farrens, D. L., Lakowicz, J. R. & Kobilka, B. K. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 24433–24436.
- Berg, K. A., Maayani, S., Goldfarb, J., Scaramellini, C., Leff, P. & Clarke, W. P. (1998) *Mol. Pharmacol.* 54, 94–104.
- Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Bodduluri, S. R., Laporte, S. A., Law, P. Y. & Caron, M. G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7157–7162.
- Whistler, J. L. & von Zastrow, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9914–9919.
- Roettger, B. F., Ghanekar, D., Rao, R., Toledo, C., Yingling, J., Pinon, D. & Miller, L. (1997) *J. Mol. Pharmacol.* 51, 357–362.
- Bhowmick, N., Narayan, P. & Puett, D. (1998) *Endocrinology* 139, 3185–3192.
- Gurevich, V. V., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J. L., Hosey, M. M. & Onorato, J. J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 28849–28852.
- Martini, L., Hastrup, H., Holst, B., Fraile-Ramos, A., Marsh, M. & Schwartz, T. W. (2002) *Mol. Pharmacol.* 62, 30–37.
- Watson, C., Chen, G., Irving, P., Way, J., Chen, W. J. & Kenakin, T. (2000) *Mol. Pharmacol.* 58, 1230–1238.

## 2.2 Article 2

### **Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances $\beta$ -arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation.**

Pascale G Charest et Michel Bouvier. *J. Biol. Chem.* 278 :41541 (2003).

Comme mentionné dans la section 1.6 de l'introduction, la palmylation des RCPGs représente un mécanisme potentiel de régulation de la fonction de ces récepteurs. Toutefois, un tel rôle de la palmylation des RCPGs n'a pas toujours été observé. Ceci est entre autres le cas du V2R pour lequel la palmylation des cystéines C341 et C342 a été rapportée peu avant le début de la présente étude (Sadeghi et al. 1997). En effet, dans l'étude de Sadeghi *et al.*, la perte de palmylation du V2R ne semble pas affecter la fonction ni la régulation du récepteur. Un autre groupe avait toutefois rapporté que la mutation des cystéines C341 et C342 du V2R menait à une réduction de l'endocytose du récepteur dépendante du ligand (Schulein et al. 1996).

Avec le nombre grandissant d'études rapportant l'activation des MAPKs par les RCPGs ainsi que la première démonstration que la stimulation du V2R par l'AVP pouvait induire l'activation d'ERK1/2 (Thibonnier et al. 1998), nous avons voulu étudier l'effet de la perte de palmylation du V2R sur cette voie de signalisation.

## Palmitoylation of the V2 Vasopressin Receptor Carboxyl Tail Enhances $\beta$ -Arrestin Recruitment Leading to Efficient Receptor Endocytosis and ERK1/2 Activation\*

Received for publication, June 20, 2003, and in revised form, July 21, 2003  
Published, JBC Papers in Press, August 4, 2003, DOI 10.1074/jbc.M306589200

Pascale G. Charest<sup>‡</sup> and Michel Bouvier<sup>§</sup>

From the Department of Biochemistry and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

A large number of G protein-coupled receptors are palmitoylated on cysteine residues located in their carboxyl tail, but the general role of this post-translational modification remains poorly understood. Here we show that preventing palmitoylation of the V2 vasopressin receptor, by site-directed mutagenesis of cysteines 341 and 342, significantly delayed and decreased both agonist-promoted receptor endocytosis and mitogen-activated protein kinase activation. Pharmacological blockade of receptor endocytosis is without effect on the vasopressin-stimulated mitogen-activated protein kinase activity, excluding the possibility that the reduced kinase activation mediated by the palmitoylation-less mutant could result from altered receptor endocytosis. In contrast, two dominant negative mutants of  $\beta$ -arrestin which inhibit receptor endocytosis also attenuated vasopressin-stimulated mitogen-activated protein kinase activity, suggesting that the scaffolding protein,  $\beta$ -arrestin, represents the common link among receptor palmitoylation, endocytosis, and kinase activation. Coimmunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer experiments confirmed that inhibiting receptor palmitoylation considerably reduced the vasopressin-stimulated recruitment of  $\beta$ -arrestin to the receptor. Interestingly, the changes in  $\beta$ -arrestin recruitment kinetics were similar to those observed for vasopressin-stimulated receptor endocytosis and mitogen-activated protein kinase activation. Taken together the results indicate that palmitoylation enhances the recruitment of  $\beta$ -arrestin to the activated V2 vasopressin receptor thus facilitating processes requiring the scaffolding action of  $\beta$ -arrestin.

Among the molecular mechanisms regulating G protein-coupled receptor (GPCR)<sup>1</sup> function, post-translational modifica-

\* This work was supported in part by grants from the Canadian Institute for Health Research and the Québec Heart and Stroke Foundation. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>‡</sup> Supported by doctoral fellowships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

<sup>§</sup> Holder of Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. To whom correspondence should be addressed: Dept. de Biochimie, Université de Montréal, C. P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. [REDACTED]

<sup>1</sup> The abbreviations used are: GPCR, G protein-coupled receptor; AVP, arginine vasopressin;  $\beta_2$ AR,  $\beta_2$ -adrenergic receptor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; 2-BrP, 2-bromopalmitic acid; BSA, bovine serum albumin; DSP, dithiobis(succinimidyl propionate);

tions such as phosphorylation and palmitoylation have been the subject of numerous studies. The role of phosphorylation in receptor desensitization is now well established (1). Upon activation, GPCRs become phosphorylated by both second messenger-activated and GPCR kinases on serine and threonine residues located in the third intracellular loop and/or carboxyl-terminal tail of the receptors. These phosphorylation events prevent further G protein interaction through the involvement of  $\beta$ -arrestin proteins preferentially binding to receptors phosphorylated by GPCR kinases. In addition to promoting receptor/G protein uncoupling, the  $\beta$ -arrestins target such desensitized receptors to clathrin-coated pits for endocytosis by functioning as adaptor proteins that link the receptors to components of the endocytic machinery. Furthermore,  $\beta$ -arrestin acts as a scaffolding protein directly linking the receptors to the mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathways, a process that has been shown to play an important role in GPCR-mediated MAPK activation (2).

On the other hand, GPCR palmitoylation has also been shown to affect receptor function, but its precise role is not well defined. This post-translational modification, resulting from the covalent linkage of palmitic acid through a thioester bond, usually occurs at the level of conserved cysteine residues in the carboxyl tail of receptors. GPCR palmitoylation has been found to affect differentially a broad spectrum of biological processes, including G protein coupling efficiency and selectivity, receptor phosphorylation and desensitization, receptor endocytosis, cell surface expression and trafficking, and receptor down-regulation (3). Despite the role that  $\beta$ -arrestin plays in several of these processes, the influence of receptor palmitoylation on the recruitment of the scaffolding protein has never been investigated.

For the V2 vasopressin receptor (V2R), palmitoylation has been shown to occur on cysteine residues 341 and 342 in the carboxyl tail of the receptor (4). In two studies, mutation of these palmitoylation sites had no effect on the arginine vasopressin (AVP) binding affinity or agonist-stimulated adenylyl cyclase activity (4, 5). Similarly, no difference in agonist-promoted desensitization was observed between wild-type and the palmitoylation-less mutant V2R (4). In contrast, Schülein *et al.* (5) also reported that lack of palmitoylation was associated with a reduced rate of agonist-promoted endocytosis. However, this finding was not confirmed by Sadeghi *et al.* (4), where wild-type V2R and two palmitoylation-less V2R mutants

ERK, extracellular signal-regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; GFP, green fluorescent protein; HEK293, human embryonic kidney 293 cells; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PBS, phosphate-buffered saline; P-ERK1/2, phosphorylated ERK1/2; V2R, V2 vasopressin receptor; wt, wild-type.

(C341G/C342G, C341S/C342S) were reported to have identical AVP-promoted endocytosis.

Although stimulation of adenylyl cyclase through  $G_s$  is the best characterized signaling cascade engaged by the V2R, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) have also been shown to be activated upon activation of the V2R by its natural ligand, AVP (6). Among diverse mechanisms,  $\beta$ -arrestin recruitment and receptor endocytosis have often been proposed to be implicated in the activation of these MAPKs by GPCR. Despite the growing recognition that activation of MAPK by GPCR plays important roles in downstream signaling events (7) and the putative role of palmitoylation in agonist-promoted endocytosis, very little is known of the potential role of receptor palmitoylation in MAPK activation.

In the present study, we investigated the role of V2R palmitoylation on AVP-stimulated MAPK activation, receptor endocytosis, and  $\beta$ -arrestin recruitment. We report that the lack of palmitoylation at cysteines 341 and 342 significantly decreases the rate and extent of  $\beta$ -arrestin recruitment to the V2R, thus leading to slower and reduced receptor endocytosis and MAPK activation. Our results also indicate that although the scaffolding function of  $\beta$ -arrestin plays important roles in both AVP-stimulated endocytosis and MAPK activation, the latter can occur independently of receptor internalization. We thus suggest that V2R palmitoylation serves to induce and/or stabilize a particular receptor conformation, optimizing the interaction of  $\beta$ -arrestin with the receptor and facilitating  $\beta$ -arrestin-dependent downstream events such as ERK1/2 activation and endocytosis.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, glutamine, Fungizone, G418, and phosphate-buffered saline (PBS) were all from Wisent, Inc. Cell culture plates and dishes were from Corning. Bovine serum albumin (BSA), AVP, 3-isobutylmethylxanthine, *o*-phenylenediamine dihydrochloride tablets (OPD peroxidase substrate), and tunicamycin were from Sigma. The Bio-Rad D<sub>c</sub> Protein Assay kit and the Bradford reagent were from Bio-Rad Laboratories. [<sup>3</sup>H]Adenine, [<sup>3</sup>H]palmitic acid, <sup>32</sup>P<sub>i</sub>, and ECL were from PerkinElmer Life Sciences. Antibodies recognizing ERK1/2 and their phosphorylated forms (P-ERK1/2), anti-myc mouse monoclonal 9E10, and rabbit polyclonal A14 IgGs were from Santa Cruz Biotechnology Inc. Anti-human (h)V2R AS435 antibody was a generous gift from W. Muller-Esterl (University of Frankfurt Medical School, Frankfurt).

### Expression Vectors

*wtV2R and C341A/C342A-V2R*—Wild-type hV2R was subcloned 3' to the myc epitope sequence (MEQKLISEEDLNA) into the pBC12BI mammalian expression vector as described previously (8). The myc epitope-tagged hV2R (mycV2R) was then subcloned into a pcDNA3 vector in which the cytomegalovirus promoter had been replaced by the Rous sarcoma virus (RSV) promoter. The V2R mutant lacking the palmitoylation sites cysteine 341 and cysteine 342 (C341A/C342A-V2R) was constructed by PCR site-directed mutagenesis of the cysteines into alanines using the wild-type pcDNA3-RSV-mycV2R.

*V2R-GFP and C341A/C342A-V2R-GFP*—The coding sequence of the green fluorescent protein variant GFP10 (9) was inserted in-frame 3' of the wild-type V2R coding sequence into pcDNA3.1-V2R so that a 14-amino acid linker (GSGTAGPGSPPVAT) separated the carboxyl tail of the V2R and the initiator methionine of GFP10. The palmitoylation sites cysteine 341 and cysteine 342 were then replaced by alanine residues by PCR site-directed mutagenesis to generate the pcDNA3.1-C341A/C342A-V2R-GFP.

*$\beta$ -Arrestin Constructs*—For the  $\beta$ -arrestin-Rluc, the rat  $\beta$ -arrestin2 (arrestin3) coding sequence was inserted in-frame 5' of the *Renilla* luciferase sequence in the pRluc vector (PerkinElmer Life Sciences) so that a 7-amino acid linker (GAGALAT) separated the carboxyl terminus of  $\beta$ -arrestin and the initiator methionine of Rluc. For the  $\beta$ -arrestin-GFP, the rat  $\beta$ -arrestin2 coding sequence was subcloned in-frame 5' of the GFP10 coding sequence within the pcDNA3.1-V2R-GFP (see above) after removing the V2R coding sequence. This led to a construct in

which the carboxyl terminus of the  $\beta$ -arrestin was separated from the initiator methionine of GFP10 by a 6-amino acid linker (GSGTGS).  $\beta$ -Arrestin (319–418) and  $\beta$ -arrestin V53D (10) were generously provided by J. Benovic (Thomas Jefferson University, Philadelphia).

All constructs were confirmed by sequencing.

### Cell Culture and Transfections

Human embryonic kidney 293 cells (HEK293) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 0.1 unit/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 0.25  $\mu$ g/ml Fungizone. Stable transfections of myc-tagged wt- or C341A/C342A-V2R were performed using the calcium phosphate precipitation method, and neomycin-resistant cells were selected in the presence of 450  $\mu$ g/ml G418. Resistant clones were screened for V2R expression by radioligand binding assay. In cases where receptors and accessory proteins needed to be overexpressed, transient transfections were made, and cells were harvested 48 h after transfection. In bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays, the calcium phosphate precipitation method (11) was used, whereas FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science) was utilized, according to the manufacturer's protocol, in all other cases.

### [<sup>3</sup>H]AVP Radioligand Binding Assay

Radioligand binding assays were carried out in both whole cell and purified membrane preparations using [<sup>3</sup>H]AVP (PerkinElmer Life Sciences) as radioligand. In the case of membrane binding, cells were washed twice with cold PBS, lysed in 15 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM EDTA, pH 7.4, using a Polytron (three times for 5 s). The supernatant resulting from a 5-min 200  $\times$  g centrifugation was recentrifuged at 40,000  $\times$  g for 20 min. The pelleted membranes were washed once in 50 mM Tris-Cl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, and a binding assay was carried out in the same buffer. 15  $\mu$ g of membrane proteins were incubated for 30 min at room temperature in the presence of increasing concentrations of [<sup>3</sup>H]AVP (0.1–40 nM) and 1 mg/ml BSA, in a total volume of 300  $\mu$ l. Nonspecific binding was determined in the presence of 10  $\mu$ M cold AVP. For whole cell binding, cells were detached from 100-mm dishes using 5 mM EDTA in PBS. Cells (40  $\mu$ g of cell proteins) were then resuspended in ice-cold PBS and the radioligand binding initiated by adding a saturating concentration of [<sup>3</sup>H]AVP (20 nM) in the presence or absence 10  $\mu$ M cold AVP for 2 h at 4 °C. In both cases, the reaction was stopped by rapid filtration over glass fiber (GF/C) filters (Whatman) and bound radioligand detected by scintillation counting.

### [<sup>3</sup>H]Palmitic Acid Labeling and V2R Purification

Cells were grown in 100-mm dishes, preincubated for 1 h in serum-free medium, and labeled with 0.4 mCi/ml [<sup>3</sup>H]palmitic acid for 2 h at 37 °C. Where indicated, cells were also pretreated for 16 h in the presence of 100  $\mu$ M 2-bromopalmitic acid (2-BrP) (Fluka Chemie) or 4 h with 30  $\mu$ M tunicamycin at 37 °C. After metabolic labeling, V2Rs were purified by immunoprecipitation using the AS435 antibody raised against the carboxyl-terminal portion of the human V2R (peptide ARG29, ARGRTPPSLGPGQDESCTTASSSLAKDTSS). The selectivity of the antibody was confirmed by the fact that a band was identified only in cells transfected with the V2R and that the myc-tagged V2R was recognized by both AS435 and the anti-myc 9E10 antibodies. Labeled cells were washed twice with cold PBS and lysed by sonication (twice for 15 s) in 25 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.4, in the presence of protease inhibitors (10  $\mu$ g/ml benzamide, 5  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, 5  $\mu$ g/ml leupeptin) and 5 mM *N*-ethylmaleimide at 4 °C. The lysate was centrifuged for 5 min at 500  $\times$  g and then 20 min at 40,000  $\times$  g at 4 °C. The recovered membranes were then washed once in the same buffer and solubilized in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, with protease inhibitors and *N*-ethylmaleimide) for 1 h at 4 °C under gentle agitation. The solution was then centrifuged 1 h at 145,000  $\times$  g at 4 °C to get rid of insoluble material, and the supernatant was preincubated with a suspension of *Staphylococcus aureus* (Pansorbin; Calbiochem) for 30 min at 4 °C before incubation with 5  $\mu$ l of AS435 antibody in the presence of 1% BSA for 16 h at 4 °C. Antigen-antibody complexes were then isolated by incubation with 40  $\mu$ l of Pansorbin for 2 h at 4 °C followed by centrifugation at 4,000  $\times$  g for 2 min. Precipitates were washed five times in RIPA buffer and proteins eluted in 50  $\mu$ l of SDS-PAGE loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.5, 4% SDS, 1 M urea, 5% glycerol, 0.1% bromophenol blue). Proteins were then resolved on SDS-PAGE in nonreducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes. Tritium-labeled proteins were detected using EA-Wax (EABiotech Ltd., Interscience) and exposing the membranes to Kodak

X-Omat film for 1 week. Detection of the receptors by immunoblots was performed using the anti-myc monoclonal 9E10 IgG as a primary antibody followed by an anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgG (Amersham Biosciences) for chemiluminescence detection.

#### Intracellular cAMP Accumulation Measurement

Cells were grown in 6-well plates and incubated in the presence of 2  $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H]adenine in complete Dulbecco's modified Eagle's medium for 16 h. They were then washed twice with PBS containing 1 mM isobutylmethylxanthine before being incubated in the presence of increasing concentration of AVP for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 1 ml of ice-cold 5% trichloroacetic acid and 1 mM unlabeled cAMP to decrease enzymatic degradation of [ $^3$ H]cAMP. The cells were scraped off the plates and centrifuged at 800  $\times g$  for 20 min at 4 °C to clear the lysate. The [ $^3$ H]cAMP was then separated by sequential chromatography over Dowex and Alumina columns as described previously (56). The cAMP accumulation was calculated as ( $^3$ H]cAMP cpm / ( $^3$ H]cAMP cpm + [ $^3$ H]ATP cpm)  $\times$  1,000 and expressed as a percentage of the maximal AVP-stimulated cAMP production for the wtV2R.

#### ERK1/2 Phosphorylation and Immunoblots

Cells were grown in 6-well plates and rendered quiescent by serum starvation for 24 h prior to stimulation with 10% FBS or different concentrations of AVP for the indicated time. Cells were then placed on ice, washed twice with ice-cold PBS, and solubilized directly in 100  $\mu$ l of Laemmli sample buffer containing 50 mM dithiothreitol. The samples were sonicated for 10 s, heated for 5 min at 95 °C, and microcentrifuged 5 min before fractionation of the proteins on SDS-PAGE. ERK1/2 phosphorylation was detected by protein immunoblotting using P-ERK1/2-specific antibodies and horseradish peroxidase-conjugated IgG as secondary antibody for chemiluminescence detection. After quantification of phosphorylation by autoradiography, nitrocellulose membranes were stripped of immunoglobulins and reprobed using anti-ERK1/2. ERK1/2 phosphorylation was normalized according to the loading of proteins by expressing the data as a ratio of P-ERK1/2 over total ERK1/2.

#### Receptor Internalization Assay

Receptor internalization was measured as described previously (12). Cells were grown in 24-well plates and washed twice with 0.2 M Hepes in Dulbecco's modified Eagle's medium prior to incubation with AVP for the indicated time. Stimulations were stopped on ice, and cells were washed twice with cold PBS and blocked for 30 min with 1% BSA in PBS before being incubated for 1 h with the anti-myc 9E10 antibody. Cells were then washed three times with 1% BSA in PBS and fixed for 15 min at room temperature with 3% paraformaldehyde in PBS. They were then washed twice with PBS, reblocked for 15 min, and incubated with an anti-mouse horseradish peroxidase antibody. Antibody binding was then visualized after three additional washes by adding 0.5 ml of OPD peroxidase substrate diluted in PBS. Reactions were stopped by adding 0.1 ml of 3 N HCl, and the absorbance of the samples was read at 492 nm in a spectrophotometer.

#### BRET

The BRET between the V2R-GFP and  $\beta$ -arrestin2-Rluc was measured as described previously (13). Briefly, 48 h post-transfection, cells were detached and washed twice with PBS at room temperature. Cells (40  $\mu$ g of proteins) were then distributed in a 96-well microplate (white Optiplate from Packard Bioscience) and incubated in the presence or absence of 1  $\mu$ M AVP for the indicated time. DeepBlueC<sup>TM</sup> coelenterazine (Packard Bioscience) was added at a final concentration of 5  $\mu$ M, and readings were collected using a modified top count apparatus (BRETCount) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370–450 and 500–530 nm windows using filters with the appropriate band pass (Chroma). The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by the receptor-GFP (500–530 nm) to the light emitted by the  $\beta$ -arrestin2-Rluc (370–450 nm). The values were corrected by subtracting the background signal detected when the  $\beta$ -arrestin2-Rluc construct was expressed alone. Where indicated, cells were pretreated for 16 h in the presence of 100  $\mu$ M 2-BtP or 4 h with 30  $\mu$ M tunicamycin at 37 °C before being detached.

#### $\beta$ -Arrestin2-GFP Coimmunoprecipitation

Coimmunoprecipitation of covalently cross-linked  $\beta$ -arrestin to V2Rs was performed as described previously (14). Cells were transiently transfected with  $\beta$ -arrestin2-GFP and myc-tagged wt- or C341A/C342A-V2R. 48 h post-transfection, cells were incubated with or without 1  $\mu$ M AVP in PBS for 15 min at 37 °C, and stimulations were

terminated by the addition of the membrane-permeable and reversible cross-linking agent DSP at a final concentration of 2 mM. Cells were then incubated for 30 min at room temperature under gentle agitation; washed twice with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 in PBS to neutralize unreacted DSP; lysed in 0.5 ml of 50 mM Hepes, 50 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 100  $\mu$ M Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml benzamidine, 5  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, and *N*-ethylmaleimide; and clarified by centrifugation. 25- $\mu$ l aliquots of whole cell lysate was removed and mixed with an equal volume of 2 $\times$  reducing loading buffer (with dithiothreitol at a final concentration of 50 mM). To isolate V2R-bound  $\beta$ -arrestin2-GFP, BSA was added to each lysate to a final concentration of 1%, and immunoprecipitation was performed for 16 h at 4 °C using the anti-myc monoclonal 9E10 antibody precoated on protein G-Sepharose beads (Amersham Biosciences). Immune complexes were washed three times with glycerol lysis buffer and eluted in 1 $\times$  reducing loading buffer 15 min at 45 °C. Proteins were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for immunoblotting. Immunoblotting of  $\beta$ -arrestin2-GFP was performed using rabbit polyclonal anti-GFP IgG (Clontech), and immunoblotting of mycV2Rs was performed using rabbit polyclonal anti-myc A14 IgG. Immune complexes were then visualized by chemiluminescence detection using anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG.

#### Receptor Phosphorylation Assay

Cells were grown in 100-mm dishes, preincubated for 1 h in 0.2 M Hepes in phosphate-free medium, and labeled with 0.5 mCi/ml  $^{32}$ P<sub>i</sub> for 2 h at 37 °C with or without 1  $\mu$ M AVP for the last 15 min. Labeled cells were washed twice with cold PBS and incubated in RIPA buffer for 1 h under gentle agitation. The solution was then centrifuged for 1 h at 145,000  $\times g$  at 4 °C to get rid of insoluble material, and the V2Rs were purified by overnight immunoprecipitation at 4 °C using the anti-myc monoclonal 9E10 antibody precoated on protein G-Sepharose beads. Immune complexes were washed three times with RIPA buffer and eluted in 1 $\times$  loading buffer 15 min at 45 °C. Proteins were then resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes where  $^{32}$ P-labeled proteins were detected using the Molecular Imager<sup>®</sup> FX PhosphorImager (Bio-Rad). Detection of the receptors by immunoblots was performed using rabbit polyclonal anti-myc A14 IgG. Immune complexes were then visualized by chemiluminescence detection using anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG.

#### Protein Determination

Protein concentrations were determined using either the Bio-Rad D<sub>c</sub> Protein Assay or the Bradford quantification assay using BSA as standard.

#### Data Analysis

Dose-response curves and saturation experiments were analyzed by nonlinear regression using Prism (GraphPad Software), and the EC<sub>50</sub> values were derived from the curves. Affinity constant ( $K_d$ ) and maximal binding ( $B_{max}$ ) values of the radioligand were derived from the curve fitting. Immunoreactivities were determined by densitometric analysis of the films using NIH Image software. The extent of receptor phosphorylation was determined by digital analysis of the images generated by the PhosphorImager using the Quantity One software (Bio-Rad). The MAPK activation, internalization, and  $\beta$ -arrestin recruitment rates were evaluated by analyzing the linear portion of the curves with the following rate equation

$$q(t) = q(t \rightarrow \infty) + q(t = 0)e^{-Rt} \quad (\text{Eq. 1})$$

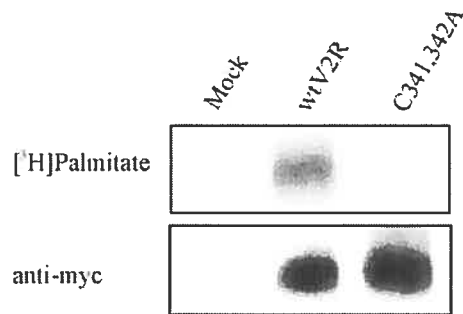
where  $t$  is the time of incubation (in min),  $R$  is the rate, and  $q$  represents the level of MAPK activation, internalized receptors, or  $\beta$ -arrestin recruitment. The data in the initial part of the curves were plotted as in Equation 2.

$$f(t) = \ln(q(t)/q(0)) \quad (\text{Eq. 2})$$

The half-times were estimated as  $t$  where  $q(t) = 50\%$  of the maximal effect in each data set. Statistical significances of the differences were carried out using unpaired Student's  $t$  test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

**Expression and Palmitoylation State of Wild-type and Mutant V2Rs**—To study the role of palmitoylation of the V2Rs, HEK293 cells were stably transfected with myc-tagged wtV2Rs

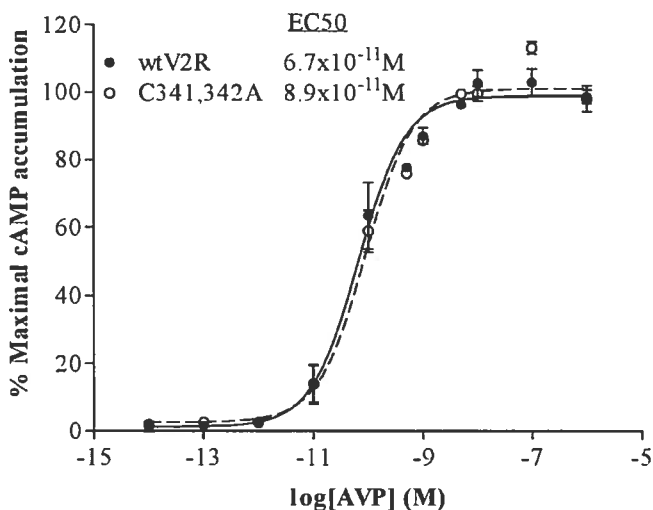


**FIG. 1. [ $^3\text{H}$ ]palmitate incorporation into wt- and C341A/C342A-V2R.** HEK293 cells stably expressing equivalent numbers of myc-wtV2R or myc-C341A/C342A-V2R (C341,342A) were metabolically labeled with [ $^3\text{H}$ ]palmitate and the receptor purified by immunoprecipitation using the anti-V2R antibody (polyclonal antibody AS435) and resolved on SDS-PAGE. [ $^3\text{H}$ ]Palmitate incorporation was revealed by autoradiography after transfer to nitrocellulose. The expression level of each receptor was assessed by Western blot analysis of the same samples using the 9E10 anti-myc antibody. Immunoprecipitation using untransfected HEK293 cells was carried out as a control (*Mock*). The data shown are representative of three experiments.

or mutant receptors in which the potential palmitoylation sites (cysteines 341 and 342) were replaced by alanines (C341A/C342A-V2R). Clonal cell lines expressing similar and physiological levels (wtV2R,  $350 \pm 20$  fmol/mg; C341A/C342A,  $290 \pm 20$  fmol/mg) of V2Rs as determined by [ $^3\text{H}$ ]AVP binding were selected and used in the various assays. Saturation binding experiments performed on isolated membranes of these clones confirmed, as reported previously (5), that the replacement of cysteines 341 and 342 by alanines does not affect the affinity of the receptor for AVP ( $K_d =$  wtV2R,  $0.8 \pm 0.1$  nM versus C341A/C342A,  $0.7 \pm 0.1$  nM).

The palmitoylation state of the V2Rs was then verified by metabolic labeling of the cells with [ $^3\text{H}$ ]palmitic acid followed by immunoprecipitation of the receptors as described under "Experimental Procedures." Fig. 1 shows that mutation of cysteines 341 and 342 in the V2R greatly reduced the level of tritium incorporation in the receptor, confirming that these cysteines represent the major palmitoylation sites (4).

**Role of V2R Palmitoylation in Intracellular Signaling**—To assess the importance of palmitoylation in receptor signaling, we investigated the effect of mutating cysteines 341 and 342 on the ability of the V2R to activate adenylyl cyclase and MAPK pathways. As reported previously (4, 5), replacing cysteines 341 and 342 with alanine residues did not affect AVP-stimulated adenylyl cyclase activity. Indeed, neither the efficacy nor the potency of AVP for this signaling pathway was affected by the mutation in HEK293 cells stably expressing comparable amounts of receptors (Fig. 2). In contrast, significant differences in the pattern of the ERK1/2 MAPK stimulation were observed between wt- and C341A/C342A-V2R (Fig. 3). Although an AVP-mediated increase in ERK1/2 activity was observed with both receptors, as assessed by immunoblotting using phospho-specific ERK1/2 antibodies, a delayed and reduced activation was found for the palmitoylation-less mutant (Fig. 3A). However, AVP was found to promote a more sustained ERK1/2 activation through the C341A/C342A-V2R. Quantitative assessment of these differences using total ERK1/2 immunoreactivity to normalize the phosphorylation levels is shown in Fig. 3B. The maximal level of wtV2R-mediated ERK1/2 phosphorylation was reached as early as 2 min after the addition of AVP and returned to basal level after 10 min, whereas the C341A/C342A-V2R-mediated phosphorylation of the kinases peaked after  $\sim 4$  min and only returned to basal level after 20 min. Kinetic analysis of the initial ERK1/2 activation curves revealed a significantly ( $p < 0.05$ ) reduced



**FIG. 2. AVP-stimulated cAMP accumulation in HEK293 cells stably expressing wt- or C341A/C342A-V2R.** [ $^3\text{H}$ ]cAMP accumulation was assessed in whole cells prelabeled with [ $^3\text{H}$ ]adenine and treated with increasing concentrations of AVP for 10 min at 37 °C. cAMP production was calculated as ( $^3\text{H}$ ]cAMP dpm/ $^3\text{H}$ ]ATP dpm + [ $^3\text{H}$ ]cAMP dpm)  $\times$  1,000 and expressed as percentage of the maximal accumulation observed for the wild-type receptor.  $\text{EC}_{50}$ , concentration of AVP producing half-maximal cAMP accumulation. The curves shown represent the mean  $\pm$  S.D. of two independent experiments.

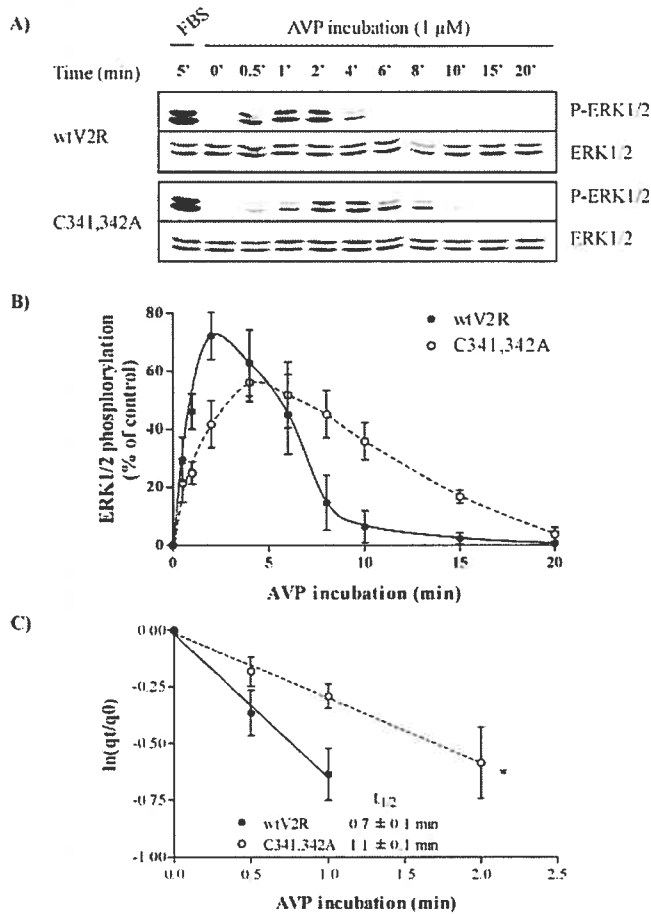
rate of C341A/C342A-mediated kinase activation compared with wtV2R (Fig. 3C;  $t_{1/2}$ : wtV2R,  $0.7 \pm 0.1$  min versus C341A/C342A,  $1.1 \pm 0.1$  min). It thus appears that the cellular response leading to ERK1/2 activation develops more slowly through the C341A/C342A-V2R than with the wild-type receptor.

To characterize further the differences between wt- and C341A/C342A-V2R-mediated ERK1/2 activation, AVP dose-response curves were carried out for stimulation time corresponding to the peak activation of each receptor (*i.e.* 2 min for wtV2R and 4 min for C341A/C342A; Fig. 4A). Consistent with the lack of effect of the mutation on the affinity of the receptor for AVP, no difference in the  $\text{EC}_{50}$  was observed (Fig. 4B). However, the maximal response mediated by C341A/C342A-V2R was lower than that of the wild-type receptor by  $\sim 35\%$ . Taken together, these results suggest that the V2R-linked MAPK pathway, but not the adenylyl cyclase one, is affected by the palmitoylation state of the receptor.

**Internalization of V2Rs**—We then examined the potential role of palmitoylation on AVP-promoted V2R endocytosis by assessing the influence of cysteine 341 and 342 mutations on receptor internalization. For this purpose, the effect of AVP on cell surface receptor expression was measured by enzyme-linked immunosorbent assay using an anti-myc antibody detecting the amino-terminally myc-tagged cell surface receptors. Internalization was determined as the AVP-promoted decrease in cell surface immunoreactivity. As shown in Fig. 5A, the extent of endocytosis was reduced significantly for the palmitoylation-less mutant, reaching only  $69 \pm 4\%$  compared with  $87 \pm 3\%$  for the wild-type receptor. More importantly, C341A/C342A-V2R was found to undergo AVP-promoted internalization at a significantly ( $p < 0.01$ ) reduced rate compared with the wild-type receptor (Fig. 5B;  $t_{1/2}$ : wtV2R,  $5.4 \pm 0.5$  min versus C341A/C342A-V2R,  $9.1 \pm 0.5$  min). It follows that, as was found for the AVP-stimulated ERK1/2 activity, both the kinetic and the extent of V2R endocytosis are modulated by the receptor palmitoylation state.

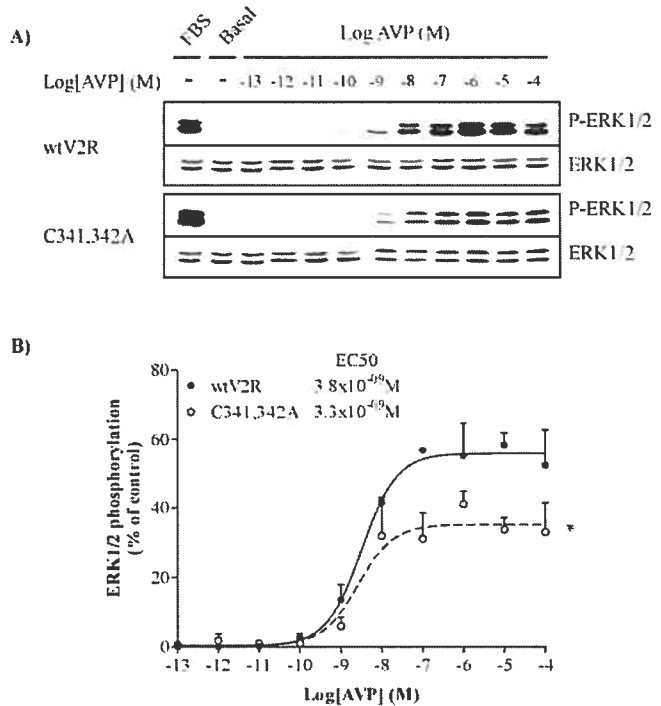
**$\beta$ -Arrestin-mediated ERK1/2 Activation**—Because both endocytosis and MAPK activation were found to be decreased and





**FIG. 3. Time course of AVP-induced ERK1/2 activity.** A, HEK293 cells stably expressing myc-wtV2R or myc-C341A/C342A-V2R (C341,342A) were stimulated with 1  $\mu$ M AVP or 10% FBS for the indicated times. MAPK activity was then detected using phospho-specific anti-ERK1/2 antibodies (P-ERK1/2). Levels of the MAPK were controlled using antibodies directed against the total kinase population (ERK1/2). B, graphic representation of the data expressed as P-ERK1/2 over ERK1/2 in percentage of the levels observed with 10% FBS used as the reference control. The curves shown represent the mean  $\pm$  S.E. of at least four independent experiments. C, rate of ERK1/2 phosphorylation determined using the initial portion of the curves presented in B. \*, indicates  $p < 0.05$  between the half-times.

delayed by mutating cysteines 341 and 342, and given the proposed linked between endocytosis and MAPK activation (1, 15), we then investigated the potential implication of V2R endocytosis in the AVP-stimulated ERK1/2 activation. For this, the effect of a pharmacological blocker (concanavalin A, a lectin that interferes with endocytosis by binding to the carbohydrate moieties (16)) and of two dominant negative mutants of  $\beta$ -arrestin with impaired receptor binding capacities (a truncated form,  $\beta$ -arrestin (319–418) (10), and a point mutant,  $\beta$ -arrestin V53D (10, 17)) were assessed. As shown in Fig. 6A, the concanavalin A treatment almost completely blocked endocytosis of both wt- and C341A/C342A-V2R, whereas  $\beta$ -arrestin (319–418) and  $\beta$ -arrestin V53D inhibited the internalization of these receptors by 70 and 35%, respectively. These results confirm previous data indicating that V2R undergoes agonist-promoted endocytosis via a  $\beta$ -arrestin-dependent process presumably through clathrin-coated vesicles (18, 19). In contrast to its dramatic effect on receptor endocytosis, concanavalin A was without effect on the AVP-stimulated MAPK activation in cells expressing either wt- or C341A/C342A-V2R (Fig. 6B), clearly separating the two phenomena. However, both  $\beta$ -arrestin (319–418) and  $\beta$ -arrestin V53D significantly inhibited re-

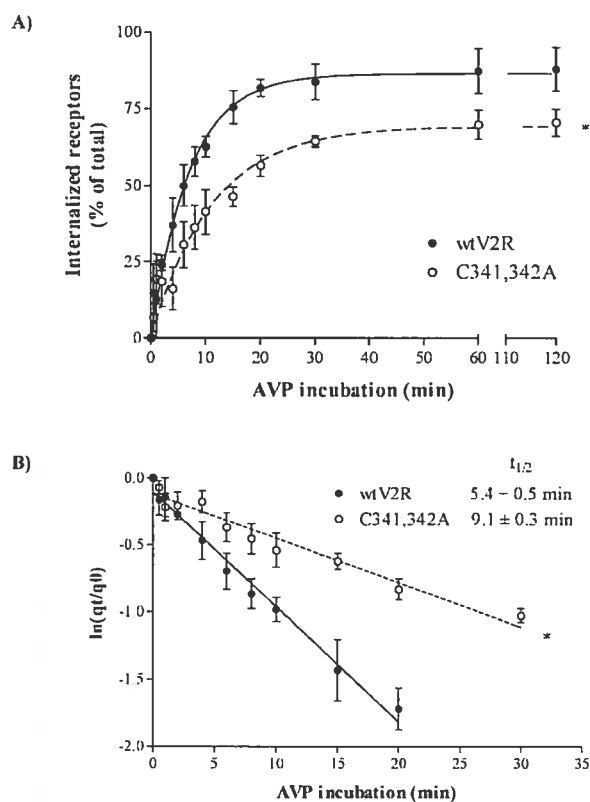


**FIG. 4. Concentration-dependent AVP-induced ERK1/2 activity.** A, HEK293 cells stably expressing myc-wtV2R or myc-C341A/C342A-V2R (C341,342A) were stimulated with increasing concentrations of AVP for 2 (wtV2R) or 4 min (C341A/C342A) at 37  $^{\circ}$ C. Reference stimulation was carried out using 10% FBS for 5 min. The MAPK activity was assessed as in Fig. 3. B, graphic representation of the data expressed as P-ERK1/2 over ERK1/2 in percentage of the levels observed with 10% FBS used as the reference control. The curves shown represent the mean  $\pm$  S.E. of four independent experiments. \*, indicates  $p < 0.01$  between the asymptotes of the two curves.

ceptor-mediated ERK1/2 phosphorylation, suggesting an important role for  $\beta$ -arrestin in the AVP-stimulated ERK1/2 activation (Fig. 6B).

**AVP-induced  $\beta$ -Arrestin Recruitment**—The preceding data indicate that no causal link exists between V2R endocytosis and MAPK activation. However, they clearly place  $\beta$ -arrestin on the path of two processes affected by the palmitoylation state of the receptor. To test directly whether the decreased receptor endocytosis and reduced AVP-stimulated ERK1/2 activity of C341A/C342A-V2R could result from an altered  $\beta$ -arrestin interaction, the ability of AVP to promote  $\beta$ -arrestin recruitment to the wt- and C341A/C342A-V2R was first investigated in coimmunoprecipitation studies using the reversible membrane-permeable cross-linker DSP. As shown in Fig. 7A,  $\beta$ -arrestin2-GFP could be coimmunoprecipitated with both wt- and C341A/C342A-myc-tagged V2R. Although a single specific  $\beta$ -arrestin2-GFP band was observed in the whole cell lysates, the coimmunoprecipitated  $\beta$ -arrestin2-GFP appeared as a doublet including a less abundant species with a slower mobility. The nature of this  $\beta$ -arrestin species that is revealed in the coimmunoprecipitation conditions remains to be determined. In any case, AVP induced a significant increase of  $\beta$ -arrestin2-GFP in the myc-tagged receptor immunoprecipitates, reflecting the agonist-promoted recruitment of  $\beta$ -arrestin to both wt- and C341A/C342A-V2R after agonist exposure. Interestingly, however, less  $\beta$ -arrestin2-GFP was found to be associated with C341A/C342A-V2R (Fig. 7B), suggesting an altered interaction between  $\beta$ -arrestin and the V2R palmitoylation-less mutant.

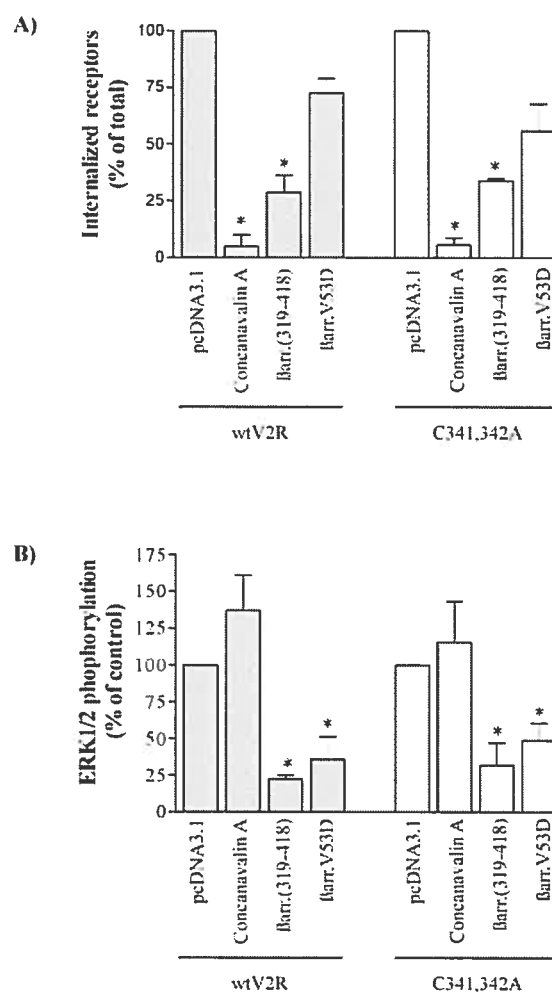
To characterize further  $\beta$ -arrestin interaction with the wt- and C341A/C342A-V2R, we assessed the AVP-promoted  $\beta$ -arrestin recruitment to the receptors using a BRET-based assay



**FIG. 5. AVP-induced internalization of wt- and C341A/C342A-V2R.** HEK293 cells stably expressing myc-wtV2R or myc-C341A/C342A-V2R (C341,342A) were stimulated with 1  $\mu$ M AVP for different periods of time at 37  $^{\circ}$ C. Cell surface receptor levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay using the monoclonal anti-myc 9E10 and anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibodies. The immunoreactivity was revealed by colorimetry. **A**, internalization is defined as the loss of cell surface immunoreactivity and is expressed as percent of the total immunoreactivity measured under basal conditions. The data shown represent the mean  $\pm$  S.D. of two independent experiments. \*, indicates  $p < 0.01$  between the asymptotes of the two curves. **B**, rate of receptor internalization determined using the initial portion of the curves presented in **A**. \*, indicates  $p < 0.01$  between the half-times.

(13). For this purpose,  $\beta$ -arrestin-Rluc and wt- or C341A/C342A-V2R-GFP fusion proteins were transiently expressed in HEK293 cells. The AVP-promoted  $\beta$ -arrestin recruitment was then assessed by determining the agonist-dependent transfer of energy between  $\beta$ -arrestin-Rluc and the receptor-GFP constructs. As shown in Fig. 8A, real time BRET measurements allow monitoring of time-dependent recruitment of  $\beta$ -arrestin to both wt- and C341A/C342A-V2R. The analysis of these kinetics revealed a significant ( $p < 0.01$ ) decrease in the recruitment rate of  $\beta$ -arrestin by the C341A/C342A-V2R compared with that of the wild-type receptor (Fig. 8B;  $t_{1/2}$ : wtV2R,  $3.0 \pm 0.3$  min versus C341A/C342A,  $8.6 \pm 0.5$  min). Taken together, these results strongly suggest that mutation of the V2R palmitoylation sites significantly reduces its affinity for  $\beta$ -arrestin.

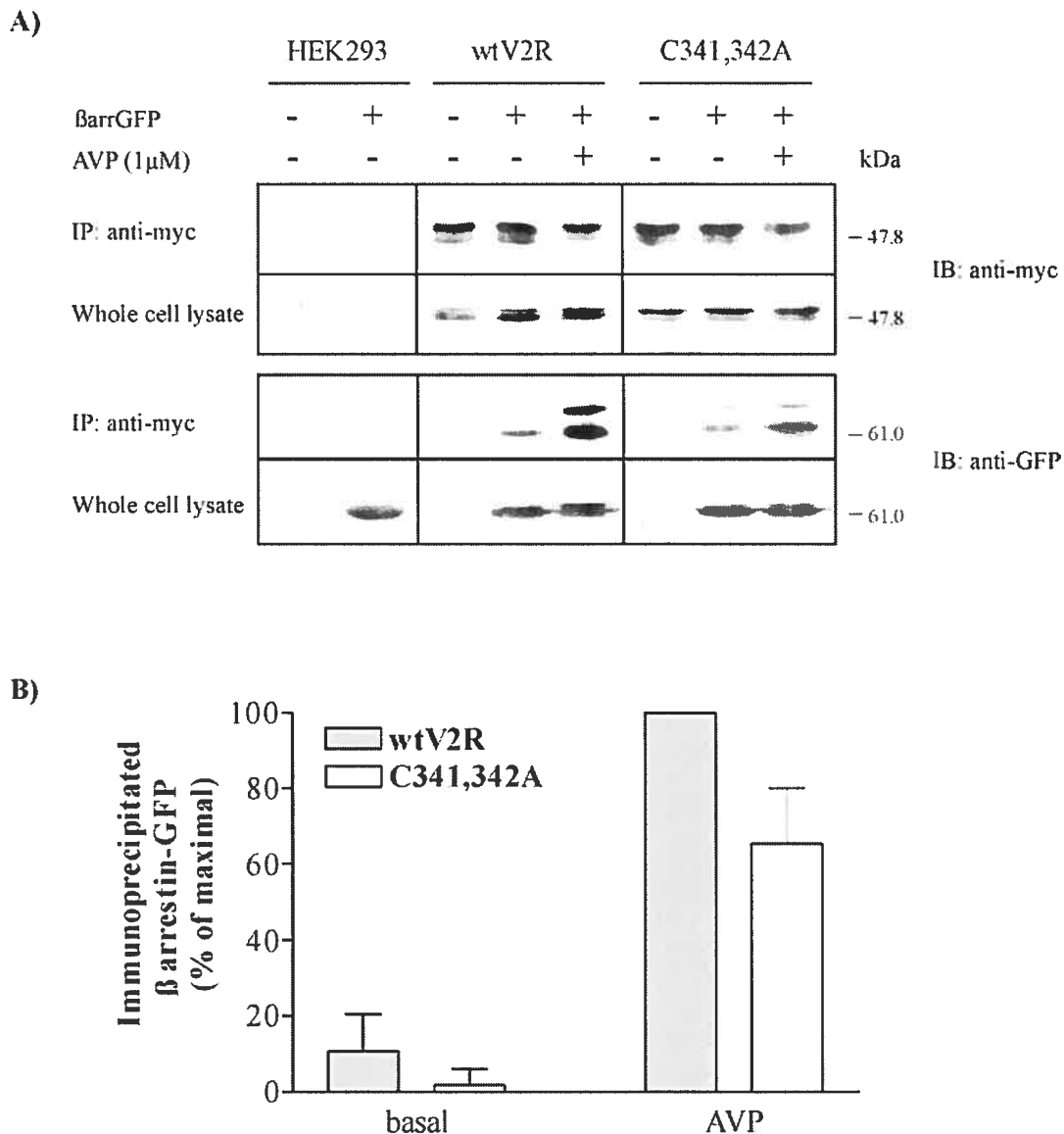
To confirm that the reduced interaction of  $\beta$ -arrestin with the C341A/C342A-V2R resulted from the lack of palmitoylation at cysteines 341 and 342 because of their mutation to alanines, we assessed the effect of the palmitoylation inhibitors 2-BrP (20) and tunicamycin (21) in the BRET-based  $\beta$ -arrestin recruitment assay. First, the ability of 2-BrP and tunicamycin to inhibit V2R palmitoylation was verified in metabolic labeling experiments. As shown in Fig. 9A, pretreatment of the cells with 2-BrP or tunicamycin greatly reduced [ $^3$ H]palmitic acid incorporation in the V2R without significantly affecting receptor expression levels, as assessed by Western blot analysis.



**FIG. 6. Role of V2R endocytosis and  $\beta$ -arrestin in the AVP-stimulated ERK1/2 activity.** HEK293 cells were transiently cotransfected with plasmids encoding myc-wtV2R or myc-C341A/C342A-V2R (C341,342A) along with the pcDNA3.1 plasmid either empty (negative control) or encoding dominant negative mutants of  $\beta$ -arrestin ( $\beta$ arr. (319-418) and  $\beta$ arr.V53D). Where indicated, cells were preincubated with 0.25 mg/ml concanavalin A for 1 h at 37  $^{\circ}$ C. **A**, cells were treated or not with 1  $\mu$ M AVP for 30 min at 37  $^{\circ}$ C and receptor internalization measured as in Fig. 5. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. **B**, quantification of ERK1/2 phosphorylation stimulated by 1  $\mu$ M AVP for 2 (wtV2R) or 4 min (C341A/C342A) was carried out as in Fig. 3. The data shown represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*, indicate  $p < 0.05$  between treatment and control condition.

Inhibition of V2R palmitoylation by 2-BrP or tunicamycin decreased the rate of AVP-promoted  $\beta$ -arrestin recruitment in a manner similar to that observed with the C341A/C342A-V2R (Fig. 9B;  $t_{1/2}$ : wtV2R,  $3.1 \pm 0.6$  min; C341A/C342A,  $5.6 \pm 0.6$  min; wtV2R + 2-BrP,  $5.0 \pm 0.6$  min; and wtV2R + tunicamycin,  $5.5 \pm 0.7$  min). In addition, we did not observe any effect of 2-BrP or tunicamycin on the AVP-promoted  $\beta$ -arrestin recruitment to the C341A/C342A-V2R (data not shown), suggesting that the effects observed are specifically the result of palmitoylation inhibition.

**Phosphorylation of V2Rs**—Given the importance of receptor phosphorylation in the interaction between  $\beta$ -arrestin and GPCRs (22, 23), it could be hypothesized that palmitoylation regulates  $\beta$ -arrestin recruitment by affecting the receptor phosphorylation state. To test this hypothesis directly, basal and AVP-stimulated phosphorylation were assessed for wt- and C341A/C342A-V2R. Following metabolic labeling with  $^{32}$ P $_i$ , cells expressing either wt- or C341A/C342A-V2R were stimu-



**FIG. 7.  $\beta$ -Arrestin coimmunoprecipitation with agonist-activated V2Rs.** Plasmids encoding myc-wtV2R or myc-C341A/C342A-V2R (C341,342A) were transiently cotransfected with  $\beta$ -arrestin2-GFP ( $\beta$ arrGFP) in HEK293 cells. Cells were treated or not with 1  $\mu$ M AVP for 15 min at 37  $^{\circ}$ C before adding the cross-linking agent DSP. Myc-tagged receptors were then immunoprecipitated using the 9E10 anti-myc antibody and resolved on SDS-PAGE as described under "Experimental Procedures." *A*, the amount of myc-V2Rs and the presence of  $\beta$ -arrestin2-GFP in the immunoprecipitates were assessed by Western blot analysis using the A14 anti-myc and anti-GFP polyclonal antibodies, respectively. Blotting of the whole cell lysates was performed to control for the expression levels of myc receptors and  $\beta$ -arrestin2-GFP. *B*, quantification of coimmunoprecipitated  $\beta$ -arrestin2-GFP expressed as the ratio of anti-GFP over anti-myc immunoreactivities in the immunoprecipitates in percentage of the maximal obtained with the wtV2R. The data shown represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

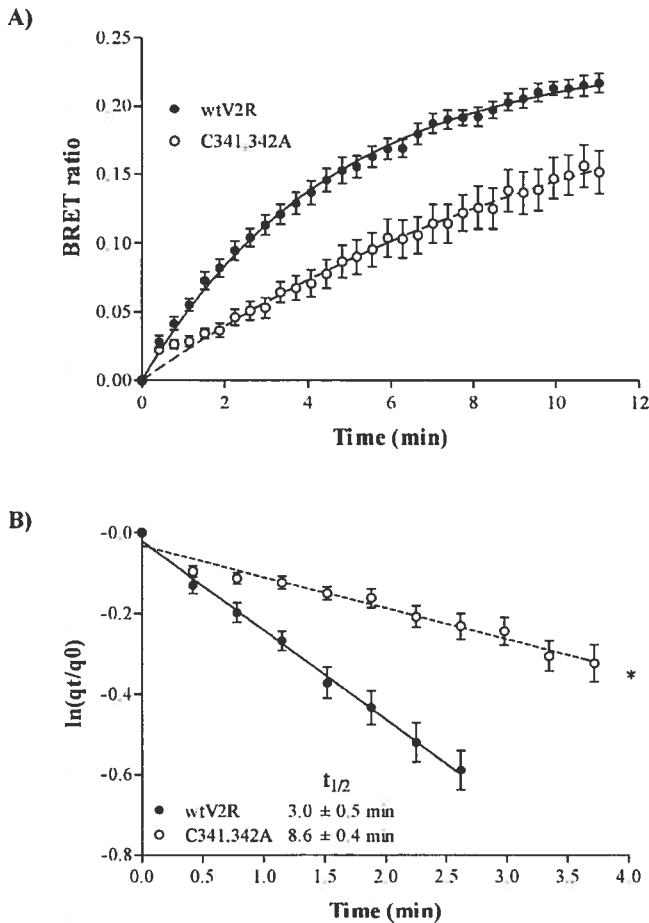
lated or not with AVP and the receptors purified by immunoprecipitation as described under "Experimental Procedures." As shown in Fig. 10 and in agreement with the previous report of Sadeghi *et al.* (4), comparable basal and AVP-promoted phosphorylation levels were observed for the wild-type and the palmitoylation-less receptor, excluding a role for phosphorylation in the reduced  $\beta$ -arrestin recruitment to C341A/C342A-V2R.

#### DISCUSSION

Taken together, the results of the present study demonstrate that the V2R palmitoylation state regulates distinct receptor functions differentially. Although mutation of the palmitoylation sites did not affect the receptor-stimulated adenylyl cyclase activity, it led to significantly delayed and decreased agonist-promoted ERK1/2 activation and receptor endocytosis. No causal link between the reduced MAPK activity and recep-

tor endocytosis was found, but both most likely resulted from the altered agonist-mediated  $\beta$ -arrestin recruitment observed for the palmitoylation-less mutant. Indeed, our results show that lack of palmitoylation of the V2R, either by mutation or pharmacological inhibition, slowed down and decreased its ability to recruit  $\beta$ -arrestin, suggesting a reduced affinity of the receptor for  $\beta$ -arrestin. Receptor palmitoylation can therefore be seen as a post-translational modification that favors  $\beta$ -arrestin-dependent processes.

Modulation of GPCR endocytosis efficiency by palmitoylation has been reported previously for several receptors. Although mutation of palmitoylated cysteines was found to increase the endocytosis of these receptors for the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor (24) and the V1a vasopressin receptor (V1aR) (25), in most cases, it was found as in the present study to decrease their agonist-promoted endocytosis.



**FIG. 8.  $\beta$ -Arrestin recruitment to agonist-activated V2Rs measured by BRET.** Plasmids encoding wtV2R-GFP or C341A/C342A-GFP (C341,342A) were transiently cotransfected with  $\beta$ -arrestin2-Rluc in HEK293 cells treated or not with  $1 \mu\text{M}$  AVP at  $25^\circ\text{C}$  in the presence of  $5 \mu\text{M}$  coelenterazine. *A*, real time BRET measurements were taken at regular intervals for the indicated times. *B*, rate of  $\beta$ -arrestin recruitment determined using the initial portion of the curves presented in *A*. The data shown represent the mean  $\pm$  S.E. of at least four independent experiments. \* indicates  $p < 0.01$  between the half-times.

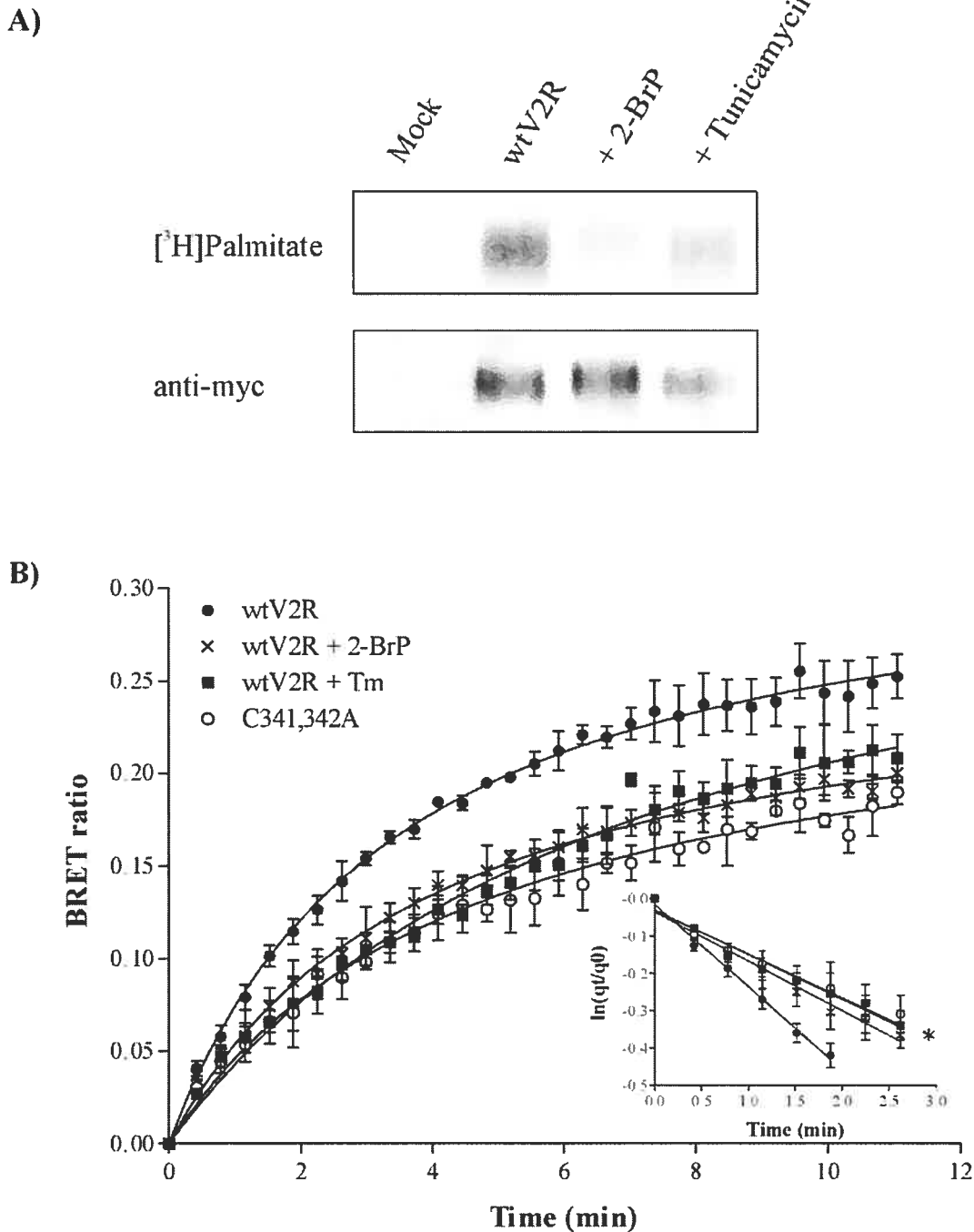
Examples include the thyrotropin-releasing hormone receptor (26, 27), the somatostatin receptor SSTR5 (28), the CC chemokine receptor CCR5 (29), and the B2 bradykinin receptor (30). Interestingly, apparently opposite regulation of endocytic processes by receptor palmitoylation does not seem to be limited to GPCRs. Indeed, lack of palmitoylation of the transferrin receptor was found to increase transferrin-promoted receptor endocytosis (31), whereas a palmitoylation-less asialoglycoprotein receptor was less prone to ligand-induced receptor internalization (32). The reason for the apparently opposite roles of palmitoylation in the endocytosis of different receptors remains unclear.

Here, the observation that mutation of the V2R palmitoylation sites leads to comparable delays and reduction in both receptor endocytosis and  $\beta$ -arrestin recruitment coupled to the strong dependence of the V2R internalization on  $\beta$ -arrestin strongly suggests that the altered  $\beta$ -arrestin recruitment is responsible for the reduced receptor endocytosis. This is consistent with evidence from fluorescence microscopy suggesting that palmitoylation-deficient thyrotropin-releasing hormone receptor mutants, which showed reduced endocytosis, also failed to promote efficient  $\beta$ -arrestin translocation (27). However, whether modulation of the interaction between receptor and  $\beta$ -arrestin is the universal mechanism underlying the in-

fluence of the palmitoylation state on the receptor endocytosis remains to be investigated. Interestingly, such a mechanism could also apply to non-GPCRs because, in addition to its wide role in GPCR endocytosis,  $\beta$ -arrestin has been proposed to play a role in agonist-promoted internalization of a receptor belonging to the tyrosine kinase receptor family, the insulin-like growth factor I receptor (33).

Although our study provides the first direct evidence linking receptor palmitoylation to  $\beta$ -arrestin recruitment and subsequent MAPK activation, a growing number of studies suggest that, in addition to their function as endocytic adaptor proteins,  $\beta$ -arrestins play a central role in GPCR-mediated MAPK activation (2). The importance of endocytosis in GPCR-mediated MAPK activation has also been the subject of numerous studies. For example, using  $\beta$ -arrestin and dynamin dominant negative inhibitors of internalization, both m1 muscarinic acetylcholine receptor and  $\beta_2\text{AR}$ -mediated activation of MAPK was suggested to require clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis (15, 34). However, as we found in the present study for the V2R, other receptors were shown to mediate MAPK activation in an internalization-independent manner (1). A potential explanation for this apparent contradiction was provided by subsequent papers. First, the observation that MAPK activation by an internalization-deficient  $\mu$ -opioid receptor could still be inhibited by a dynamin-negative mutant (35) clearly distinguished the effect of the dynamin-negative mutant on the MAPK activation and the endocytosis of the receptor. Subsequently,  $\alpha_2\text{AR}$  and  $\beta_2\text{AR}$  activation of MAPK was shown to require the transactivation as well as the internalization of the epidermal growth factor receptor (36), indicating that the effect of the dynamin dominant negative mutant resulted from the inhibition of the tyrosine kinase receptor internalization and not that of the GPCR. Although the need for clathrin-mediated endocytosis of targeted tyrosine kinase receptors has not been investigated in the present study, our data clearly show that V2R internalization is not required for AVP-mediated ERK1/2 activation because pharmacological inhibition of receptor endocytosis did not affect the MAPK activation. It follows that the altered ERK1/2 activation observed with the unpalmitoylated V2R cannot result from the reduced endocytosis of this mutant. Rather, our observation that two dominant negative mutants of  $\beta$ -arrestin significantly inhibited V2R-mediated ERK1/2 activation strongly suggests that the altered  $\beta$ -arrestin recruitment of the palmitoylation-less V2R is responsible for its delayed and reduced ability to activate MAPK. In addition, the more prolonged ERK1/2 activation observed with C341A/C342A-V2R could also be a consequence of altered  $\beta$ -arrestin recruitment because this leads to a slower receptor endocytosis that could result in a delayed signal termination. However, although the role of endocytosis in the desensitization of classical receptor-G protein activation is well characterized (1), whether  $\beta$ -arrestin-mediated endocytosis also leads to termination of the MAPK signaling remains to be determined.

Taken together, the above consideration suggests that palmitoylation affects  $\beta$ -arrestin-dependent events such as receptor endocytosis and MAPK activation but not the  $G_s$ -mediated adenylyl cyclase activation. Furthermore, given the strong dependence of the V2R-mediated ERK1/2 activation on  $\beta$ -arrestin, it is not surprising to find that the potency of AVP stimulation of MAPK ( $EC_{50}$  of wtV2R =  $3.8 \times 10^{-9}$  M) is closest to the affinity of the receptor for the agonist ( $K_d$  of wtV2R =  $0.8 \times 10^{-9}$  M) than the potency of AVP-promoted cAMP accumulation (wtV2R =  $6.7 \times 10^{-11}$  M). Indeed,  $\beta$ -arrestin recruitment directly reflects agonist occupancy, whereas the amplification process taking place in the AVP-induced cAMP accumulation is expected to increase the apparent potency. Because the poten-

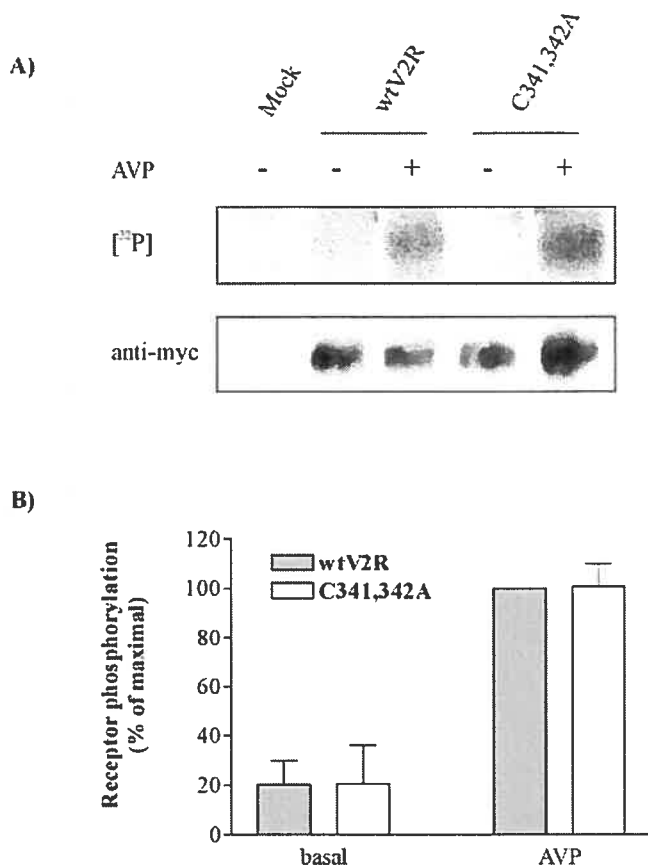


**FIG. 9. Effect of pharmacological inhibition of V2R palmitoylation on  $\beta$ -arrestin recruitment.** *A*, HEK293 cells stably expressing myc-wtV2R were pretreated or not with 100  $\mu$ M 2-BrP for 16 h or 30  $\mu$ M tunicamycin for 4 h at 37  $^{\circ}$ C followed by metabolic labeling with [ $^3$ H]palmitate as described under "Experimental Procedures." Receptors were then purified by immunoprecipitation and resolved on SDS-PAGE before being analyzed by autoradiography for [ $^3$ H]palmitate incorporation or Western blotting to control receptor expression. *B*, HEK293 cells were transiently cotransfected with wtV2R-GFP or C341A/C342A-GFP (C341,342A) along with  $\beta$ -arrestin2-Rluc and treated or not with 2-BrP or tunicamycin (*Tm*) as described above, followed by 1  $\mu$ M AVP at 25  $^{\circ}$ C in the presence of 5  $\mu$ M coelenterazine. Real time BRET measurements were taken at regular intervals for the indicated times. *Inset*, rate of  $\beta$ -arrestin recruitment determined using the initial portion of the curves presented in *B*. The data shown represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*, indicates  $p < 0.01$  compared with wtV2R half-time.

cies were both determined in whole cell assays and are thus directly comparable, the difference then suggests that the AVP-stimulated ERK1/2 activation observed in the present study does not depend on cAMP production. This was supported further by the observation that a protein kinase A inhibitor (KT5720) did not affect AVP-promoted ERK1/2 activation.<sup>2</sup>

Other studies have suggested pathway-specific modulation of receptor functions by palmitoylation. For instance, absence of palmitoylation in the endothelin A receptor was shown to prevent its coupling to the phospholipase C and ERK1/2 signaling pathways without affecting the adenylyl cyclase activation (37, 38). In this case, the authors suggested that palmitoylation was required for  $G_q$  but not  $G_s$  coupling. Similarly, mutation of the three palmitoylated cysteines of CCR5 has

<sup>2</sup> P. G. Charest and M. Bouvier, unpublished observations.



**FIG. 10. AVP-induced phosphorylation of wt- and C341A/C342A-V2R.** A, HEK293 cells stably expressing myc-wtV2R or myc-C341A/C342A-V2R (C341,342A) were metabolically labeled with  $^{32}\text{P}$ , and treated or not with 1  $\mu\text{M}$  AVP for 15 min. The receptors were purified by immunoprecipitation using the 9E10 anti-myc antibody and resolved on SDS-PAGE.  $^{32}\text{P}$  incorporation was revealed by autoradiography using a PhosphorImager after transfer to nitrocellulose. The expression level of each receptor was assessed by Western blot analysis of the same membrane using the A14 anti-myc antibody. Immunoprecipitation using untransfected HEK293 cells was carried out as a control (Mock). B, quantification of receptor phosphorylation is expressed as the ratio of  $^{32}\text{P}$  labeling over anti-myc immunoreactivity in percentage of the maximal obtained with the wtV2R. The data shown represent the mean  $\pm$  S.D. of two independent experiments.

been shown to affect efficient coupling to only a subset of its signaling repertoire (39). However, the potential role of  $\beta$ -arrestin in these pathway-specific effects of palmitoylation was not investigated. These observations and the findings reported herein suggest that different agonist-stimulated processes (such as selective G protein activation,  $\beta$ -arrestin recruitment, and receptor endocytosis) may involve distinct receptor conformations and/or domains that can be regulated differentially. Supporting this idea, a modified parathyroid hormone receptor uncoupled from its cognate G protein can still undergo agonist-induced  $\beta$ -arrestin-mediated endocytosis (40). Hence, because palmitoylation occurs mostly at the level of the carboxyl-terminal tail of GPCR, it will most likely affect processes involving this particular domain. Interestingly, it was shown that for several receptors, including the V2R, the carboxyl-terminal tail is implicated in the formation of stable receptor- $\beta$ -arrestin interactions (18, 41).

How receptor palmitoylation could affect the coupling to  $\beta$ -arrestin is unknown. However, palmitoylation has been shown to play important roles in protein-protein interaction for a number of proteins. For example, palmitoylation of  $G\alpha_s$  has been shown to favor interactions with  $G\beta\gamma$  (42), whereas palmi-

toylation of  $G\alpha_z$  was found to decrease the affinity of the  $G_z$ -GTPase activating protein for its GTP-bound form (43). Palmitoylation of Src family tyrosine kinases has also been shown to be required for their interaction with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (44) as well as with their B cell substrate  $\text{Ig}\alpha$  (45). Finally, palmitoylation of caveolin-1 was found to be essential for its interaction with c-Src (46) and that of tetraspanin proteins important for their self-association (47).

Binding of  $\beta$ -arrestin to agonist-activated GPCR is thought to involve multiple interactions (48). A large region within the amino-terminal half of  $\beta$ -arrestin, termed the activation recognition domain, recognizes the activated state of GPCRs. This domain of  $\beta$ -arrestin appears to bind the third intracellular loop of several receptors, including the  $\alpha_2\text{AR}$ , m2 and m3 muscarinic acetylcholine receptors (49). This is followed by the binding of a smaller positively charged region in the central portion of  $\beta$ -arrestin, termed the phosphorylation recognition domain, to the receptor carboxyl tail phosphorylated by GPCR kinase (50). Notably, agonist-induced phosphorylated clusters of serine or threonine residues, located downstream of the putative palmitoylation sites of several GPCR including the V2R, were identified as molecular determinants of the stability of receptor- $\beta$ -arrestin complexes (18, 41). In fact, the absence of such phosphorylation clusters within the carboxyl tail of several receptors, including the  $\beta_2\text{AR}$ , has been invoked to explain the rapid dissociation of  $\beta$ -arrestin from these receptors.

Modulation of the phosphorylation state of the receptor by palmitoylation could thus be proposed as a potential mechanism regulating  $\beta$ -arrestin recruitment. Consistent with this hypothesis, GPCR palmitoylation sites are often located proximally to receptor phosphorylation sites and have been shown to affect GPCR phosphorylation for a number of receptors. For instance, mutation of palmitoylation sites in their carboxyl tail has been linked to an increased phosphorylation for the  $\beta_2\text{AR}$  (51), the GluR6 kainate receptor (52), and the A3 adenosine receptor (53), whereas it led to a decrease phosphorylation for bovine opsin (54), CCR5 (29), and V1aR (25). However, changes in the phosphorylation status of the V2R does not seem to account for the altered  $\beta$ -arrestin recruitment of the palmitoylation-less mutant because in agreement with the previous finding of Sadeghi *et al.* (4), no difference in either basal or AVP-induced phosphorylation levels was observed between wt- and C341A/C342A-V2R. Instead, we propose that the reduced affinity of  $\beta$ -arrestin for the palmitoylation-less mutant resides in the altered conformation of C341A/C342A-V2R carboxyl tail compared with the wtV2R.

Our proposition is in part based on the fact that the high affinity of  $\beta$ -arrestin for the receptor appears to depend on the position of the phosphorylated cluster of serines within the carboxyl tail (18). In addition, to show that the V2R cluster could not reintroduce the  $\beta$ -arrestin high affinity when added at the end of the carboxyl tail of the  $\beta_2\text{AR}$ , Oakley *et al.* (41) showed that the position of the clusters within the carboxyl tail of several receptor displaying high affinity for  $\beta$ -arrestin is relatively well conserved. This conservation is even more remarkable for receptors such as the V2R, the neurotensin-1 receptor, and the oxytocin receptor, with carboxyl-terminal tail of similar length and containing putative palmitoylation sites. Because receptor palmitate moieties are inserted in the plasma membrane where they limit the carboxyl side of the eighth  $\alpha$ -helix (55), they also define the distance between the plasma membrane and downstream residues. Therefore, by controlling the positioning of the  $\beta$ -arrestin-interacting domains, palmitoylation could optimize its association with the regulatory protein. Lack of palmitoylation could then affect this conformation, leading to decreased affinity of the receptor for  $\beta$ -arrestin

and resulting in the slower and reduced recruitment to C341A/C342A-V2R observed in our study.

In conclusion, our study suggests that palmitoylation of V2R increases receptor affinity for  $\beta$ -arrestin thus allowing rapid agonist-promoted recruitment of the adaptor protein that leads to efficient endocytosis and ERK1/2 activation. Given the fact that palmitoylation is dynamically regulated during the receptor activation cycle (3), regulated changes in this post-translational modification could modulate receptor endocytosis and determine the relative contribution of different signaling pathways in response to receptor stimulation.

**Acknowledgments**—We are grateful to Dr. Monique Lagacé for the critical reading of the manuscript and Dr. Werner Müller-Esterl for the generous supply of the AS435 anti-V2R antibody.

## REFERENCES

- Ferguson, S. S. (2001) *Pharmacol. Rev.* **53**, 1–24
- Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 455–465
- Qanbar, R., and Bouvier, M. (2003) *Pharmacol. Ther.* **97**, 1–33
- Sadeghi, H. M., Innamorati, G., Dagarag, M., and Birnbaumer, M. (1997) *Mol. Pharmacol.* **52**, 21–29
- Schüle, R., Liebenhoff, U., Müller, H., Birnbaumer, M., and Rosenthal, W. (1996) *Biochem. J.* **313**, 611–616
- Thibonnier, M., Conarty, D. M., Preston, J. A., Wilkins, P. L., Berti-Mattera, L. N., and Mattera, R. (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.* **449**, 251–276
- Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 368–376
- Morello, J. P., Salahpour, A., Laperriere, A., Bernier, V., Arthus, M. F., Lonergan, M., Petaja-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) *J. Clin. Invest.* **105**, 887–895
- Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 44925–44931
- Krupnick, J. G., Santini, F., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32507–32512
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., pp. 16.33–16.36, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Orsini, M. J., and Benovic, J. L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34616–34622
- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilaiet, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3684–3689
- Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 6258–6267
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della, R. G., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 685–688
- Pippig, S., Andexinger, S., and Lohse, M. J. (1995) *Mol. Pharmacol.* **47**, 666–676
- Ferguson, S. S., Downey, W. E., III, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L., and Caron, M. G. (1996) *Science* **271**, 363–366
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32248–32257
- Bowen-Pidgeon, D., Innamorati, G., Sadeghi, H. M., and Birnbaumer, M. (2001) *Mol. Pharmacol.* **59**, 1395–1401
- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M. D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 261–270
- Patterson, S. L., and Skene, J. H. P. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 521–536
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) *Science* **248**, 1547–1550
- Lohse, M. J., Andexinger, S., Picher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8558–8564
- Kawate, N., and Menon, K. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 30651–30658
- Hawtin, S. R., Tobin, A. B., Patel, S., and Wheatley, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 38139–38146
- Nussenzweig, D. R., Heinfink, M., and Gershengorn, M. C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2389–2392
- Groarke, D. A., Drmota, T., Bahia, D. S., Evans, N. A., Wilson, S., and Milligan, G. (2001) *Mol. Pharmacol.* **59**, 375–385
- Hukovic, N., Panetta, R., Kumar, U., Rocheville, M., and Patel, Y. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 21416–21422
- Kraft, K., Olbrich, H., Majoul, I., Mack, M., Proudfoot, A., and Oppermann, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34408–34418
- Pizard, A., Blaukat, A., Michineau, S., Dikic, I., Müller-Esterl, W., Alhenc-Gelas, F., and Rajerison, R. M. (2001) *Biochemistry* **40**, 15743–15751
- Alvarez, E., Girones, N., and Davis, R. J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16644–16655
- Yik, J. H., Saxena, A., Weigel, J. A., and Weigel, P. H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 40844–40852
- Lin, F. T., Daaka, Y., and Lefkowitz, R. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 31640–31643
- Vogler, O., Nolte, B., Voss, M., Schmidt, M., Jakobs, K. H., and Van Koppen, C. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12333–12338
- Whistler, J. L., and Von Zastrow, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 24575–24578
- Pierce, K. L., Maudsley, S., Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1489–1494
- Horstmeyer, A., Cramer, H., Sauer, T., Müller-Esterl, W., and Schroeder, C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20811–20819
- Cramer, H., Schmenger, K., Heinrich, K., Horstmeyer, A., Boning, H., Breit, A., Piiper, A., Lundström, K., Müller-Esterl, W., and Schroeder, C. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 5449–5459
- Blanpain, C., Wittamer, V., Vanderwinden, J. M., Boom, A., Renneboog, B., Lee, B., Le Poul, E., El Asmar, L., Govaerts, C., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 23795–23804
- Vilardaga, J. P., Frank, M., Krusel, C., Dees, C., Nissenson, R. A., and Lohse, M. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33435–33443
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19452–19460
- Iiri, T., Backlund, P. S. J., Jones, T. L. Z., Wedegaertner, P. B., and Bourne, H. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14592–14597
- Tu, Y., Wang, J., and Ross, E. M. (1997) *Science* **278**, 1132–1135
- Shenoy-Scaria, A. M., Gauen, L. K., Kwong, J., Shaw, A. S., and Lublin, D. M. (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 6385–6392
- Saouaf, S. J., Wolven, A., Resh, M. D., and Bolen, J. B. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 325–329
- Lee, H., Woodman, S. E., Engelman, J. A., Volonte, D., Galbiati, F., Kaufman, H. L., Lublin, D. M., and Lisanti, M. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 35150–35158
- Yang, X., Claas, C., Kraeft, S. K., Chen, L. B., Wang, Z., Kreidberg, J. A., and Hemler, M. E. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 767–781
- Krupnick, J. G., and Benovic, J. L. (1998) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 289–319
- Wu, G., Krupnick, J. G., Benovic, J. L., and Lanier, S. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17836–17842
- Kieselbach, T., Irrgang, K. D., and Ruppel, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* **226**, 87–97
- Moffett, S., Mouillac, B., Bonin, H., and Bouvier, M. (1993) *EMBO J.* **12**, 349–356
- Pickering, D. S., Taverna, F. A., Salter, M. W., and Hampson, D. R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 12090–12094
- Palmer, T. M., and Stiles, G. L. (2000) *Mol. Pharmacol.* **57**, 539–545
- Karnik, S. S., Ridge, K. D., Bhattacharya, S., and Khorana, H. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 40–44
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) *Science* **289**, 739–745
- Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M. (1974) *Anal. Biochem.* **58**, 541–548

### 2.3 Article 3

#### **The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signaling.**

**Pascale G Charest**, Geneviève Oligny-Longpré, Hélène Bonin, Mounia Azzi et Michel Bouvier. *Manuscrit en préparation pour une soumission à Cellular Signaling, mai 2005.*

multiples voies semblent pouvoir lier les RCPGs aux MAPKs (voir dans l'introduction, section 1.5) (Luttrell 2003). De façon générale, celles-ci impliquent soit la production de seconds messagers, comme l'AMPc et le  $Ca^{2+}$ , stimulé par les sous-unités  $G\alpha$  activés et l'activation subséquente de kinases dépendantes de ceux-ci; soit l'activation de tyrosines kinases, récepteurs ou protéines, par l'intermédiaire des sous-unités  $G\beta\gamma$ . De plus, un nombre grandissant d'études suggère que les RCPGs peuvent, parallèlement, stimuler l'activité des MAPKs de façon indépendante de la signalisation par les protéines G hétérotrimériques, impliquant plutôt la protéine adaptatrice  $\beta$ arrestine. En effet, il a récemment été démontré que  $\beta$ arrestine peut interagir avec plusieurs protéines de signalisation intracellulaire, comme la protéine tyrosine kinase c-Src ainsi que des composantes de modules MAPK, notamment les MAP3Ks Raf-1 et ASK1 et les MAPKs ERK1/2 et JNK3 (Luttrell and Lefkowitz 2002).

Une étude montra que la stimulation du V2R par l'AVP pouvait mener à l'activation d'ERK1/2 dans des cellules CHO, tout en produisant une réponse anti-mitogénique (Thibonnier et al. 1998). Plus tard, l'étude du rôle de la palmylation du V2R envers l'activation de la voie ERK1/2 nous permettra de mettre en évidence le rôle important de  $\beta$ arrestine dans la stimulation de ces MAPKs par le V2R (Charest and Bouvier 2003). Cela nous incita alors à étudier davantage la nature de la voie menant à l'activation de ces MAPKs par le V2R, en recherchant particulièrement la contribution de la



signalisation par les protéines G hétéro-trimériques. Au cours de la présente étude, il a été suggéré que  $\beta$ arrestine sert d'échafaud protéique, permettant l'activation des MAPKs par les RCPGs en promouvant le rassemblement des différentes composantes de la voie de signalisation à proximité du récepteur activé (Luttrell 2003). Il a entre autres été suggéré que  $\beta$ arrestine, en complexe avec certains récepteurs de classe B dont le V2R, interagit directement avec ERK1/2, menant à leur activation et rétention cytoplasmique.

Ma contribution à ces travaux est majeure (~75%) où j'ai co-supervisé les travaux d'une étudiante à la maîtrise (Geneviève Oligny-Longpré) et d'une assistante de recherche (Hélène Bonin); en plus de l'élaboration de l'hypothèse de travail ainsi que de l'approche expérimentale, la réalisation des expériences, l'analyse des résultats et la rédaction de cette première version du manuscrit.

## The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signaling

Pascale G. Charest<sup>§</sup>, Geneviève Oligny-Longpré<sup>§</sup>, Hélène Bonin<sup>§</sup>, Mounia Azzi<sup>¶</sup> and Michel Bouvier<sup>\*§</sup>.

<sup>§</sup> Department of Biochemistry and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal (Québec) Canada, H3C 3J7

<sup>¶</sup> Neurochem Inc., 275 Armand-Frappier Blv. Laval (Québec) Canada, H7V 4A7

\* Corresponding author

Running title: V2R-regulated ERK1/2 activity

Keywords: V2R, GPCR, Extra-cellular signal-regulated kinases 1 and 2, MAPK,  $\beta$ arrestin

**Abstract**

A growing number of reports underline the importance of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in G protein-coupled receptor signalling, but pathways leading to MAPK activation seem to vary with the receptor and cellular context. We previously reported that the V2 vasopressin receptor (V2R) mediates a  $\beta$ arrestin-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) and the present study was undertaken to further characterize this signaling pathway. While the V2R-promoted ERK1/2 activity was insensitive to pertussis toxin treatment and inhibitors of phosphoinositol-3-kinase, phospholipase C and protein kinase C, MAPK activation was abolished by siRNA silencing of  $\beta$ arrestins, as well as inhibition of c-Src and the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). Also, inhibitors of protein kinase A and down-regulation of G $\alpha$ s by sustained cholera toxin treatment potentiated V2R's stimulation of ERK1/2. Together, these results suggest the V2R promotes ERK1/2 activation independently of heterotrimeric G protein signaling while simultaneously inhibiting ERK1/2 activity through stimulation of G $\alpha$ s and cAMP production.

## 1. Introduction

Increasing evidence suggests important roles for G protein-coupled receptors (GPCR) in the control of cell growth and differentiation through activation of mitogen activated protein kinases (MAPK), which can be achieved through multiple pathways depending on the receptor studied and cellular context (Marinissen and Gutkind 2001; Luttrell 2003). Many receptors have even been shown to stimulate extra-cellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) activity through different pathways simultaneously, sometimes implicating heterotrimeric G protein-dependent and independent pathways (Luttrell and Luttrell 2003). On one hand, the G protein-dependent pathways classically involve either the  $G\alpha$ -dependent production of second messengers and activation of their downstream effectors, or the  $G\beta\gamma$ -dependent activation of proteins with tyrosine kinase activity, such as the c-Src family of protein tyrosine kinases or different receptor tyrosine kinases (RTK) like the epidermal or platelet-derived growth factor receptors (EGFR and PDGFR) (Carpenter 2000; Gschwind et al. 2001). Moreover, RTK trans-activation seems to be important, although not always essential, for the mitogenic signaling of GPCR (Wetzker and Bohmer 2003). Little is known about the  $G\beta\gamma$  subunits direct effectors in RTK trans-activation, although phosphatidylinositol-3-kinases (Hawes et al. 1996; Lopez-Illasaca 1998; Yart et al. 2002) and Src family of non-receptor tyrosine kinases (Luttrell et al. 1997; Pierce et al. 2001) have each been proposed to be early intermediates. GPCR stimulation of MAPK through RTK trans-activation has also been proposed to require receptor endocytosis, either of the trans-activated RTK alone or of both the RTK and agonist-stimulated GPCR (Ferguson 2003). On the other hand, G-protein-independent pathways often involve the recruitment of the adaptor protein  $\beta$ arrestin to the activated receptors. Indeed, in addition to its role in GPCR desensitization and in promoting receptor internalization through interactions with the endocytic machinery,  $\beta$ arrestin has also been shown to interact with various proteins involved in signal transduction, suggesting it might also function in the recruitment of signaling proteins to GPCR (Miller and Lefkowitz 2001). Among others,  $\beta$ arrestin has been shown to bind the non-receptor

tyrosine kinase c-Src (Luttrell et al. 1999; Miller et al. 2000) as well as components of the ERK1/2 (Defea et al. 2000a) and c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) (McDonald et al. 2000) modules, acting as a scaffold for MAPK activation (Shenoy and Lefkowitz 2003; Luttrell 2003). In particular,  $\beta$ arrestin-dependent ERK1/2 activation by several GPCR has been shown to occur coincidentally with the assembly of multiprotein complexes containing the receptor,  $\beta$ arrestin, and the activated ERK1/2 (Defea et al. 2000a; Defea et al. 2000b; Luttrell et al. 2001). Since these complexes were found to be internalized and targeted to endosomes, this  $\beta$ arrestin-dependent ERK1/2 activation pathway leads to the formation of a discrete pool of ERK1/2 in the cytosol, preventing the nuclear translocation of the kinases (Defea et al. 2000b; Luttrell et al. 2001). The formation of such GPCR- $\beta$ arrestin-MAPK complexes following agonist stimulation was only found to occur with highly GRK-phosphorylated receptors of class B, such as the angiotensin receptor type 1 (AT<sub>1</sub>R) and the V2 vasopressin receptor (V2R), for which  $\beta$ arrestin has been shown to have high binding affinity, compared to class A receptors with which  $\beta$ arrestin interact only transiently (Oakley et al. 1999; Oakley et al. 2001).

We previously reported that the V2R, preferentially coupled to G<sub>s</sub> and cAMP production, promotes strong  $\beta$ arrestin-dependent ERK1/2 activation in human embryonic kidney 293 cells (HEK293), independently of receptor endocytosis (Charest and Bouvier 2003). Mostly expressed in the kidney, the V2R plays an important role in the regulation of multiple renal function, most notably water absorption but also NaCl and urea absorption, K<sup>+</sup> secretion as well as H<sup>+</sup> secretion/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption (Masilamani S. et al. 1999). Even though a role for the V2R-regulated ERK1/2 activity *in vivo* remains unknown, several studies underline the existence of cross-talks between signaling events generated by stimulation of the V2R by its endogenous ligand arginine vasopressin (AVP) and MAPK pathways regulated by the nerve growth factor (NGF) (Good 1998) and EGF (Phillips et al. 1994; Yamada et al. 1995) in different types of kidney cells. Moreover, the recent observations that the V2R could be implicated in the development of polycystic kidney diseases (Gattone et al. 2003) and that it was found to be expressed in various tumor cells

(North 2000), suggest this receptor might play a role in abnormal cell growth or differentiation associated with these pathological conditions. This study was then undertaken to further characterize and understand the signaling cascades implicated in the V2R-regulated ERK1/2 activity.

We report that, although non-mitogenic, the V2R mediates strong ERK1/2 activation through a single pathway involving  $\beta$ arrestin, the protein tyrosine kinase c-Src and the PDGFR, independently of heterotrimeric G protein signaling. Moreover, our results suggest that the V2R can also lead to inhibition of ERK1/2 activity through stimulation of G $\alpha$ s and cAMP production.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, glutamine, fungizone, G418 and phosphate-buffered saline (PBS) were from Wisent Inc. Cell culture plates and dishes were all purchased from BD Biosciences. Hank's balanced salt solution, RPMI 1640 Amino Acid solution, Hepes, arginine-8 vasopressin (AVP), SNC80, (-)-isoproterenol, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 3-isobutyl-1-methyl-xantine (IBMX) were from Sigma Chemical Co. while the epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor-BB (PDGF) were from Peprotech Inc. [<sup>3</sup>H]adenine, [<sup>3</sup>H]myo-inositol, [<sup>3</sup>H]thymidine and the enhance chemiluminescence lightening (ECL) were obtained from NEN Life Science Products. Cholera (CTX) and pertussis (PTX) toxins as well as all the inhibitors for protein kinases, phospholipases and RTK were from Calbiochem. Antibodies recognizing ERK1/2 (ERK) and their phosphorylated forms (P-ERK) as well as anti-myc 9E10, anti-HA 12CA5 and anti- $\beta$ arrestin2 (H9) IgGs were all from Santa Cruz Biotechnology Inc. while antibodies recognizing AKT and its phosphorylated form (P-AKT) as well as the phospho-(Ser/Thr) protein kinase A (PKA) substrate antibody (P-SPKA) were purchased from Cell Signaling Technology. Wild-type *c-Src* cDNA in pUSEamp and anti-Src (GD11) IgG were from Upstate Biotechnology.

## ***2.2. Expression vectors***

The plasmid encoding  $\beta$ ARK's c-tail conjugated to the extra-cellular and trans-membrane domain of the CD8 protein (T8 $\beta$ ARKctail) was generously provided by J. S. Gutkind (National Institutes of Health, Bethesda) and described elsewhere (Crespo et al. 1995). T8 $\beta$ ARKctailHA was generated by PCR, where the HA sequence YPYDVPDYA was added in frame at the carboxyl terminus of T8 $\beta$ ARKctail, and confirmed by sequencing. Plasmids encoding myc-V2R (Terrillon et al. 2003), myc- $\delta$ OR (Petaja-Repo et al. 2002) and myc- $\beta_2$ AR (Hebert et al. 1996) were described previously.

## ***2.3. Cell culture and transfections***

HEK293 and simian kidney (COS) cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 0.1 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 0.25  $\mu$ g/ml fungizone. Stable transfections were performed using the calcium phosphate precipitation method (Sambrook et al. 1989) and neomycin-resistant cells were selected in the presence of G418 (450  $\mu$ g/ml). Resistant clones were screened for V2R expression by radioligand binding. Transient transfections were performed using the FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol and cells were harvested 48 h after transfection. The siRNAs for  $\beta$ arrestin 1 and 2, previously described in Ahn S, PNAS 2003, were purchased from QIAGEN and transfected at 300 nM final (200 nM  $\beta$ arrestin1 siRNA and 100 nM  $\beta$ arrestin2 siRNA) using the RNAiFect transfection Reagent (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol.



#### **2.4. Western blotting**

Cells were grown in 6 well plates and rendered quiescent by serum starvation for 24h prior incubation for the indicated periods of time in the presence or absence of the specified inhibitors followed by agonist stimulation. Cells were then placed on ice, washed twice with ice-cold PBS and solubilized directly in 150  $\mu$ l of Laemmli sample buffer containing 50 mM of dithiothreitol. The samples were sonicated for 15 sec then heated 5 min at 95°C and microcentrifuged 5 min before fractionation of the proteins on SDS-PAGE. ERK1/2 phosphorylation was detected by protein immunoblotting using mouse monoclonal anti-P-ERK and anti-mouse HRP-conjugated antibodies for chemiluminescence detection. After quantification of phosphorylation by densitometry, nitrocellulose membranes were stripped of immunoglobulins and reprobed using rabbit polyclonal anti-ERK. ERK phosphorylation was normalized according to the loading of proteins by expressing the data as a ratio of P-ERK over total ERK. AKT phosphorylation was detected and quantified similarly, using rabbit polyclonal anti-P-AKT and anti-AKT antibodies coupled to anti-rabbit HRP-conjugated IgG. Phosphorylation of PKA substrates was detected using a rabbit polyclonal anti-P-SPKA antibody detecting proteins containing a phospho-Ser/Thr residue with arginine at the -3 position, followed by an anti-rabbit HRP-conjugated IgG. Detection of myc-tagged and HA-tagged constructs was performed using mouse monoclonal anti-myc 9E10 and anti-HA 12CA5 antibodies respectively with anti-mouse HRP-conjugated IgG. Detection of c-Src was carried out using a mouse monoclonal anti-Src and anti-mouse HRP-conjugated IgG while detection of  $\beta$ arrestin1 and 2 was achieved using the mouse monoclonal anti- $\beta$ arrestin2 (H9) antibody which recognizes both  $\beta$ arrestin isoforms, followed by anti-mouse HRP-conjugated IgG.

### ***2.5. Intracellular cAMP accumulation measurement***

Agonist-induced cAMP accumulation in HEK293 cells was measured as previously described (Charest and Bouvier 2003). Briefly, cells were grown in 6 well plates and incubated for 16h in the presence of [<sup>3</sup>H]adenine (2 μCi/ml) in complete DMEM medium with or without 300 ng/ml CTX. Cells were then washed twice with PBS containing 1 mM isobutylmethylxanthine before being incubated for 15 min in the presence of 1 μM AVP at 37°C. Reactions were stopped by adding 1 ml of ice cold 5% trichloroacetic acid and 1 mM of unlabeled cAMP to decrease enzymatic degradation of [<sup>3</sup>H]cAMP. The cells were scraped off the plates and centrifuged at 800 × g 20 min at 4°C to clear the lysates. The [<sup>3</sup>H]cAMP was then separated by sequential chromatography over Dowex and Alumina columns as described previously (Salomon et al. 1974). cAMP accumulation was then calculated as ( $[\text{cAMP}] / ([\text{cAMP}] + [\text{ATP}]) \times 1000$ ) and expressed as a percentage of the maximal AVP-stimulated cAMP production.

### ***2.6. Intracellular inositol phosphate (IP) accumulation measurement***

Agonist-induced IP accumulation in cells was measured as previously described (Hamdan et al. 2002). In brief, cells were grown in 24 well plates and incubated for 24 hours in the presence of [<sup>3</sup>H]myo-IP (1 μCi/ml) in IP-free media consisting of Hank's balanced salt solution supplemented with amino acids from a RPMI 1640 stock solution, 5 mM glutamine, 45 mM sodium bicarbonate, 100 mM Hepes, 0.1 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 0.25 μg/ml fungizone. Cells were then incubated or not in the presence of the phospholipase C (PLC) inhibitor ET-18-OCH<sub>3</sub> (PLC-I) for the time indicated before a 15 min treatment with 20 mM LiCl and the subsequent stimulation with 1 μM AVP for 15 min at 37°C. Reactions were stopped on ice, the media was aspirated and the cells incubated for 16h in the presence of 10 mM ice-cold formic acid at 4°C. Samples were neutralized with 100 mM ammonium hydroxide and [<sup>3</sup>H]IP was isolated by anion

exchange chromatography as described previously (Berridge 1983). IP accumulation was expressed as [ $^3\text{H}$ ]IP cpm/1000 and as a percentage of the maximal AVP-stimulated IP production.

### *2.7. [ $^3\text{H}$ ]Thymidine incorporation*

[ $^3\text{H}$ ]Thymidine incorporation was measured as described previously (Thibonnier et al. 1998a). Cells were grown in 24 well plates and starved for 16h prior incubation in the presence of the indicated ligands for 24h at 37°C followed by the addition of 1  $\mu\text{Ci/ml}$  of [ $^3\text{H}$ ]thymidine for 2h at 37°C. Reactions were stopped on ice and cells were washed twice with cold PBS before being fixed with 1 ml 10% Trichloroacetic acid (TCA) for 30 min at 4°C. Cells were then washed twice with 1 ml 5% TCA and solubilized in 250  $\mu\text{l}$  0.1 N NaOH / 0.1% SDS. Incorporated [ $^3\text{H}$ ]thymidine was measured by scintillation counting and expressed as fold over basal [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation.

### *2.8. Data analysis*

Immunoreactivities were determined by densitometric analysis of the films using NIH Image software. Statistical significances of the differences were carried out using unpaired Student's t-test where  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Role of *Gα* proteins

To explore the possibility of a G protein-dependent signaling component in the V2R-mediated ERK1/2 activation, a potential role for the different  $G\alpha$  proteins and their effectors was examined first. To test  $G\alpha_s$ 's implication, we assessed the effect of down-regulating this G protein by sustained CTX treatment. Indeed, prolonged treatment with CTX, which induces constitutive activation of  $G\alpha_s$  by inhibiting the GTPase intrinsic activity through methylation of the active site, has been shown to lead to down-regulation of  $G\alpha_s$  after 16 hours in HEK293 cells (Seidel et al. 1999). We show in Fig. 1A that while prolonged treatment with CTX significantly led to the inhibition of V2R-promoted cAMP accumulation (1A, *inset*), it produced the opposite effect on the AVP-induced ERK1/2 activity, as reflected by the increase in ERK1/2 phosphorylation. Moreover, inhibition of the  $G\alpha_s$  down-stream effector PKA by the selective inhibitor KT5720 (PKA-I) (Simpson and Morris 1995) led to a similar increase in AVP-induced ERK1/2 phosphorylation (Fig. 1B). These results suggest that not only  $G\alpha_s$  is not implicated in the stimulatory pathway linking the V2R to ERK1/2, but that it promotes inhibition of the MAPK through stimulation of cAMP production and the subsequent activation of PKA.

For certain  $G\alpha$ -coupled receptors, notably the  $\beta_2$ AR ( $\beta_2$ AR) (Daaka et al. 1997b) and the mouse prostacyclin receptor (Lawler et al. 2001), PKA phosphorylation of the receptors has been shown to induce a coupling switch from  $G_s$  to  $G_i/o$ , then leading to MAPK activation. Even though the V2R was never found to be phosphorylated by PKA, we nevertheless tested the potential involvement of  $G_i/o$  in the V2R-mediated ERK1/2 activation using the selective inhibitor PTX. This toxin has indeed been shown to efficiently inactivate  $G_i/o$  through selective ADP-ribosylation of this G protein (Murayama and Ui 1983). We show in Fig. 2 that PTX treatment did not inhibit the AVP-induced ERK1/2 phosphorylation, while it was very efficient in blocking the activation of the

kinases mediated by the prototypical Gi/o-coupled  $\delta$ -opioid receptor ( $\delta$ OR; *inset*), suggesting this G protein is not involved in the V2R-regulated ERK1/2 pathway.

Even if the V2R preferentially interacts with G $\alpha$ s, it was also reported to induce IP production and Ca<sup>2+</sup> mobilization through Gq coupling. We then investigated if Gq stimulation by the V2R could be implicated in the AVP-induced ERK1/2 activation. However, because of the lack of efficient inhibitors targeting G $\alpha$ q directly, we assessed the role of its direct and down-stream effectors PLC and protein kinase C (PKC) respectively instead. As shown in Fig. 3A, while inhibition of PLC with the selective inhibitor ET-18-OCH<sub>3</sub> (PLC-I) (Powis and Phil 1994) was efficient in blocking the AVP-induced IP accumulation (3A, *inset*), it did not affect the V2R-promoted ERK1/2 activation. Similarly, inhibition of PKC by the selective inhibitor bisindolylmaleimide I (PKC-I) (Toullec et al. 1991) also failed to block the AVP-induced MAPK phosphorylation (Fig. 3B). Even though we did not directly assess the role of G $\alpha$ q, the lack of involvement of its effectors in the AVP-induced ERK1/2 phosphorylation strongly suggests the V2R mediates activation of these MAPK independently of G $\alpha$ q signaling. Together, these results suggest the V2R stimulates ERK1/2 activity in a G $\alpha$ -independent fashion while inhibiting the kinases activity through stimulation of G $\alpha$ s and cAMP production.

### 3.2. Role of G $\beta\gamma$ subunits

Since G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  subunits are thought to dissociate upon G protein activation and have been shown to act on different effectors (Neves et al. 2002), we then specifically investigated the role of G $\beta\gamma$  subunits and their down-stream effectors in the V2R-promoted ERK1/2 activation. In particular, the roles of PI3K (Hawes et al. 1996; Lopez-Illasaca 1998; Yart et al. 2002) and Src family of non-receptor tyrosine kinases (Luttrell et al. 1997; Pierce et al. 2001) were assessed. We show in Fig. 4A that, while inhibition of PI3K with the selective inhibitor wortmannin (PI3K-I) (Arcaro and Wymann 1993) was very efficient in blocking ERK1/2 activation by FBS, it did not significantly decrease the AVP-

stimulated ERK1/2 activity. Furthermore, lack of AVP-induced phosphorylation of the direct down-stream effector of PI3K, AKT (4A, *inset*), suggests this kinase is not activated upon AVP stimulation, thus ruling out the possibility of being involved in the V2R-mediated ERK1/2 activation. Interestingly, treatment with the Src family-selective tyrosine kinase inhibitor PP2 (Src-I) (Hanke et al. 1996), as well as the over-expression of the c-Src dominant negative mutant K296R/Y528F (Src mut.) (Mukhopadhyay et al. 1995; Brown and Cooper 1996) were very efficient in blocking the AVP-induced ERK1/2 activity (Fig. 4B), pointing out to an important role for c-Src in the V2R-mediated activation of these MAPK.

To directly address the role of G $\beta\gamma$ , we used a previously characterized G $\beta\gamma$ -scavenger consisting of the C-tail of  $\beta$ ARK, also called GRK2, conjugated to the extracellular and trans-membrane domains of the CD8 protein (T8 $\beta$ ARKtail), which provides a membrane anchor for  $\beta$ ARK's C-tail (Crespo et al. 1995).  $\beta$ ARK has indeed been shown to interact with G $\beta\gamma$  dimers through its C-tail, and over-expression of this domain alone has been shown to scavenge free G $\beta\gamma$ , preventing them from interacting with their effectors (Inglese et al. 1992; Koch et al. 1993). As shown in Fig. 5, while T8 $\beta$ ARKtail efficiently blocked the previously reported G $\beta\gamma$ -dependent ERK1/2 activation by the  $\beta_2$ AR (*inset*) (Crespo et al. 1995), it did not affect ERK1/2 activation by the V2R despite high expression levels of the G $\beta\gamma$  scavenger. Altogether, these results suggest that the V2R stimulation of ERK1/2 activity occurs independently of heterotrimeric G protein signaling, even though the protein tyrosine kinase c-Src is involved.

### 3.3. RTK trans-activation

The implication of c-Src in the V2R-mediated ERK1/2 activation pathway raises the possibility of RTK trans-activation since c-Src has often been found to be an early intermediate in this process (Luttrell et al. 1997; Luttrell et al. 1999). The effect of two selective inhibitors of EGFR and PDGFR, the tyrphostins AG1478 (EGFR-I) and AG1295

(PDGFR-I) (Levitzki and Gilon 1995), on the AVP-induced ERK1/2 phosphorylation was then assessed. As shown in Fig. 6A, while inhibition of EGFR did not lead to any reduction in the AVP-induced ERK1/2 phosphorylation, treatment with the PDGFR-I inhibitor completely abolished the V2R-promoted activation of the MAPK, suggesting the requirement for PDGFR trans-activation.

Even if the V2R has been reported to have non- or anti-mitogenic effects in different cell types (Tohgo et al. 2003;Thibonnier et al. 1998), the finding it promotes ERK1/2 activation through PDGFR trans-activation in HEK293 cells suggests it could produce a mitogenic effect in this case, which could be comparable to that induced by PDGF stimulation. To assess the effect of AVP stimulation on cell division, DNA synthesis following V2R activation was measured by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation and compared to that promoted by direct stimulation of the PDGFR as well as the  $\beta_2$ AR, which has also been reported to induce a significant mitogenic response (Tohgo et al. 2003). As shown in Fig. 6B, while PDGFR and  $\beta_2$ AR stimulation were indeed found to induce DNA synthesis, V2R stimulation, by contrast, produced an anti-mitogenic effect similar to what was previously reported (Thibonnier et al. 1998). This result then suggests that even though PDGFR is implicated in the signaling cascade leading to ERK1/2 activation by the V2R, this pathway is functionally distinct from that engaged by PDGF stimulation.

### *3.4. The role of $\beta$ arrestin*

RTK trans-activation and  $\beta$ arrestin-dependent MAPK signaling are usually found to be part of two different pathways linking GPCR to MAPK (Luttrell 2003). Given the complete dependence of the V2R-mediated ERK1/2 activation on c-Src and PDGFR, the involvement of  $\beta$ arrestin in promoting MAPK activation, which we reported in a previous study using dominant negative mutants of  $\beta$ arrestin (Charest and Bouvier 2003), was further investigated by siRNA-directed silencing of  $\beta$ arrestin. We show in Fig. 7 that  $\beta$ arrestin knockdown, following transfection of siRNAs directed against both  $\beta$ arrestin

isoforms, completely blocked the AVP-induced ERK1/2 phosphorylation, suggesting the requirement of  $\beta$ arrestin in the pathway leading to ERK1/2 activation by the V2R.

#### 4. Discussion

Taken together, our results show that the V2R regulates ERK1/2 activity in a dual fashion, generating two opposing signals at the same time. On one hand, the V2R promotes strong ERK1/2 activation independently of heterotrimeric G protein signaling, involving  $\beta$ arrestin, c-Src, and the PDGFR as part of a single pathway; and on the other hand, through its coupling to  $G_{\alpha s}$ , the V2R induces a cAMP and PKA-dependent inhibition of the ERK1/2 activity.

Similar observations of a single GPCR generating two opposing signals regulating MAPK activity were actually reported for the  $G_{\alpha s}$ -coupled  $\beta_2$ AR (Daaka et al. 1997). Indeed, while the  $\beta_2$ AR-promoted stimulation of  $G_{\alpha s}$  and cAMP production leads to inhibition of ERK1/2 activity, the coupling of  $\beta_2$ AR to  $G_{\alpha i}$  promotes activation of the MAPK. In this particular case, however,  $G_{\alpha s}$  also participates in the activation of ERK1/2 by leading to PKA activation which, through  $\beta_2$ AR phosphorylation, enhances the affinity of the receptor for  $G_{\alpha i}$ . Such contribution of  $G_{\alpha s}$  signaling to MAPK activation by the V2R was not found to occur probably because this receptor is not a substrate for PKA and, furthermore, because  $G_{i/o}$  were not found to be involved in the AVP-induced ERK1/2 activation (Fig. 2), thus ruling out the involvement of a  $G_{\alpha s}$  to  $G_{\alpha i}$  switch of coupling upon agonist stimulation. Moreover, we showed, in a previous study, that the potency of AVP stimulation of MAPK is closest to the affinity of the V2R for AVP ( $\sim 10^{-9}$ M) rather than the potency of AVP-induced cAMP accumulation ( $\sim 10^{-11}$ M) (Charest and Bouvier 2003). Consequently, because  $\beta$ arrestin recruitment reflects agonist occupancy, whereas the amplification process taking place in the AVP-induced cAMP accumulation is expected to increase the apparent potency, these observations support the results presented herein,



suggesting that the AVP-stimulated ERK1/2 activity does not depend on Gs-promoted signaling. Even though stimulation of cAMP production has been shown to stimulate ERK1/2 activity in cells of neuronal and hematopoietic origins through PKA phosphorylation of Rap-1 and the subsequent activation of B-Raf (Vossler et al. 1997;Grewal et al. 2000), this does not seem to be the case for other cell types. Indeed, our finding that  $G_{\alpha s}$  signaling induces inhibition of ERK1/2 activity is supported by previous studies where the  $G_{\alpha s}$ -cAMP-PKA pathway was shown to inhibit these MAPK in non-neuronal or -hematopoietic cells through direct phosphorylation and inhibition of the c-Raf-1 isoform (Kikuchi and Williams 1996;Mischak et al. 1996;Crespo et al. 1995).

Also, even if the V2R was found to stimulate IP production to a significant extent (Fig. 3A *inset*), as was previously reported (Zhu et al. 1994;Ecelbarger et al. 1996), this  $G_{\alpha q}$ -dependent pathway does not seem to be required in the activation of ERK1/2 by the V2R since inhibition of the  $G_{\alpha q}$  effectors PLC and PKC did not affect the AVP-stimulated MAPK activity (Fig. 3A and 3B). Although this pathway could lead to ERK1/2 activation, since the V2R preferentially interacts with Gs, and thus only a fraction of the receptors will be coupled to Gq, the possible contribution of  $G_{\alpha q}$ -dependent MAPK activation compared to that of the  $\beta$ arrestin-dependent pathway is expected to be negligible. However, the finding that no  $G_{\alpha}$ -mediated signaling was implicated in the pathway linking the V2R to ERK1/2 activation did not exclude the possibility of a  $G\beta\gamma$ -dependent pathway. Indeed,  $G\beta\gamma$  dimers released after agonist-stimulation have been shown to promote activation of a different subset of effectors, independently of  $G_{\alpha}$  subunits. In fact, the expression of proteins that sequester free  $G\beta\gamma$  dimers, such as the  $G_{\alpha}$  subunit of transducin (Faure et al. 1994) or the C-tail of GRK2 (Koch et al. 1994), was shown to inhibit GPCR-mediated ERK1/2 activation in many systems. Indeed, both  $G_i$ -coupled receptors, such as the lysophosphatidic acid, the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic, and M2 muscarinic receptors, as well as  $G_{q/11}$ -coupled receptors, such as the M1 muscarinic receptor, were found to activate ERK1/2 via a  $G\beta\gamma$ -dependent pathway that requires either protein tyrosine kinase or PI3K activity (Crespo et al. 1994;Hawes et al. 1996;van Biesen et al. 1995). Interestingly, the

involvement of Gs-derived G $\beta\gamma$  subunits in GPCR-mediated MAPK activation has never been reported. It follows that, even though the V2R preferentially interacts with Gs, since it can also stimulate Gq signaling (Fig. 3) (Zhu et al. 1994;Ecelbarger et al. 1996), one could suggest G $\beta\gamma$  dimers released upon activation of the latter heterotrimeric G protein could be implicated in ERK1/2 activation. However, lack of inhibition of the AVP-promoted ERK1/2 phosphorylation upon over-expression of the G $\beta\gamma$  scavenger T8 $\beta$ ARKctail suggests that G $\beta\gamma$  subunits are not implicated in this pathway (Fig. 4C). Our study thus provides a rare observation that a GPCR mediates ERK1/2 activation independently of heterotrimeric G protein signaling.

Although the general paradigm of GPCR function is that they transmit extra-cellular signals to intra-cellular signaling networks via heterotrimeric G proteins, a growing number of observations, including the present study, indicate that GPCR can also signal through mechanisms that function independently of G protein coupling (Brzostowski and Kimmel 2001;Heuss and Gerber 2000). In some cases the receptors have even been found to directly interact and regulate effectors including ion channels and enzymes. As for MAPK activation, G-protein independent pathways seem to involve, as is the case for the V2R, the adaptor protein  $\beta$ arrestin (Luttrell and Luttrell 2003). For instance, heterotrimeric G protein-independent but  $\beta$ arrestin-dependent activation of MAPK has been documented for mutants of the angiotensin type 1 receptor that failed to couple to their cognate G proteins (Seta et al. 2002;Wei et al. 2003). Also, inverse agonists towards the  $\beta_2$ AR-stimulated adenylyl cyclase activity were shown to promote partial  $\beta$ arrestin-dependent ERK1/2 activation independently of heterotrimeric G proteins (Azzi et al. 2003). To our knowledge, however, the V2R is the first example of a native receptor promoting strong agonist-induced ERK1/2 activation in a manner completely independent of heterotrimeric G protein coupling.

The V2R is a typical class B receptor, undergoing high agonist-induced GRK phosphorylation leading to strong  $\beta$ arrestin recruitment, and co-localizing with the adaptor

protein in endocytic vesicles after endocytosis (Oakley et al. 1999). Moreover, as it was found to occur for other class B GPCR, V2R-bound  $\beta$ arrestin has been shown to promote the formation of a multiprotein complex, which presumably includes the receptor,  $\beta$ arrestin, Raf, MEK and ERK1/2, leading to endosome-localized ERK1/2 activity (Tohgo et al. 2002;Tohgo et al. 2003). This  $\beta$ arrestin-mediated cytosolic retention of activated ERK1/2 could then explain the non-mitogenic effect of AVP (Fig. 6B), as it was previously suggested (Tohgo et al. 2003), since this would prevent nuclear translocation of the activated MAPK and their stimulation of DNA synthesis. Since RTK usually generate mitogenic responses, the intriguing finding is then that this  $\beta$ arrestin-dependent V2R-linked MAPK pathway also requires PDGFR trans-activation. Interestingly, even though less examples of PDGFR trans-activation were reported compared to EGFR, several recent studies where PDGFR has been shown to be implicated in GPCR-mediated ERK1/2 activation also found c-Src to be involved (Nebigil et al. 2000;Oak et al. 2001;Liu et al. 2004;Tanimoto et al. 2004;Waters et al. 2005), as it seems to be the case for the V2R-stimulated ERK1/2 activity. The role of c-Src in these signaling pathways is still unclear but several evidence suggests it might directly take part in the PDGFR trans-activation mechanism (Nebigil et al. 2000;Liu et al. 2004;Tanimoto et al. 2004). Indeed, although c-Src can be a down-stream effector of several RTK including PDGFR (Heldin et al. 1998), this protein tyrosine kinase has also been shown to directly phosphorylate the PDGFR leading to its activation in a manner that is distinct from that induced by PDGF stimulation (Saito et al. 2002). This c-Src promoted PDGFR phosphorylation could then be sufficient to induce the recruitment of the Grb2/SOS complex and the subsequent recruitment and activation of Ras, which in turn leads to activation of the Raf-MEK-ERK1/2 pathway. Moreover,  $\beta$ arrestin-promoted recruitment of c-Src to ligand-activated GPCR has been shown to be implicated in MAPK activation by several receptors, notably the  $\beta_2$ AR (Luttrell et al. 1999;Miller et al. 2000) and the neurokinin receptor 1 (Defea et al. 2000a). Thus, we suggest that in the V2R-mediated ERK1/2 activation,  $\beta$ arrestin could promote the formation of a large mutliprotein complex where all the components of the pathway are regrouped together, with  $\beta$ arrestin serving as a scaffold for c-Src as well as Raf-MEK-

ERK1/2 while the c-Src trans-activated PDGFR scaffolds Grb2/SOS, leading to Ras activation, which in turn activates the  $\beta$ arrestin-bound Raf-MEK-ERK1/2 MAPK module. The formation of complexes between RTK and GPCR has actually been shown to occur and lead to MAPK activation by the sphingosine-1-phosphate receptor type 1 in complex with the PDGFR (Alderton et al. 2001; Waters et al. 2005), and the lysophosphatidic acid receptor with the NGF receptor Trk A (Pyne et al. 2003). Moreover,  $\beta$ arrestin has also been suggested to be implicated in ERK1/2 activation by these GPCR-RTK signaling complexes. In these cases, however, ERK1/2 activation has been shown to be dependent on the internalization of the complexes, and the role of  $\beta$ arrestin seems to be associated to its role in promoting receptor endocytosis. The role of  $\beta$ arrestin in the AVP-stimulated ERK1/2 activity is however believed to be different since we previously showed that ERK1/2 activation by the V2R is independent of receptor endocytosis (Charest and Bouvier 2003).

The reason for the discrimination between PDGFR and EGFR as the RTK trans-activated by the V2R remains unknown. Even though several cases of PDGFR trans-activation were reported, EGFR still seems to be the preferred RTK trans-activated by GPCR (Wetzker and Bohmer 2003). An example illustrating this is the LPA-mediated ERK1/2 activation in L cells, which do not express endogenous EGFR, requiring the G $\beta$  $\gamma$ -dependent activation of the PDGFR (Herrlich et al. 1998). Interestingly, when EGFR were introduced into these cells, LPA receptors no longer utilize PDGFR to support ERK1/2 activation, suggesting that cross-talk with EGFR is a preferred signaling mechanism. Still, this is not expected to be the case for the V2R-mediated MAPK activation in HEK293 cells because these cells do express the EGFR, as shown by the strong EGF-stimulated ERK1/2 activity (Fig. 6A *inset*). The nature of this discrimination is thus very intriguing and remains to be investigated.

In conclusion, our study shows that the V2R stimulates ERK1/2 activity in a heterotrimeric G protein-independent and non-mitogenic fashion, implicating  $\beta$ arrestin, c-

Src as well as PDGFR trans-activation; and inhibits the MAPK through stimulation of G $\alpha$ s and cAMP production. The net effect of AVP stimulation on the V2R-regulated ERK1/2 activity will then represent the balance between  $\beta$ arrestin-promoted activation and G $\alpha$ s-mediated inhibition of ERK1/2. These results also suggest that any pathway leading to cAMP production will inhibit the V2R-mediated MAPK activation. Hence, depending on the cell type, one signaling pathway generated by the V2R can be favored over the other and disturbance of the established equilibrium, leading to enhanced MAPK activation for example, might play a role in the development and progression of pathological conditions resulting from abnormal cell growth or differentiation.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research and the Quebec Heart and Stroke Foundation. P.G.C. was supported by doctoral studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds de Recherche en Santé du Québec; G.O.-L. was supported by a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada; M.A. was supported by a post-doctoral fellowship from the Canadian Hypertension Society; and M.B. holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

## Reference List

1. Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S., *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 368-376, 2001.
2. Luttrell, L. M., *J.Mol.Endocrinol.* 30, 117-126, 2003.
3. Luttrell, D. K. and Luttrell, L. M., *Assay.Drug Dev.Technol.* 1, 327-338, 2003.
4. Carpenter, G., *Sci.STKE.* 2000, E1, 2000.
5. Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., and Ullrich, A., *Oncogene* 20, 1594-1600, 2001.
6. Wetzker, R. and Bohmer, F. D., *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 651-657, 2003.
7. Hawes, B. E., Luttrell, L. M., van Biesen, T., and Lefkowitz, R. J., *J.Biol.Chem.* 271, 12133-12136, 1996.
8. Lopez-Illasaca, M., *Biochem.Pharmacol.* 56, 269-277, 1998.
9. Yart, A., Roche, S., Wetzker, R., Laffargue, M., Tonks, N., Mayeux, P., Chap, H., and Raynal, P., *J.Biol.Chem.* 277, 21167-21178, 2002.
10. Luttrell, L. M., Della, R. G., van Biesen, T., Luttrell, D. K., and Lefkowitz, R. J., *J.Biol.Chem.* 272, 4637-4644, 1997.
11. Pierce, K. L., Tohgo, A., Ahn, S., Field, M. E., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J., *J.Biol.Chem.* 276, 23155-23160, 2001.
12. Ferguson, S. S., *Trends Neurosci.* 26, 119-122, 2003.
13. Miller, W. E. and Lefkowitz, R. J., *Curr.Opin.Cell Biol.* 13, 139-145, 2001.

14. Luttrell, L., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F. T., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., *Science* 283, 655-661, 1999.
15. Miller, W. E., Maudsley, S., Ahn, S., Khan, K. D., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J., *J.Biol.Chem.* 275, 11312-11319, 2000.
16. Defea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O., and Bunnett, N. W., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 11086-11091, 2000.
17. McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J., and Lefkowitz, R. J., *Science* 290, 1574-1577, 2000.
18. Shenoy, S. K. and Lefkowitz, R. J., *Biochem.J.* 375, 503-515, 2003.
19. Defea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D., and Bunnett, N. W., *J.Cell Biol.* 148, 1267-1281, 2000.
20. Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., and Lefkowitz, R. J., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 2449-2454, 2001.
21. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G., *J.Biol.Chem.* 274, 32248-32257, 1999.
22. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G., *J.Biol.Chem.* 276, 19452-19460, 2001.
23. Charest, P. G. and Bouvier, M., *J.Biol.Chem.* 278, 41541-41551, 2003.
24. Masilamani S., Knepper M.A., and Burg M.B., in "The Kidney," Saunders, 1999.
25. Good, D. W., *Am.J.Physiol* 274, C931-C939, 1998.

26. Phillips, P. A., Grant, S. L., Davidson, A. F., Risvanis, J., Stephenson, J., and Gow, C. B., *Kidney Int.* 45, 1028-1036, 1994.
27. Yamada, T., Terada, Y., Homma, M. K., Nonoguchi, H., Sasaki, S., Yuasa, Y., Tomita, K., and Marumo, F., *Kidney Int.* 48, 745-752, 1995.
28. Gattone, V. H., Wang, X., Harris, P. C., and Torres, V. E., *Nat.Med.* 9, 1323-1326, 2003.
29. North, W. G., *Exp.Physiol* 85 Spec No, 27S-40S, 2000.
30. Crespo, P., Cachero, T. G., Xu, N., and Gutkind, J. S., *J.Biol.Chem.* 270, 25259-25265, 1995.
31. Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M. A., Taulan, M., Jockers, R., Barberis, C., and Bouvier, M., *Mol.Endocrinol.* 17, 677-691, 2003.
32. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Bhalla, S., Laperriere, A., Morello, J. P., and Bouvier, M., *EMBO J.* 21, 1628-1637, 2002.
33. Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., and Bouvier, M., *J.Biol.Chem.* 271, 16384-16392, 1996.
34. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular cloning: a laboratory manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
35. Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M., *Anal.Biochem.* 58, 541-548, 1974.
36. Hamdan, F. F., Ward, S. D., Siddiqui, N. A., Bloodworth, L. M., and Wess, J., *Biochemistry* 41, 7647-7658, 2002.
37. Berridge, M. J., *Biochem.J.* 212, 849-858, 1983.



38. Thibonnier, M., Conarty, D. M., Preston, J. A., Wilkins, P. L., Berti-Mattera, L. N., and Mattera, R., *Adv.Exp.Med.Biol.* 449, 251-276, 1998.
39. Seidel, M. G., Klinger, M., Freissmuth, M., and Holler, C., *J.Biol.Chem.* 274, 25833-25841, 1999.
40. Simpson, C. S. and Morris, B. J., *Neuroscience* 68, 97-106, 1995.
41. Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J., *Nature* 390, 88-91, 1997.
42. Lawler, O. A., Miggin, S. M., and Kinsella, B. T., *J.Biol.Chem.* 276, 33596-33607, 2001.
43. Murayama, T. and Ui, M., *J.Biol.Chem.* 258, 3319-3326, 1983.
44. Powis, G. and Phil, D., *Cancer Metastasis Rev.* 13, 91-103, 1994.
45. Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., and ., *J.Biol.Chem.* 266, 15771-15781, 1991.
46. Neves, S. R., Ram, P. T., and Iyengar, R., *Science* 296, 1636-1639, 2002.
47. Luttrell, L. M., Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Luttrell, D. K., and Lefkowitz, R. J., *J.Biol.Chem.* 272, 4637-4644, 1997.
48. Arcaro, A. and Wymann, M. P., *Biochem.J.* 296 ( Pt 2), 297-301, 1993.
49. Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., and Connelly, P. A., *J.Biol.Chem.* 271, 695-701, 1996.
50. Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., Zhou, X. M., Foster, D., Brugge, J. S., and Sukhatme, V. P., *Nature* 375, 577-581, 1995.

51. Brown, M. T. and Cooper, J. A., *Biochim.Biophys.Acta* 1287, 121-149, 1996.
52. Inglese, J., Koch, W. J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., *Nature* 359, 147-150, 1992.
53. Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C., and Lefkowitz, R. J., *J.Biol.Chem.* 268, 8256-8260, 1993.
54. Levitzki, A. and Gilon, C., *Trends Pharmacol.Sci.* 1995.
55. Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M., *J.Biol.Chem.* 278, 6258-6267, 2003.
56. Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S., and Stork, P. J., *CELL* 89, 73-82, 1997.
57. Grewal, S. S., Horgan, A. M., York, R. D., Withers, G. S., Banker, G. A., and Stork, P. J., *J.Biol.Chem.* 275, 3722-3728, 2000.
58. Kikuchi, A. and Williams, L. T., *J.Biol.Chem.* 271, 588-594, 1996.
59. Mischak, H., Seitz, T., Janosch, P., Eulitz, M., Steen, H., Schellerer, M., Philipp, A., and Kolch, W., *Mol.Cell Biol.* 16, 5409-5418, 1996.
60. Zhu, X., Gilbert, S., Birnbaumer, M., and Birnbaumer, L., *Mol.Pharmacol.* 46, 460-469, 1994.
61. Ecelbarger, C. A., Chou, C. L., Lolait, S. J., Knepper, M. A., and DiGiovanni, S. R., *Am.J.Physiol* 270, F623-F633, 1996.
62. Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T., and Bourne, H. R., *J.Biol.Chem.* 269, 7851-7854, 1994.

63. Koch, W. J., Hawes, B. E., Inglese, J., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J., *J.Biol.Chem.* 269, 6193-6197, 1994.
64. Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F., and Gutkind, J. S., *Nature* 369, 418-420, 1994.
65. van Biesen, T., Hawes, B. E., Luttrell, D. K., Krueger, K. M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J., *Nature* 376, 781-784, 1995.
66. Brzostowski, J. A. and Kimmel, A. R., *Trends Biochem.Sci.* 26, 291-297, 2001.
67. Heuss, C. and Gerber, U., *Trends Neurosci.* 23, 469-475, 2000.
68. Seta, K., Nanamori, M., Modrall, J. G., Neubig, R. R., and Sadoshima, J., *J.Biol.Chem.* 277, 9268-9277, 2002.
69. Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 10782-10787, 2003.
70. Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Pineyro, G., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 11406-11411, 2003.
71. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G., *J.Biol.Chem.* 274, 32248-32257, 1999.
72. Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M., *J.Biol.Chem.* 277, 9429-9436, 2002.
73. Nebigil, C. G., Launay, J. M., Hickel, P., Tournois, C., and Maroteaux, L., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 2591-2596, 2000.
74. Oak, J. N., Lavine, N., and Van Tol, H. H., *Mol.Pharmacol.* 60, 92-103, 2001.

75. Liu, J., Liao, Z., Camden, J., Griffin, K. D., Garrad, R. C., Santiago-Perez, L. I., Gonzalez, F. A., Seye, C. I., Weisman, G. A., and Erb, L., *J.Biol.Chem.* 279, 8212-8218, 2004.
76. Tanimoto, T., Lungu, A. O., and Berk, B. C., *Circ.Res.* 94, 1050-1058, 2004.
77. Waters, C. M., Connell, M. C., Pyne, S., and Pyne, N. J., *Cell Signal.* 17, 263-277, 2005.
78. Heldin, C. H., Ostman, A., and Ronnstrand, L., *Biochim.Biophys.Acta* 1378, F79-113, 1998.
79. Saito, S., Frank, G. D., Mifune, M., Ohba, M., Utsunomiya, H., Motley, E. D., Inagami, T., and Eguchi, S., *J.Biol.Chem.* 277, 44695-44700, 2002.
80. Alderton, F., Rakhit, S., Kong, K. C., Palmer, T., Sambhi, B., Pyne, S., and Pyne, N. J., *J.Biol.Chem.* 276, 28578-28585, 2001.
81. Pyne, N. J., Waters, C., Moughal, N. A., Sambhi, B. S., and Pyne, S., *Biochem.Soc.Trans.* 31, 1220-1225, 2003.
82. Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G., and Gudermann, T., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 8985-8990, 1998.

**Figure legends**

**Fig. 1. Inhibition of the G $\alpha$ s/PKA pathway potentiates the V2R-mediated ERK1/2 activation.** Cells stably expressing the V2R were serum-starved for 24h and treated or not with the indicated inhibitors at 37°C prior 2 min stimulation with 1  $\mu$ M AVP. Cells were then lysed in Laemeli sample buffer, subjected to SDS-PAGE and MAPK activity was detected by western blot using phospho-specific anti-ERK1/2 antibodies (P-ERK). Expression levels of the MAPK were controlled using antibodies directed against the total kinase population (ERK) and data expressed as a % P-ERK/ERK of the level observed in control conditions. **A)** Cells were pre-treated 16 h with 300 ng/ml CTX. *Inset*, AVP-induced cAMP accumulation. **B)** Cells were pre-treated for 30 min with 100 nM of the PKA inhibitor KT5720 (PKA-I). *Inset*, PKA phosphorylation was detected by western blot using phospho-(Ser/Thr) PKA substrate antibodies (P-SPKA). Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*, indicates  $p < 0.05$ .

**Fig. 2. G $\alpha$ i-independent V2R-mediated ERK1/2 activation.** Cells stably expressing the V2R were pre-treated or not for 16h with 100 ng/ml PTX at 37°C prior AVP stimulation. ERK1/2 phosphorylation was detected and quantified as described in Figure 1. *Inset*, Cells stably expressing the  $\delta$ OR were treated or not with PTX prior stimulation with 1  $\mu$ M SNC80. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*, indicates  $p < 0.05$ .

**Fig. 3. V2R mediates ERK1/2 activation independently of PLC and PKC.** Cells stably expressing the V2R were pre-treated or not with the indicated inhibitors at 37°C prior AVP stimulation. ERK1/2 phosphorylation was detected and quantified as described in Figure 1. **A)** Cells were pre-treated for 1h with 10  $\mu$ M of the PLC inhibitor ET-18-OCH<sub>3</sub> (PLC-I). *Inset*, AVP-induced inositol phosphate (IP) accumulation. **B)** Cells were pre-treated for 30 min with 500 nM of the PKC inhibitor bisindolylmaleimide I (PKC-I). *Inset*, PMA-induced

ERK1/2 phosphorylation. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*, indicates  $p < 0.05$ .

**Fig. 4. Role of c-Src in the V2R-promoted ERK1/2 activation.** **A)** Cells stably expressing the V2R were pre-incubated for 30 min with 500 nM of the PI3K inhibitor (PI3K-I) wortmannin at 37°C prior FBS or AVP stimulation. ERK1/2 phosphorylation was detected and quantified as described in Figure 1. *Inset*, AKT phosphorylation was measured and quantified by western blot using phospho-specific anti-AKT (P-AKT) and anti-AKT (AKT) antibodies as described for ERK1/2 in Figure 1. **B)** HEK293 cells transiently expressing myc-V2R were co-transfected with or without a c-Src dominant negative mutant (K296R/Y528F; Src mut.). Where indicated, cells were pre-treated for 1h with 50  $\mu$ M of the Src inhibitor (Src-I) PP2 at 37°C prior AVP stimulation. To control for myc-V2R expression, lysates were subjected to western blotting using monoclonal anti-myc 9E10 antibody. Data represent mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*, indicates  $p < 0.02$ .

**Fig. 5. G $\beta$ y-independent V2R-mediated ERK1/2 activation.** HEK293 cells transiently expressing the V2R were co-transfected with the pcDNA3.1 vector either empty or encoding T8 $\beta$ ARKct-HA. Cells were stimulated or not with 1  $\mu$ M AVP and ERK1/2 phosphorylation was detected and quantified as described in Figure 1. To control for myc-V2R and T8 $\beta$ ARKct-HA expression, lysates were subjected to western blotting using either anti-myc 9E10 or anti-HA 12CA5 monoclonal antibodies. *Inset*, COS cells transiently expressing the  $\beta_2$ AR were co-transfected with the pcDNA3.1 vector either empty or encoding T8 $\beta$ ARKct-HA were stimulated with 1  $\mu$ M isoproterenol (ISO) prior assessing of ERK1/2 phosphorylation. Data represent mean the  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*, indicates  $p < 0.05$ .

**Fig. 6. PDGFR-dependent ERK1/2 activation by the V2R produces an anti-mitogenic response.** **A)** Cells stably expressing the V2R were pre-treated or not for 30 min with either

500 nM of the EGFR inhibitor AG1478 (EGFR-I) or 10  $\mu$ M of the PDGFR inhibitor AG1295 (PDGFR-I) at 37°C prior AVP stimulation. ERK1/2 phosphorylation was detected and quantified as described in Figure 1. *Inset*, EGF- and PDGF-induced ERK1/2 phosphorylation was assessed in the presence or absence of the inhibitors. **B)** Cells stably expressing the V2R or  $\beta_2$ AR were starved for 16h prior stimulation for 24h at 37°C with either 10% FBS (FBS), 250  $\mu$ g/ml of human PDGF BB (PDGF), 1  $\mu$ M AVP or 1  $\mu$ M ISO. Cells were then incubated for 2h in the presence of 1  $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H]thymidine before being washed and harvested. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*, indicates  $p < 0.02$ .

**Fig. 7. V2R-mediated ERK1/2 activation requires  $\beta$ arrestin.** Cells stably expressing the V2R were transfected with siRNAs targeting both  $\beta$ arrestin isoforms. Cells were stimulated or not with 1  $\mu$ M AVP and ERK1/2 phosphorylation was detected and quantified as described in Figure 1. To assess  $\beta$ arrestin knock-down, lysates were subjected to western blotting using the anti- $\beta$ arrestin2 (H9) antibody recognizing both  $\beta$ arrestin isoforms. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*, indicates  $p < 0.01$ .

Fig. 1

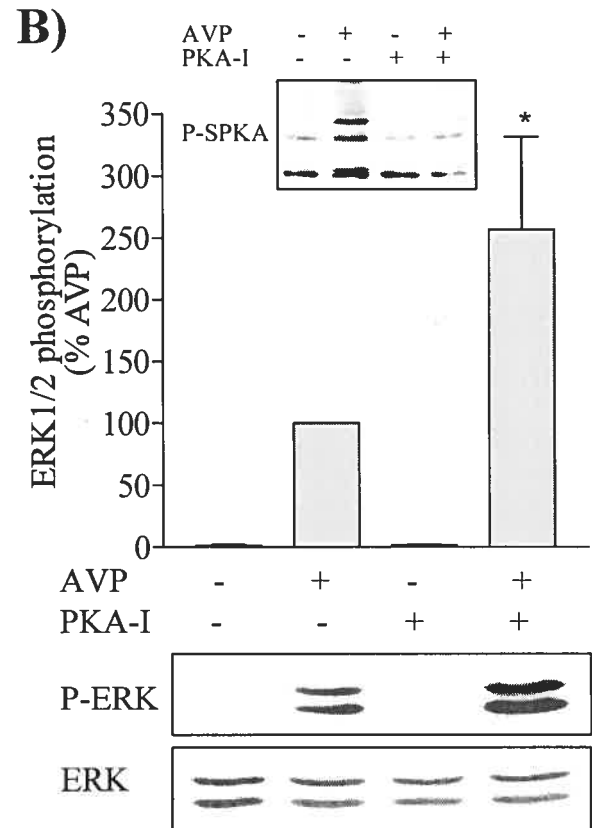
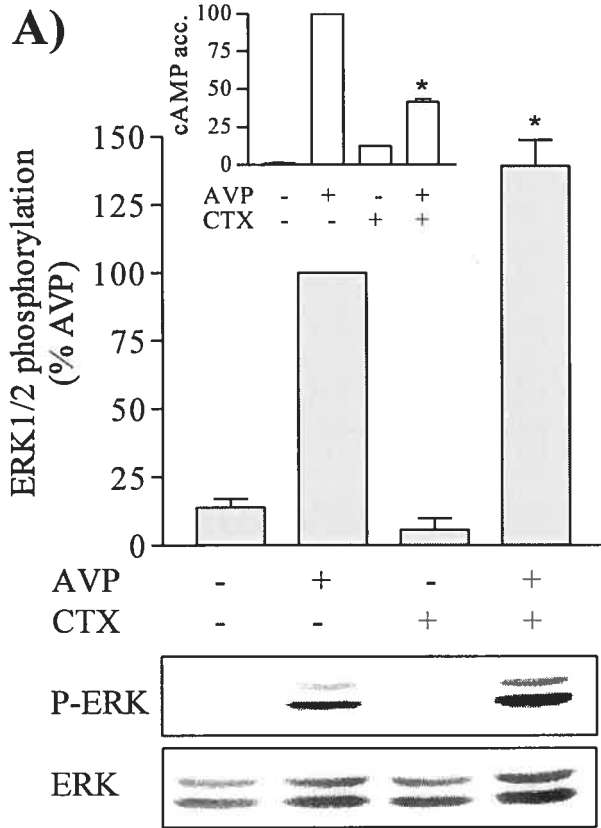




Fig. 2

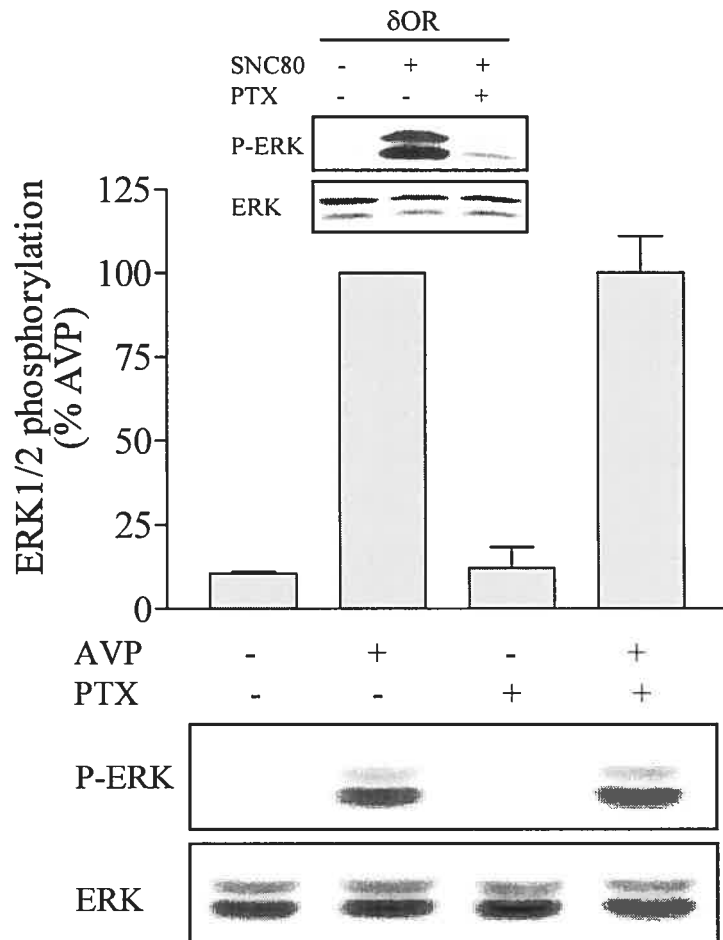


Fig. 3

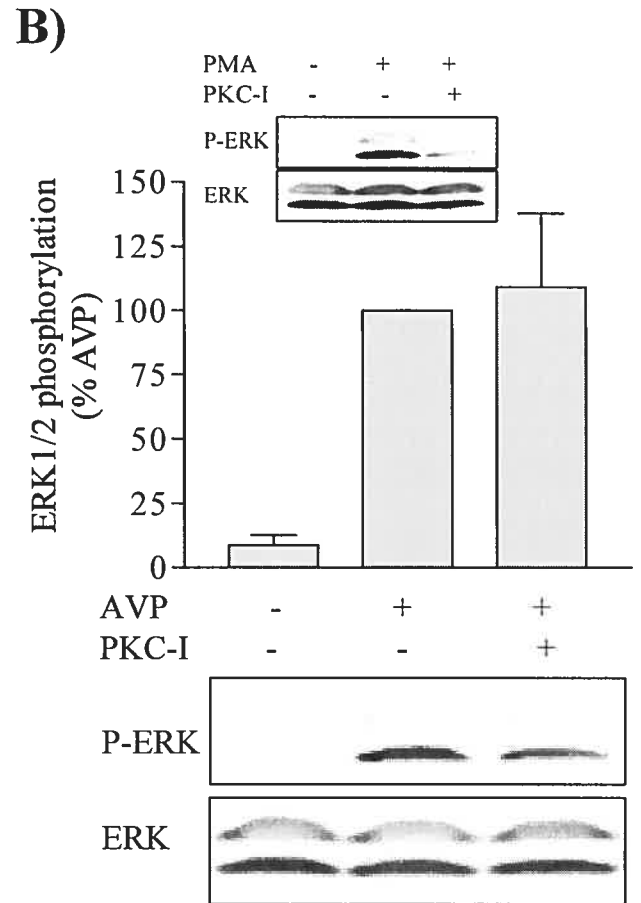
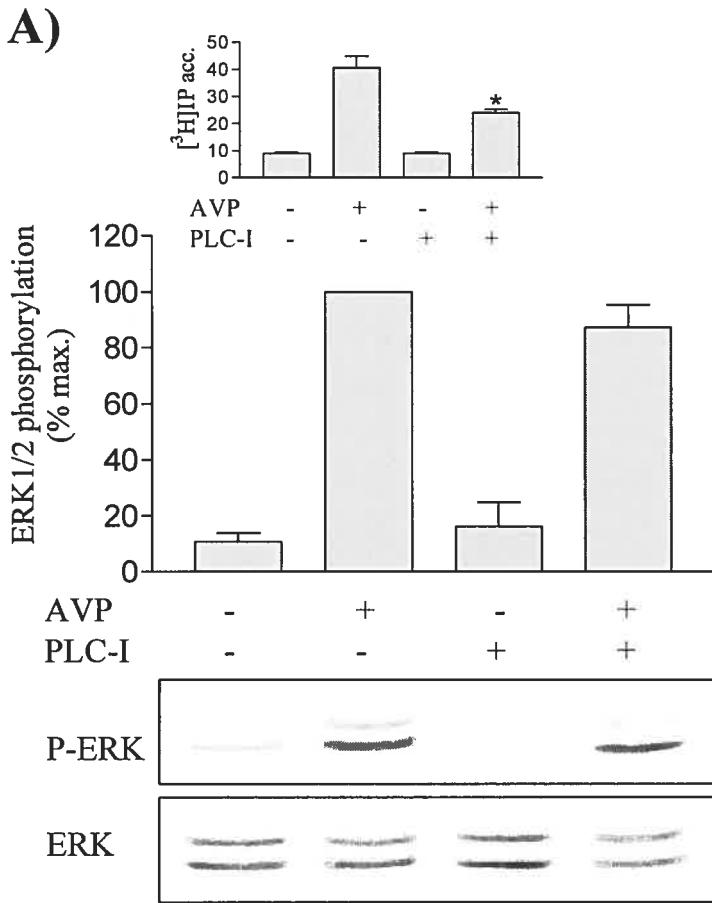


Fig. 4

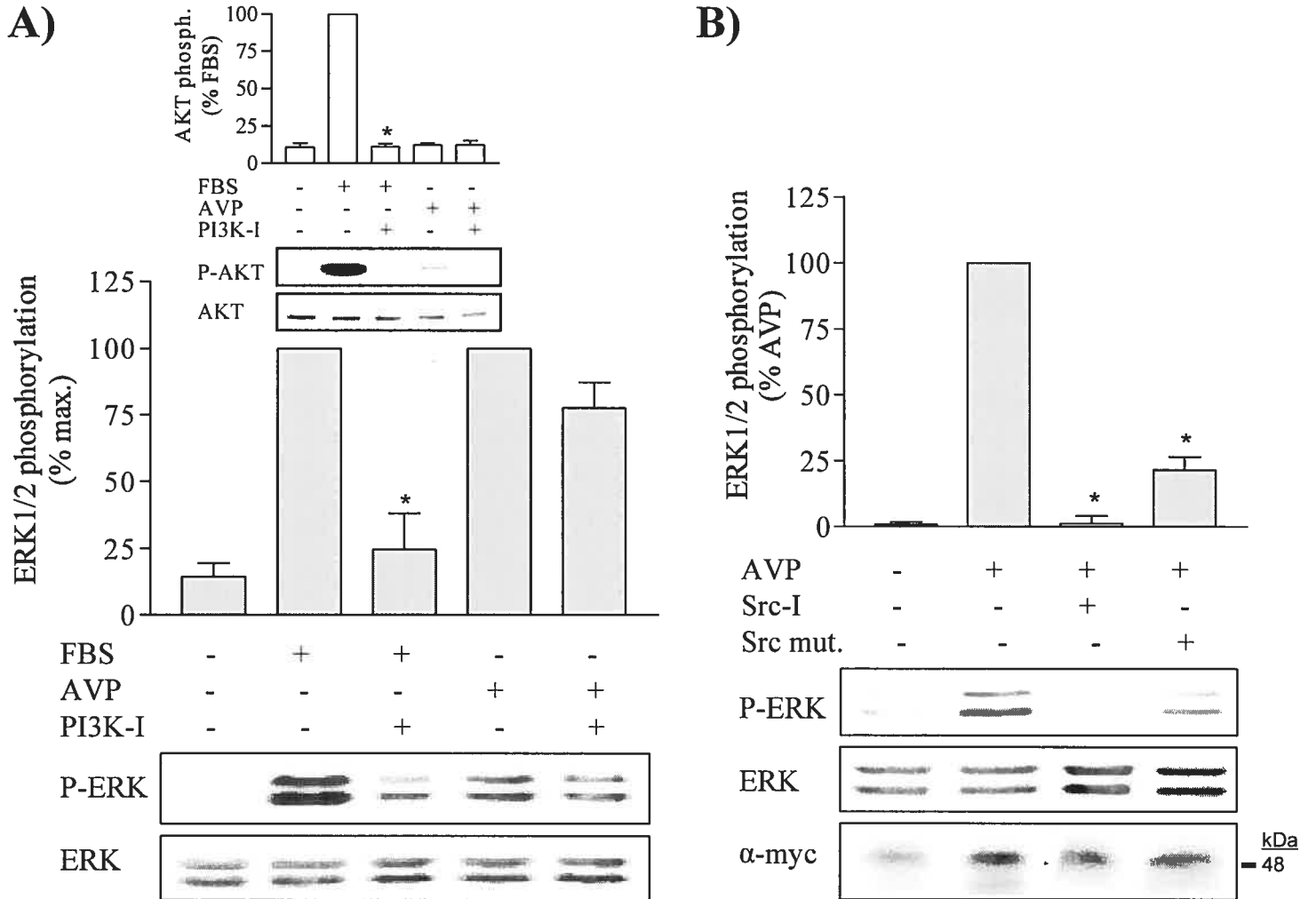


Fig. 5

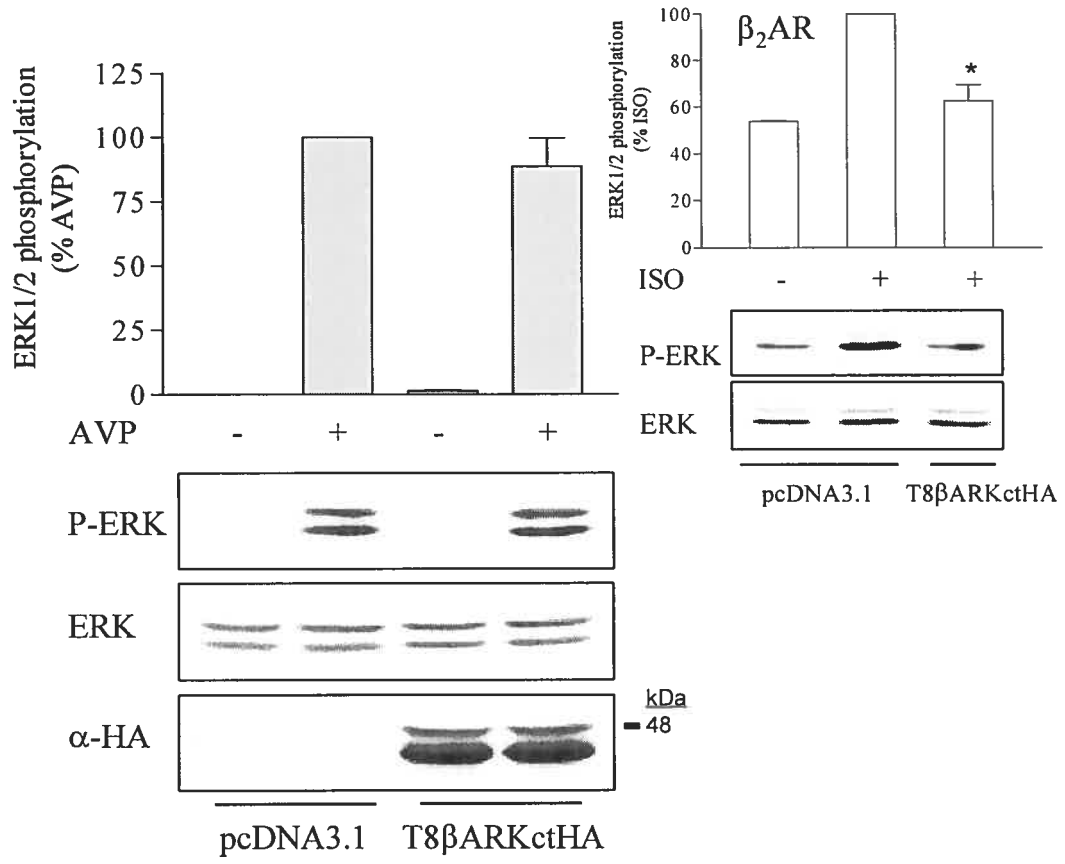


Fig. 6

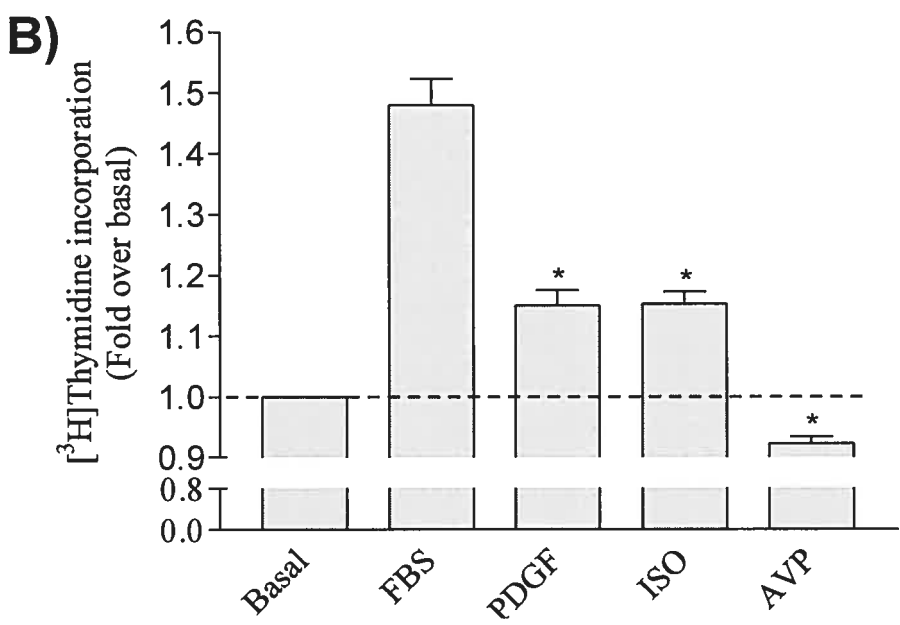
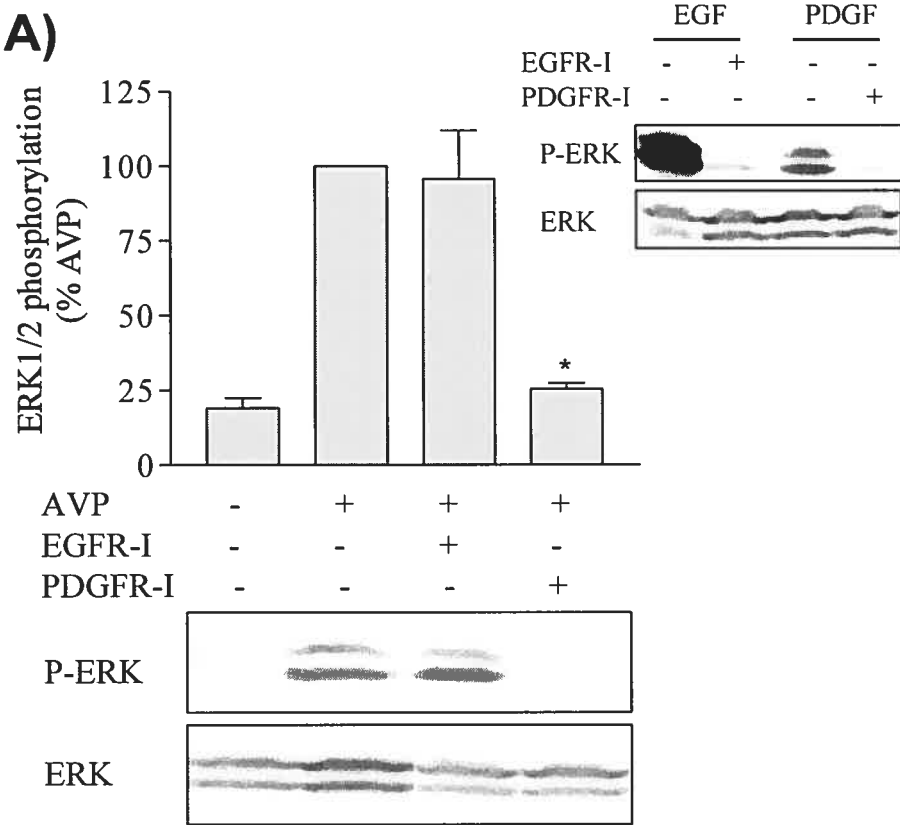
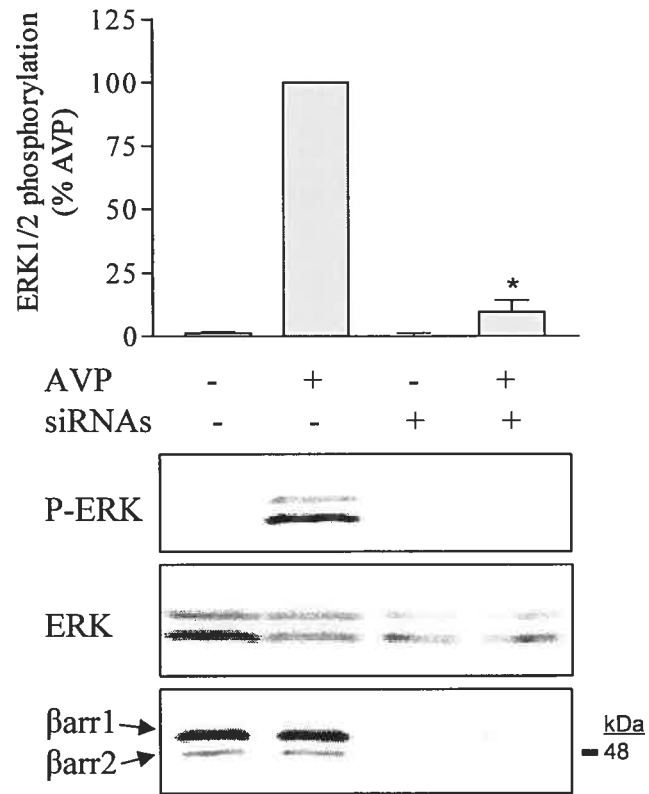


Fig. 7



## 2.4 Article 4

### **Monitoring agonist-promoted conformational changes of $\beta$ arrestin in living cells by intra-molecular BRET.**

**Pascale G Charest**, Sonia Terrillon et Michel Bouvier. *EMBO Rep.* 6:334-340 (2005).

La diversité des signaux intra-cellulaires engendrés par l'activation des RCPGs complique l'étude générale de l'activité de ces récepteurs. Toutefois, la découverte que la majorité des RCPGs subissent une désensibilisation homologue similaire impliquant  $\beta$ arrestine (Introduction section 1.3.1) (Krupnick and Benovic 1998) souleva la possibilité de développer un outil universel pour étudier l'activité des RCPGs, où le recrutement de  $\beta$ arrestine aux récepteurs activés représente une mesure potentielle de leur activation.

Le premier essai développé, permettant de détecter le recrutement de  $\beta$ arrestine, consiste à suivre la translocation de celle-ci en microscopie de fluorescence à l'aide d'une protéine de fusion, où  $\beta$ arrestine est conjuguée à la protéine fluorescente verte ( $\beta$ arrestine-GFP) (Barak et al. 1997). Plus récemment, un autre essai ne requérant pas d'analyse microscopique a été développé, basé sur la technologie de transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET) (Milligan 2004). En conjuguant les récepteurs au donneur d'énergie bioluminescente, la luciférase de *Rénilla* (Luc), et  $\beta$ arrestine à l'accepteur fluorescent, la protéine fluorescente jaune (YFP), le recrutement de  $\beta$ arrestine au récepteur de façon dépendante de l'agoniste a pu être mesuré dans un essai BRET (Angers et al. 2000). Plusieurs variations de cette technique ont par la suite été développées, incluant l'échange de YFP pour GFP comme accepteur fluorescent dans un essai BRET<sup>2</sup> (Bertrand et al. 2002; Heding 2004) ou l'utilisation de mutants de  $\beta$ arrestine avec des propriétés de liaison accrues (Vrecl et al. 2004). Toutefois, même si cette technique peut être appliquée à

des analyses de criblage à grande échelle, elle ne permet pas l'étude de RCPGs sauvages car elle exige l'expression de récepteurs chimériques.

La résolution de structures cristallines (Hirsch et al. 1999), couplée à des études de mutagenèse (Han et al. 2001; Vishnivetskiy et al. 1999; Vishnivetskiy et al. 2000; Vishnivetskiy et al. 2002; Gurevich and Benovic 1993) suggèrent qu'un important réarrangement conformationnel de la molécule d'arrestine accompagne sa transition vers l'état de haute affinité de liaison au récepteur (section 1.3.1.2). Ceci nous inspira l'invention d'un biosenseur intra-moléculaire basé sur le BRET, où  $\beta$ arrestine est prise en sandwich entre Luc et YFP, générant la protéine de fusion Luc- $\beta$ arrestine-YFP. Nous espérons ainsi que celle-ci nous permette à la fois de détecter et d'analyser les changements conformationnels intra-moléculaires de la molécule de  $\beta$ arrestine accompagnant son activation dans les cellules vivantes. Un tel biosenseur pourrait s'avérer utile dans l'étude de l'activité des RCPGs de façon générale, puisque son utilisation ne nécessiterait pas la modification des récepteurs comme c'est le cas dans les autres essais de recrutement de  $\beta$ arrestine en BRET.

Ma contribution à ces travaux est majeure (~70%) et consiste à une participation dans l'élaboration de l'hypothèse et de l'approche expérimentale, ainsi qu'à la réalisation des expériences, l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit.



# Monitoring agonist-promoted conformational changes of $\beta$ -arrestin in living cells by intramolecular BRET

Pascale G. Charest, Sonia Terrillon & Michel Bouvier<sup>+</sup>

Department of Biochemistry and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

**Recruitment of  $\beta$ -arrestin ( $\beta$ -arr) to agonist-stimulated G-protein-coupled receptors (GPCRs) has a crucial role in controlling signalling efficacy and selectivity. When translocated to the receptor,  $\beta$ -arr is believed to undergo important conformational rearrangement necessary for its downstream actions. To probe these changes in living cells, we constructed an intramolecular bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensor, in which  $\beta$ -arr is sandwiched between the *Renilla* luciferase (Luc) and the yellow fluorescent protein (YFP). We show that the intramolecular BRET between Luc and YFP was significantly increased following GPCR activation, suggesting a conformational rearrangement bringing the amino terminus and carboxyl terminus of  $\beta$ -arr in closer proximity. Kinetic analysis showed that this conformational change follows the initial  $\beta$ -arr/receptor engagement. In addition to providing new insights into the agonist-induced conformational rearrangements of  $\beta$ -arr in living cells, the double-brilliance  $\beta$ -arr offers a universal biosensor for GPCR activation, allowing the study of native receptors in large-scale screening analysis.**

Keywords: GPCR; BRET; biosensor; arrestin

EMBO reports (2005) 6, 334–340. doi:10.1038/sj.embor.7400373

## INTRODUCTION

G-protein-coupled receptors (GPCRs) relay the information provided by numerous hormones and neurotransmitters into intracellular signalling pathways, primarily through their coupling to heterotrimeric G proteins. Agonist stimulation of GPCRs also initiates their feedback desensitization, mostly mediated by GPCR kinases (GRKs) and  $\beta$ -arrestin ( $\beta$ -arr) proteins. Through their binding to GRK-phosphorylated receptors,  $\beta$ -arrestins prevent further coupling to G proteins and promote GPCR endocytosis, thus leading to decreased signalling efficacy. In addition to their role in

receptor desensitization,  $\beta$ -arrestins can act as scaffolds, linking GPCRs to mitogen-activated protein kinase signalling pathways (Luttrell & Lefkowitz, 2002). When considering their interaction with  $\beta$ -arrestins, GPCRs can be divided into two classes: class A receptors interact only transiently with  $\beta$ -arrestin and undergo efficient recycling when released from  $\beta$ -arrestin, whereas class B receptors stably associate with  $\beta$ -arrestin as a result of higher affinity, thus leading to the accumulation of intracellular receptor/ $\beta$ -arrestin complexes that prevent receptor recycling (Oakley *et al*, 2001).

Solved crystal structures (Hirsch *et al*, 1999; Han *et al*, 2001), mutagenesis (Vishnivetskiy *et al*, 2002) and limited tryptic proteolysis studies (Gurevich & Benovic, 1993; Xiao *et al*, 2004) suggest that a conformational rearrangement of the  $\beta$ -arrestin molecule accompanies its transition to the high-affinity receptor-binding state. It has been proposed that known intramolecular interactions between the amino- and carboxy-terminal domains in the inactive state are lost in the active  $\beta$ -arrestin, suggesting that the domains move relative to each other on activation. In this process, the C-tail seems to be released, thus exposing its clathrin- and adaptin 2 (AP2)-binding sites and promoting interactions with the internalization machinery (Lin *et al*, 1999, 2002; Gurevich & Gurevich, 2003).

To assess whether such agonist-promoted conformational changes of  $\beta$ -arrestin occur in living cells and to obtain further information on the relative positions of the C- and N-terminal domains during the activation process, we used an intramolecular bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensor consisting of a  $\beta$ -arrestin molecule sandwiched between the bioluminescent donor *Renilla* luciferase (Luc) and the yellow fluorescent protein (YFP). Using this double-brilliance  $\beta$ -arrestin biosensor (Luc- $\beta$ -arrestin-YFP), we show that  $\beta$ -arrestin undergoes important conformational rearrangement after agonist stimulation, where the N terminus and C terminus are brought in closer proximity. Comparison of the kinetics of  $\beta$ -arrestin recruitment to the receptors and its conformational change indicates that the latter follows the initial recruitment of  $\beta$ -arrestin to agonist-activated receptors. In addition to providing new insights into the structural rearrangements following  $\beta$ -arrestin activation in living cells, our study validates the use of double-brilliance  $\beta$ -arrestin as a general biosensor of GPCR activity.

Department of Biochemistry and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

<sup>+</sup>Corresponding author. Tel: +1 514 343 6372; Fax: +1 514 343 2210;

Received 30 November 2004; revised 7 February 2005; accepted 14 February 2005; published online 18 March 2005

## RESULTS AND DISCUSSION

### Double-brilliance $\beta$ -arr

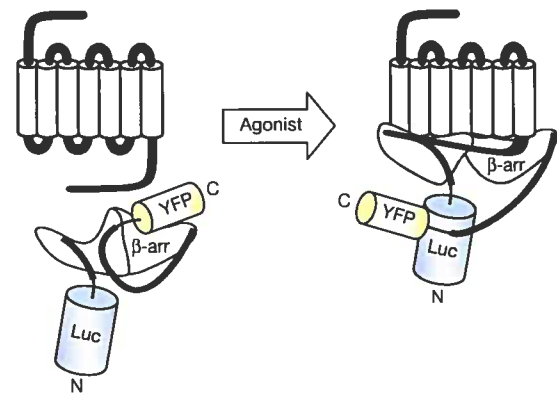
Inspired by previous reports of intramolecular fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors (Zhang *et al*, 2002), showing that resonance energy transfer (RET) is sensitive to changes in the relative positions of the donor and acceptor molecules, we assessed whether conformational changes of  $\beta$ -arr could be monitored using an intramolecular BRET approach. We engineered a double-brilliance  $\beta$ -arr, in which we fused Luc to the N terminus of  $\beta$ -arr2 and YFP to its C terminus, yielding Luc- $\beta$ -arr-YFP (Fig 1).

To test the functionality of Luc- $\beta$ -arr-YFP, we first assessed its ability to be recruited to agonist-stimulated class A  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR) and class B V2 vasopressin receptor (V2R) by fluorescence microscopy. As shown in Fig 2A, agonist stimulation led to rapid translocation of Luc- $\beta$ -arr-YFP to the plasma membrane, colocalizing with Myc-tagged  $\beta_2$ -AR and V2R (Myc- $\beta_2$ -AR; Myc-V2R). The patterns of Luc- $\beta$ -arr-YFP interaction were consistent with those observed for class A (transient  $\beta$ -arr interaction) and B (stable  $\beta$ -arr association) receptors in similar experiments using a  $\beta$ -arr-green fluorescent protein (GFP) conjugate (Oakley *et al*, 2000). Indeed, whereas Luc- $\beta$ -arr-YFP was recruited to both  $\beta_2$ -AR and V2R after 2 min of stimulation, it returned to the cytoplasm after 30 min in Myc- $\beta_2$ -AR-expressing cells but remained colocalized with Myc-V2R in endocytic vesicles. To quantitatively assess the recruitment of Luc- $\beta$ -arr-YFP to agonist-activated GPCRs, we used an intermolecular BRET<sup>2</sup> assay that takes advantage of the different spectral properties of Luc substrates that allow energy transfer to different fluorescent acceptors (Milligan, 2004). Luc- $\beta$ -arr-YFP was transiently co-expressed with the receptors, and the agonist-induced BRET<sup>2</sup> between Luc- $\beta$ -arr-YFP and either  $\beta_2$ -AR-GFP or V2R-GFP was measured in the presence of DeepBlueC<sup>TM</sup> coelenterazine, allowing transfer of energy to GFP. As shown in Fig 2, agonist stimulation promoted a time-dependent (Fig 2B) and dose-dependent (Fig 2C) increase in BRET<sup>2</sup>, reflecting the recruitment of Luc- $\beta$ -arr-YFP to the receptors. Similar kinetics and EC<sub>50</sub> were obtained for the recruitment of both Luc- $\beta$ -arr-GFP and Luc- $\beta$ -arr, indicating that double-brilliance  $\beta$ -arr is as efficiently recruited to the receptors as the singly conjugated construct. It should be noted that, although the maximum agonist-promoted BRET increase observed with the class A  $\beta_2$ -AR is less than that observed with class B V2R, the stability of the signals was similar, indicating that the signal observed with  $\beta_2$ -AR reflects a steady state corresponding to constant association and dissociation of  $\beta$ -arr from the activated receptors.

To assess the biological activity of Luc- $\beta$ -arr-YFP, we tested its capacity to promote receptor endocytosis in COS cells, which express low endogenous levels of  $\beta$ -arr. As shown in Fig 2D, agonist-promoted  $\beta_2$ -AR and V2R endocytosis was considerably increased when overexpressing Luc- $\beta$ -arr-YFP. Even though this increase in receptor endocytosis was not as pronounced as that obtained by the overexpression of wild-type (WT)  $\beta$ -arr, it suggests that Luc- $\beta$ -arr-YFP retains significant biological activity.

### Agonist-induced conformational changes of $\beta$ -arr

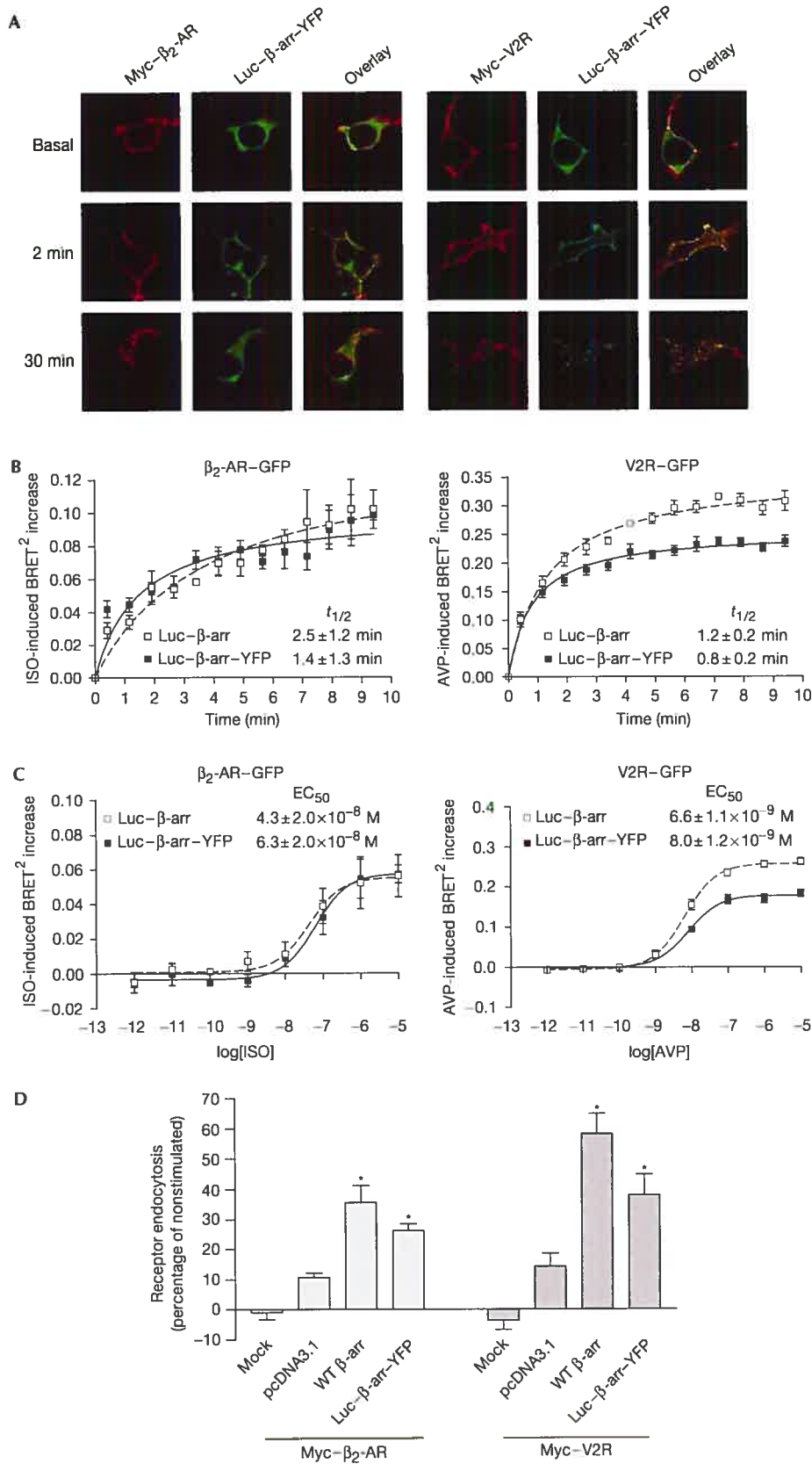
To assess whether Luc- $\beta$ -arr-YFP could be used to monitor the conformational rearrangement of  $\beta$ -arr, the construct was expressed with or without V2R, and BRET was measured in the

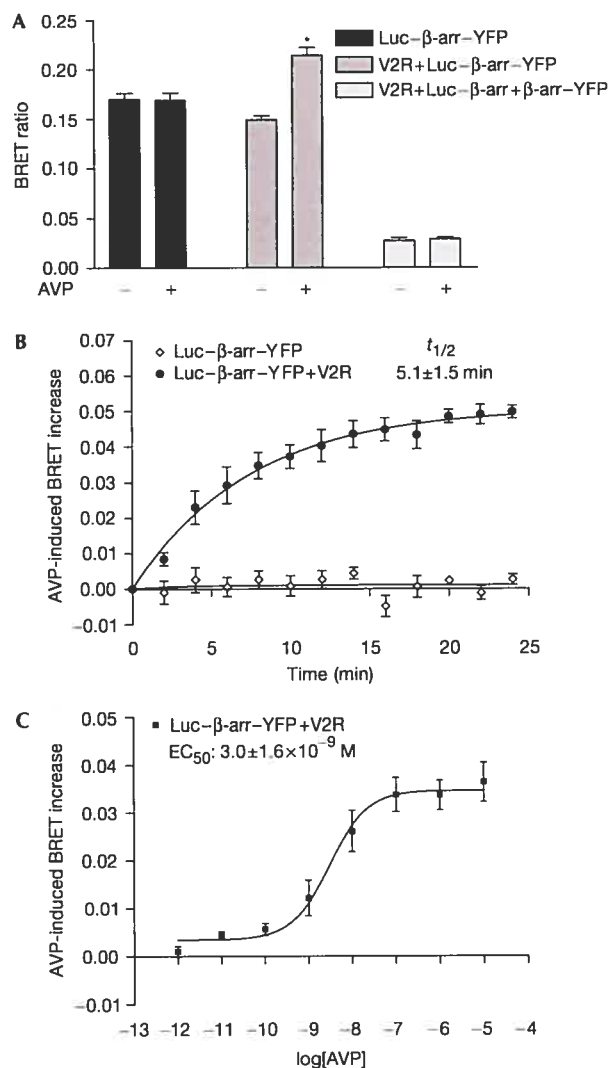


**Fig 1** Double-brilliance  $\beta$ -arr. Schematic diagram illustrating how agonist-promoted conformational rearrangement of  $\beta$ -arr can be measured as changes in BRET using double-brilliance  $\beta$ -arr. Luc and YFP are represented by cylinders proportional to their sizes, but their real orientation is unknown.

presence of coelenterazine h, allowing transfer of energy to YFP. As shown in Fig 3A, an important basal BRET signal could be measured in cells transfected with Luc- $\beta$ -arr-YFP, reflecting the proximity of the energy donor and acceptor in the construct. Arginine vasopressin (AVP) stimulation of cells coexpressing V2R led to a significant increase in BRET, suggesting movement of Luc and YFP relative to each other. To rule out the possibility that this increased signal results from intermolecular BRET between individual Luc- $\beta$ -arr-YFP molecules brought together through oligomerization (Hirsch *et al*, 1999) or clustering at the plasma membrane, we tested for the occurrence of BRET in cells transiently expressing Luc- $\beta$ -arr and  $\beta$ -arr-YFP. In transfection conditions leading to equivalent fluorescence and luminescence levels as those obtained in Luc- $\beta$ -arr-YFP-expressing cells, coexpression of Luc- $\beta$ -arr and  $\beta$ -arr-YFP led to the detection of only a marginal basal BRET that could not be modulated by V2R stimulation (Fig 3A). This observation therefore demonstrates that the AVP-induced increase in BRET signal observed in cells transfected with Luc- $\beta$ -arr-YFP results from a change in intramolecular BRET. As variations in RET can reflect changes in both the distance and orientation between the energy donor and acceptor molecules (Andrews & Demidov, 1999), the observed agonist-promoted increase in the Luc- $\beta$ -arr-YFP intramolecular BRET could indicate that the N terminus and C terminus are either brought closer or are in a more permissive BRET orientation following activation.

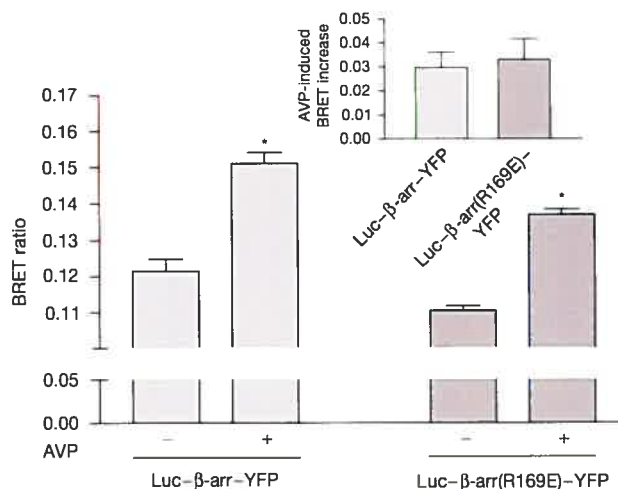
To further characterize the agonist-induced change in the conformation of  $\beta$ -arr, the kinetics and dose dependency of AVP-mediated BRET increase were assessed. Real-time BRET measurements show a time-dependent AVP-induced conformational change of  $\beta$ -arr, with half-time of maximal BRET increase ( $t_{1/2}$ ) of  $5.1 \pm 1.5$  min (Fig 3B). This kinetics is significantly slower ( $P < 0.02$ ) than that of the AVP-induced recruitment of  $\beta$ -arr ( $t_{1/2} = 0.8 \pm 0.2$  min; Fig 2B, right panel), suggesting that the conformational change observed in Luc- $\beta$ -arr-YFP occurs after its initial recruitment to the activated V2R. This difference in kinetics cannot result from inter-experimental variations because similar results were obtained when the two events were measured





**Fig 3** | AVP-induced conformational change of  $\beta$ -arr monitored by intramolecular BRET. HEK293 cells were transfected with the indicated plasmids and BRET was measured at 25 °C in the presence of coelenterazine h. (A) Specificity of agonist-induced  $\beta$ -arr intramolecular BRET. (B) Real-time BRET measurements of the agonist-induced  $\beta$ -arr conformational change.  $t_{1/2}$  = half-time of maximal conformational change of  $\beta$ -arr. (C) Dose-dependent agonist-promoted increase of  $\beta$ -arr intramolecular BRET. Cells were stimulated with increasing concentrations of AVP for 4 min.  $\text{EC}_{50}$  = concentration of AVP producing half-maximal conformational change of  $\beta$ -arr. Data are the mean  $\pm$  s.e.m. of at least three independent experiments. \* $P < 0.01$  between treated and control condition.

**Fig 2** | Functionality of double-brilliance  $\beta$ -arr. HEK293 (A–C) or COS (D) cells were transiently transfected with the indicated plasmids. (A) Cells incubated or not in the presence of saturating concentrations of specific agonists ( $\beta_2$ -AR, 10  $\mu\text{M}$  isoproterenol (ISO); V2R, 1  $\mu\text{M}$  arginine vasopressin (AVP)). Localization of Luc- $\beta$ -arr-YFP and Myc-tagged receptors was analysed by confocal fluorescence microscopy. (B) Agonist-induced recruitment of  $\beta$ -arr measured using BRET<sup>2</sup>.  $t_{1/2}$  = half-time of maximal  $\beta$ -arr recruitment. (C) Dose-dependent recruitment of  $\beta$ -arr to the receptors measured in BRET<sup>2</sup> following 2 min stimulation with the agonist.  $\text{EC}_{50}$  = concentration of agonist producing half-maximal  $\beta$ -arr recruitment. (D) Cells treated or not for 15 min with the specific agonists at 37 °C and cell-surface receptor levels measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Receptor endocytosis is defined as the loss of cell-surface immunoreactivity and is expressed as a percentage of total immunoreactivity measured under basal conditions. Expression levels of  $\beta$ -arr were controlled using western blot (data not shown). Data are the mean  $\pm$  s.e.m. of at least three independent experiments. \* $P < 0.05$  between treatment and each individual control condition. Mock, nontransfected cells.



**Fig 4** | Agonist-promoted conformational change of  $\beta$ -arr is independent of receptor phosphorylation. HEK293 cells were transfected with V2R and either Luc- $\beta$ -arr-YFP or Luc- $\beta$ -arr(R169E)-YFP. Cells were stimulated or not for 10 min in the presence of 1  $\mu\text{M}$  AVP. Inset: AVP-induced BRET increase. Data are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. \* $P < 0.02$  between treatment and each individual control condition.

in the same cell population expressing V2R-GFP and Luc- $\beta$ -arr-YFP (data not shown). Despite the difference in kinetics, the efficacy of AVP to induce a conformational change in Luc- $\beta$ -arr-YFP (Fig 3C) was similar to that observed for  $\beta$ -arr recruitment (Fig 2C, right panel), indicating that these two events are directly linked and reflect the binding affinity of V2R for AVP ( $K_D \sim 1 \times 10^{-9}$  M).

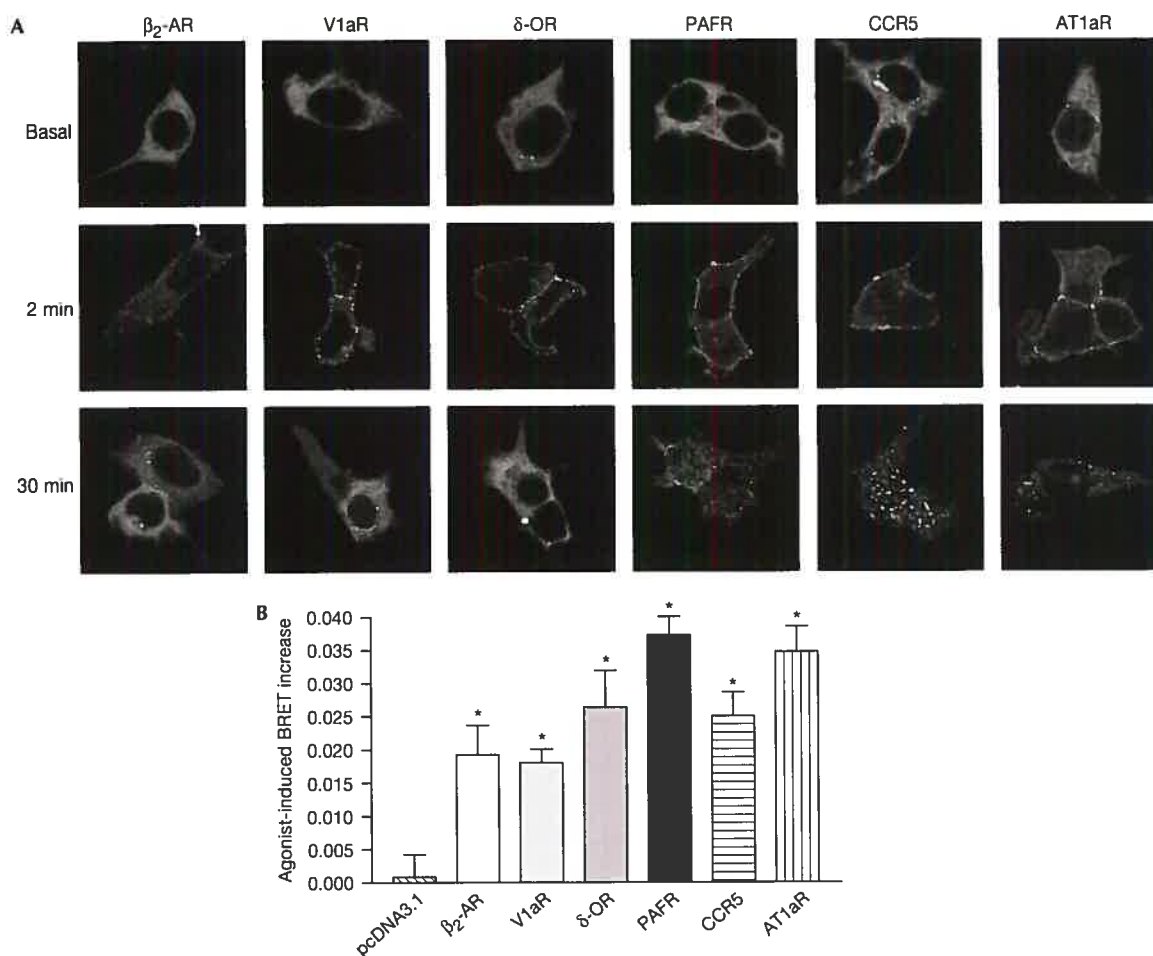
The observed kinetic lag between  $\beta$ -arr recruitment and its conformational change could be consistent with the proposal that inactive  $\beta$ -arr is first recruited to the activated GPCR where its interaction with the GRK-phosphorylated residues subsequently induces the release of its C-tail (Gurevich & Gurevich, 2003). Alternatively, such a lag could indicate that the intramolecular BRET changes observed with Luc- $\beta$ -arr-YFP result from the subsequent recruitment of  $\beta$ -arr-interacting proteins (e.g. clathrin and AP2 or signalling proteins such as c-Src, Raf1, ERK1/2, ASK1 and JNK3) to the receptor-bound  $\beta$ -arr (Lefkowitz & Whalen, 2004) rather than from the conformational change induced by receptor binding. To distinguish between these two possibilities, we tested the agonist-promoted conformational changes of a  $\beta$ -arr(R169E) mutant shown to bind to GPCRs in a phosphorylation-independent manner, probably as a result of a constitutively open conformation (Kovoor et al, 1999). As shown in Fig 4, both the basal and AVP-stimulated BRET signals

observed for the Luc- $\beta$ -arr-YFP phosphate-insensitive mutant (Luc- $\beta$ -arr(R169E)-YFP) were similar to those observed with WT Luc- $\beta$ -arr-YFP, ruling out the hypothesis that the observed conformational rearrangement of  $\beta$ -arr results from binding to phosphorylated residues on V2R. It follows that the agonist-promoted BRET increase in Luc- $\beta$ -arr-YFP probably represents conformational changes promoted by the binding of  $\beta$ -arr-interacting proteins that follows activation.

### A general biosensor to monitor GPCR activity

To assess whether Luc- $\beta$ -arr-YFP could be used as a general GPCR activity sensor, we tested whether its agonist-induced conformational change could be promoted by other receptors, particularly those of class A, which are believed to interact only transiently with  $\beta$ -arr. Recruitment of Luc- $\beta$ -arr-YFP and agonist-promoted intramolecular BRET were assessed in cells coexpressing different receptors of class A ( $\beta_2$ -AR, V1 vasopressin receptor (V1aR),  $\delta$ -opioid receptor ( $\delta$ -OR)) and class B (platelet-activating

factor receptor (PAFR), CC chemokine receptor type 5 (CCR5), angiotensin receptor type 1a (AT1aR)). As shown in Fig 5A, agonist stimulation efficiently induced the recruitment of Luc- $\beta$ -arr-YFP to the plasma membrane, with the expected interaction patterns for all class A (transient) and class B (stable) receptors. In all cases, activation of Luc- $\beta$ -arr-YFP mediated by class A and B receptors was accompanied by a significant increase in BRET (Fig 5B). Interestingly, although the kinetics and stability of the BRET increase were found to be similar for receptors of class A and B (data not shown), we observed a tendency of class A receptors to induce smaller BRET increases. As previously noted when comparing the BRET-detected recruitment of  $\beta$ -arr to class A  $\beta_2$ -AR and class B V2R (Fig 2B), this probably indicates that the BRET assays provide a steady-state signal reflecting continuous rounds of association-dissociation cycles. In any case, these results suggest that Luc- $\beta$ -arr-YFP can be used as a general biosensor to monitor GPCR activity. When compared with the intermolecular BRET-based  $\beta$ -arr recruitment assays (Angers *et al*,



**Fig 5** | Double-brilliance  $\beta$ -arr monitors GPCR activation. HEK293 cells were transfected with Luc- $\beta$ -arr-YFP and either pcDNA3.1 or plasmids encoding the indicated receptors. (A) Agonist-induced translocation of Luc- $\beta$ -arr-YFP measured following treatment with 1  $\mu$ M of the specific agonists ( $\beta_2$ -AR, ISO; V1aR, AVP;  $\delta$ -OR, SNC80; PAFR, PAF; CCR5, hRANTES; AT1aR, angiotensin II). (B) Agonist-induced conformational change of Luc- $\beta$ -arr-YFP measured following 10 min stimulation with the specific agonists mentioned in (A). Data are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. \* $P$  < 0.05 between treatment and each individual control condition.

2000; Bertrand *et al*, 2002), double-brilliance  $\beta$ -arr avoids the difficulty of expressing the appropriate ratio of energy donor and acceptor constructs and allows the study of unmodified GPCRs.

In summary, we report for the first time, to our knowledge, the real-time monitoring of agonist-promoted conformational changes of  $\beta$ -arr in living cells using a double-brilliance  $\beta$ -arr intramolecular BRET-based biosensor. This conformational rearrangement of the  $\beta$ -arr molecule reflects its transition from an inactive state to a biologically active state that follows its initial recruitment to activated GPCRs and involves the relative movement of the C-tail of  $\beta$ -arr towards its N terminus (Fig 1). As most GPCRs recruit  $\beta$ -arr in an agonist-dependent fashion, double-brilliance  $\beta$ -arr could represent a general tool to probe receptor activity that could be used advantageously in large-scale screening campaigns aimed at identifying GPCR ligands. In conclusion, double-brilliance  $\beta$ -arr represents the first intramolecular BRET-based biosensor that allows the monitoring of protein conformational changes. This should lead the way to the development of similar tools to study other proteins believed to undergo significant conformational rearrangement linked to their function.

## METHODS

**Expression vectors.** Plasmids encoding Flag-AT1aR, CCR5 (Pleskoff *et al*, 1997) and Myc-PAFR (Marrache *et al*, 2002) were generously provided by S. Meloche, N. Heveker and S. Chemtob, respectively (Université de Montréal, Québec, Canada), and WT  $\beta$ -arr2 was a generous gift from S. Marullo (Institut Cochin, Paris). Myc-V2R and HA-V1aR (Terrillon *et al*, 2003), Myc- $\beta_2$ -AR (Hebert *et al*, 1996), Myc- $\delta$ -OR (Petaja-Repo *et al*, 2002), V2R-GFP (Charest & Bouvier, 2003),  $\beta_2$ -AR-GFP (Mercier *et al*, 2002),  $\beta$ -arr2-YFP (Angers *et al*, 2000) and Luc- $\beta$ -arr2 (Perroy *et al*, 2003) have been described previously. Luc- $\beta$ -arr-YFP was generated by subcloning the coding sequence of enhanced YFP in-frame at the C terminus of  $\beta$ -arr2 in pcDNA3.1-Luc- $\beta$ -arr2, yielding Luc- $\beta$ -arr-YFP with flexible spacers of 23 aa between Luc and  $\beta$ -arr, and 10 aa between  $\beta$ -arr and YFP. Mutation of arginine 169 into glutamate in Luc- $\beta$ -arr(R169E)-YFP was generated by PCR site-directed mutagenesis using Luc- $\beta$ -arr-YFP.

**Cell culture.** Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells and simian kidney fibroblast (COS) cells were maintained as described previously (Charest & Bouvier, 2003). Cells were transfected with the indicated plasmids using the calcium phosphate precipitation method (Sambrook *et al*, 1989) or the FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science, Laval, Canada) according to the manufacturer's protocol. The experiments were performed 48 h after transfection.

**Fluorescence microscopy.** To detect Myc- $\beta_2$ -AR and Myc-V2R, cells were incubated with anti-Myc 9E10 monoclonal antibody (ascite fluid from our core facility) for 1 h at 4 °C and then treated with the appropriate agonist (Sigma, Oakville, Canada) for 2 or 30 min at 37 °C. Cells were then fixed and permeabilized before adding Texas-red-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). The samples were analysed by confocal laser-scanning microscopy using a Leica TCS SP1. Measurements were as follows: YFP (green),  $\lambda_{ex}$  = 488 nm,  $\lambda_{em}$  = 540/25 nm; Texas red (red),  $\lambda_{ex}$  = 568 nm,  $\lambda_{em}$  = 610/30 nm.

**BRET assays.** Assessment of  $\beta$ -arr recruitment in BRET was performed as described previously (Charest & Bouvier, 2003). Briefly, cells were distributed in 96-well microplates (Corning,

Corning, USA) and incubated with or without agonist for the indicated time at 25 °C. The appropriate Luc substrate was added to a final concentration of 5  $\mu$ M, either simultaneously with the agonist (time course) or following agonist treatment (single measurement or dose dependency), and readings were collected using a Multilabel Reader Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). To detect BRET between Luc and YFP, coelenterazine h (Molecular Probes, Burlington, Canada) was used as substrate and light emission was detected at 460–500 nm (Luc) and 510–550 nm (YFP), whereas for BRET<sup>2</sup> detection (Luc and GFP), DeepBlueC<sup>TM</sup> coelenterazine (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) and filters at 330–470 nm (Luc) and 495–535 nm (GFP<sup>2</sup>) were used. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by the fluorescent acceptor and the light emitted by Luc. The values were corrected by subtracting the background BRET signals detected when Luc- $\beta$ -arr was expressed alone. Expression levels of the different receptors transfected were verified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Charest & Bouvier, 2003).

**Receptor endocytosis assay.** Receptor endocytosis was measured by ELISA as described previously (Charest & Bouvier, 2003).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr M. Lagacé for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research and the Quebec Heart and Stroke Foundation (HSF). P.G.C. was supported by doctoral fellowships from the HSF of Canada and the Fonds de Recherche en Santé du Québec. M.B. holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

## REFERENCES

- Andrews DL, Demidov AA (1999) *Resonance Energy Transfer*. Chichester, UK: Wiley
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilaiiret S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M (2000) Detection of  $\beta_2$ -adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3684–3689
- Bertrand L, Parent S, Caron M, Legault M, Joly E, Angers S, Bouvier M, Brown M, Houle B, Menard L (2002) The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRs). *J Receptor Signal Transduction Res* **22**: 533–541
- Charest PG, Bouvier M (2003) Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances  $\beta$ -arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **278**: 41541–41551
- Gurevich VV, Benovic JL (1993) Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* **268**: 11628–11638
- Gurevich VV, Gurevich EV (2003) The new face of active receptor bound arrestin attracts new partners. *Structure (Camb)* **11**: 1037–1042
- Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C (2001) Crystal structure of  $\beta$ -arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation. *Structure (Camb)* **9**: 869–880
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M (1996) A peptide derived from a  $\beta_2$ -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**: 16384–16392
- Hirsch JA, Schubert C, Gurevich VV, Sigler PB (1999) The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* **97**: 257–269
- Kovoor A, Cveler J, Abdryashitov RI, Chavkin C, Gurevich VV (1999) Targeted construction of phosphorylation-independent  $\beta$ -arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J Biol Chem* **274**: 6831–6834
- Lefkowitz RJ, Whalen EJ (2004)  $\beta$ -Arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 162–168

- Lin FT, Miller WE, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1999) Feedback regulation of  $\beta$ -arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **274**: 15971–15974
- Lin FT, Chen W, Shenoy S, Cong M, Exum ST, Lefkowitz RJ (2002) Phosphorylation of  $\beta$ -arrestin2 regulates its function in internalization of  $\beta$ (2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* **41**: 10692–10699
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**: 455–465
- Marrache AM et al (2002) Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* **169**: 6474–6481
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M (2002) Quantitative assessment of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277**: 44925–44931
- Milligan G (2004) Applications of bioluminescence- and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. *Eur J Pharm Sci* **21**: 397–405
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ -arrestin1, and  $\beta$ -arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**: 17201–17210
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor- $\beta$ -arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**: 19452–19460
- Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S, Bouvier M (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* **22**: 3816–3824
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Bhalla S, Laperriere A, Morello JP, Bouvier M (2002) Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of  $\delta$ -opioid receptor maturation. *EMBO J* **21**: 1628–1637
- Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M (1997) Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* **276**: 1874–1878
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M (2003) Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* **17**: 677–691
- Vishnivetskiy SA, Hirsch JA, Velez MG, Gurevich YV, Gurevich VV (2002) Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J Biol Chem* **277**: 43961–43967
- Xiao K, Shenoy SK, Nobles K, Lefkowitz RJ (2004) Activation dependent conformational changes in  $\beta$ -arrestin 2. *J Biol Chem* **279**: 55744–55753
- Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 906–918

### 3. DISCUSSION

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont contribué de façon significative à améliorer notre compréhension de la régulation des MAPKs ERK1/2 par les RCPGs, mettant notamment en évidence le rôle de la protéine adaptatrice  $\beta$ arrestine dans cette voie de signalisation. Tout d'abord, l'étude de l'activation des MAPKs par des ligands d'efficacités distinctes envers l'activité adénylyl cyclase stimulée par les récepteurs  $\beta_2$ AR et V2R a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs conformations actives des RCPGs, et que celles-ci peuvent être sélectivement régulées par des ligands aux doubles efficacités, menant à l'activation différentielle des voies de signalisation couplées à ces récepteurs (*article 1*). Ainsi, alors que l'activation des récepteurs  $\beta_2$ AR et V2R par leur agoniste respectif induit une forte stimulation de les activités adénylyl cyclase et ERK1/2, leur stimulation par des agonistes inverses inhibe leur couplage à Gs et, par conséquent, l'activité adénylyl cyclase, mais induisent l'activation partielle des MAPKs de façon dépendante de  $\beta$ arrestine.

Ensuite, en recherchant le rôle de la palmytylation des RCPGs comme mécanisme moléculaire potentiellement impliqué dans la régulation de la signalisation induite par ces récepteurs, nos travaux ont mis en évidence l'importance de la palmytylation du V2R sur son interaction avec  $\beta$ arrestine (*article 2*). Cette modification post-traductionnelle lipidique semble en effet favoriser le recrutement de  $\beta$ arrestine au V2R induite par l'AVP, menant ensuite à l'endocytose du récepteur et à la stimulation de l'activité ERK1/2 de façon efficace. L'étude de la cascade signalétique menant à l'activation d'ERK1/2 par le V2R a alors permis de mettre davantage en évidence le rôle joué par  $\beta$ arrestine dans cette voie de signalisation, qui s'avéra complètement indépendante des protéines G hétéro-trimériques (*article 3*).

Enfin, le nombre grandissant d'études rapportant l'importance de  $\beta$ arrestine dans la régulation et la fonction des RCPGs nous incita l'étude de l'activation de la protéine



adaptatrice, menant au développement du premier biosenseur intra-moléculaire basé sur le BRET, la  $\beta$ arrestine double brillance (*article 4*). Celle-ci nous a permis de mettre en évidence la présence d'un changement conformationnel important dans la molécule de  $\beta$ arrestine survenant suite à la stimulation des RCPGs. Par conséquent, puisque la majorité des RCPGs stimulés par des agonistes semblent recruter et activer  $\beta$ arrestine,  $\beta$ arrestine double brillance représente un outil potentiel pour l'étude générale de l'activité des RCPGs.

### **3.1 Fonction des RCPGs et spécificité conformationnelle**

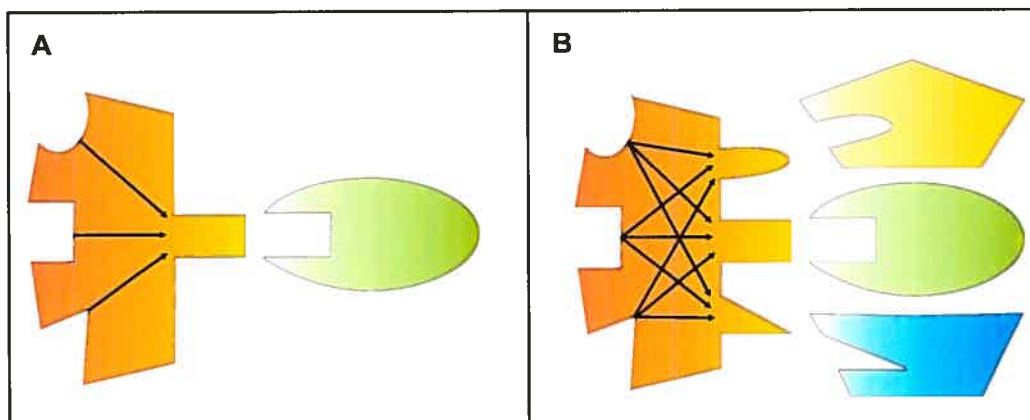
#### **3.1.1 Multiplicité des états conformationnels des RCPGs et régulation par le ligand**

La découverte que certains ligands des RCPGs qui sont agonistes inverses envers l'activité adénylyl cyclase stimulée par Gs ont des efficacités d'agonistes partiels sur la voie MAPK dépendante de  $\beta$ arrestine démontre l'existence de différentes conformations actives des récepteurs (*article 1*). En effet, contrairement à la vision classique proposant une unique conformation active responsable de toutes les activités des RCPGs dans la cellule, ces résultats supportent davantage le concept émergeant, suggérant que différentes conformations actives peuvent être stabilisées par différents ligands (Ghanouni et al. 2001; Kenakin 2003), et que certaines de ces conformations peuvent favoriser l'activation d'un effecteur par rapport à un autre (Lowe et al. 1998), ou induire un recrutement différentiel de  $\beta$ arrestine (Zhang et al. 1998; Whistler and Von Zastrow 1998) (Figure 22). Ainsi, dans l'exemple des systèmes du  $\beta_2$ AR et du V2R, les agonistes complets, isoprotérénol et AVP respectivement, stabilisent un état de récepteur capable d'activer Gs et de promouvoir le recrutement de  $\beta$ arrestine, alors que la conformation stabilisé par les agoniste inverse, ICI118551 et SR121463, inhibe le couplage à la protéine G mais favorise l'interaction du récepteur avec  $\beta$ arrestine.

L'idée que même des agonistes puissent stabiliser différents états actifs du récepteur, menant ensuite à une stimulation sélective des voies activées par les protéines G hétéro-trimériques, avait en fait été proposée sur des fondements théoriques suite à des observations expérimentales inconsistantes avec le concept d'un seul état actif du récepteur. Par exemple, l'agoniste étorphine du récepteur delta opioïde humain stimule l'activation de Gi1, Gi2 et Gi3 alors que les agonistes DPDPE et deltorphine-1 activent principalement Gi2 et Go2 (Allouche et al. 1999). De plus, les agonistes protéans, où des ligands fonctionnent comme des agonistes partiels dans certains systèmes réceptoriels et agonistes inverses pour le même récepteur dans des systèmes constitutivement actifs, ne peuvent pas être expliqués par un seul état actif (Kenakin 1997). Ainsi, l'idée générale que des conformations sélectives du récepteur puissent être détectées par le fait qu'un agoniste présente différentes puissances relatives s'est vu attribué le nom de « trafic de stimulus » (Kenakin 1995).

Comme démontré par nos travaux, alors que les protéines G hétéro-trimériques peuvent être des indicateurs sensibles permettant la détection des différences entre les états actifs de récepteur, différentes conformations induites par le ligand ont aussi la possibilité d'être détectées d'autres façons, notamment par l'interaction du récepteur avec  $\beta$ arrestine. En effet, plusieurs efficacités peuvent être associées aux molécules au-delà du paradigme de la réponse physiologique effectuée par l'intermédiaire des protéines G hétéro-trimériques. Entre autres, les ligands peuvent induire la dimérisation des récepteurs (ou la formation de plus grands oligomères), leur phosphorylation, leur internalisation, leur désensibilisation, ainsi que leur interaction avec un nombre grandissant d'autres partenaires protéiques (voir section 1.4 de l'Introduction) (Bockaert et al. 2004). Ces effets, comme le démontre l'activation des MAPKs dépendante de  $\beta$ arrestine induite par des agonistes inverses, peuvent même être dissociés de l'activation des protéines G hétéro-trimériques. Une telle dissociation de l'efficacité peut alors être reliée à différentes conformations de

récepteur, et la capacité des molécules à séparer les effets peut être associée avec leur capacité à stabiliser ces différentes conformations (Kenakin 2003).



**Figure 22. Schéma représentant deux modèles d'activation des RCPGs.**

Adapté de (Kenakin 2003).

A) Modèle d'interrupteur « on-off ». Le récepteur a la capacité de reconnaître multiples ligands, mais une fois lié, celui-ci est une unité d'activation uniforme (un seul état actif) qui promeut toutes les activités du RCPG dans la cellule. B) Modèle à multiples états. Le récepteur a une capacité de reconnaissance bipolaire, où la liaison d'un ligand à un site de reconnaissance (extra-cellulaire) gouverne sa capacité d'interaction à un autre site (intra-cellulaire). Cette capacité de signalisation est plus versatile et complexe.

La démonstration de conformations de récepteur spécifiques au ligand introduit le concept de texture des effets de drogues, où l'efficacité des ligands est qualitative en plus d'être quantitative. Une telle efficacité repousse les propriétés de ligands au-delà de la signalisation par les protéines G hétéro-trimériques et promet un agonisme, et même un antagonisme, plus sélectif. La sélectivité des conformations de récepteur par le ligand ouvre ainsi la possibilité de concevoir des médicaments modifiant seulement certains aspects du comportement d'un récepteur donné. Auparavant, la sélectivité reposait sur la découverte de sous-types de récepteurs. Par contre, la sélectivité du ligand basée sur les conformations

de récepteurs ouvre la possibilité d'exploiter également les différents phénotypes du récepteur. En effet, dans le processus de recherche de médicaments pour des nouveaux agonistes, la cible chimique est souvent un agoniste substitué au profil partiel. Par exemple, pour le traitement de l'asthme, les propriétés broncho-dilatatrices des agonistes  $\beta$ -adrénergiques auraient besoin d'être séparées de leurs propriétés stimulatrices cardiaques (Salpeter 2004).

Parallèlement, des effets inexplicables d'antagonistes des RCPGs, en particulier des  $\beta$ -bloqueurs, pourraient éventuellement trouver leur explication dans la sélectivité phénotypique. Étant donné le rôle joué par ERK1/2 dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et l'utilisation répandue d'antagonistes ou d'agonistes inverses du  $\beta_2$ AR dans le traitement de l'hypertension et de la défaillance cardiaque, les propriétés agonistes de ces composés sur la voie ERK1/2 pourraient, en effet, avoir des implications cliniques importantes. De plus, une étude récente recherchant le mécanisme d'action des  $\beta$ -bloqueurs, effectuée avec un modèle de souris transgénique ainsi que sur des myocytes adultes, suggère que divers agents bloquant le couplage du  $\beta_2$ AR à Gs peuvent être agonistes sur la forme du récepteur couplé à Gi (Harding and Gong 2004). Les auteurs suggèrent alors que l'effet négatif des  $\beta$ -bloqueurs sur le couplage  $\beta_2$ AR/Gs pourrait contribuer à la cardiodépression initiale observée lors de l'introduction de ces agents aux patients souffrant de défaillance cardiaque, mais à long terme, le couplage  $\beta_2$ AR/Gi pourrait augmenter la capacité des  $\beta$ -bloqueurs à protéger et améliorer la fonction du cœur défaillant. Même si, dans cette étude, le recrutement de  $\beta$ arrestine et l'activation d'ERK1/2 n'ont pas été étudiés, le couplage différentiel du  $\beta_2$ AR induit par les  $\beta$ -bloqueurs suggère que l'efficacité sélective du ligand mise en évidence par nos travaux peut être extrapolée aux systèmes *in vivo*.

De façon intéressante, des antagonistes non peptidiques du V2R, lorsque utilisés comme chaperons pharmacologiques, mènent au sauvetage fonctionnel partiel de récepteurs mutants causant le NDI (Morello et al. 2000). Comme mentionné dans l'Introduction

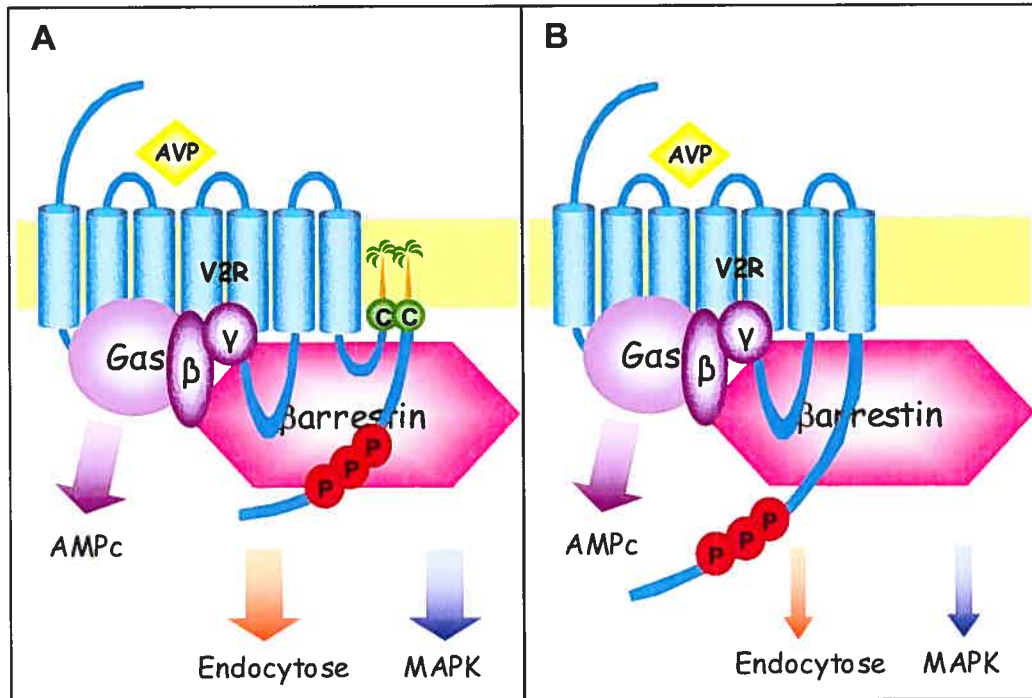
(section 1.7.1.1), la majorité de ces V2Rs mutants ne sont pas transportés à la membrane plasmique et sont retenus dans des compartiments intra-cellulaires (Morello and Bichet 2001). Il a été suggéré qu'en pénétrant la cellule et en liant les V2Rs mutants repliés incorrectement, les antagonistes non peptidiques agissent en chaperons pharmacologiques, stabilisant les récepteurs dans une conformation permettant sa relâche de l'appareil de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Le récepteur stabilisé serait alors acheminé à la surface cellulaire où, suite à la dissociation de l'antagoniste, il pourrait lier l'AVP et promouvoir la transduction du signal. Il a même été observée que l'administration d'un antagoniste non peptidique du V2R, le SR49059, à des patients atteints du NDI dû à la rétention intra-cellulaires de V2Rs mutants, améliore significativement la condition des sujets, menant à une réduction du volume et une augmentation d'osmolalité urinaire (Morello et al. observations non publiées).

Hors, le sauvetage partiel du phénotype NDI par l'antagoniste non peptidique dans ces études pourrait être dû, en partie, à des propriétés agonistes du ligand envers la voie MAPK couplé au V2R, comme nous avons montré pour le SR121463; au lieu de représenter uniquement la liaison d'AVP au V2R suivant la dissociation de l'antagoniste, possédant une affinité relativement élevée pour le V2R, une fois le récepteur acheminé à la membrane plasmique. En effet, même si le rôle physiologique de l'activation d'ERK1/2 par le V2R n'est pas connu et que la translocation rapide d'aquaporine-2 à la membrane plasmique est dépendante de la voie Gs-cAMP-PKA (Kuwahara et al. 1995), cela n'exclue pas la possibilité que les MAPKs soient impliquées dans le contrôle de la perméabilité à l'eau et la concentration de l'urine. En effet, celles-ci pourraient être impliquées dans d'autres aspects du contrôle du volume urinaire par le V2R, comme la régulation de l'expression des aquaporines à long terme (Terris et al. 1996), de la translocation ou de l'expression des transporteurs d'urées UT1 (Shayakul et al. 1996), ou de la perméabilité du tube collecteur au sodium (Inoue et al. 2001).

### 3.1.2 Palmitoylation des RCPGs et régulation intra-cellulaire de la conformation des récepteurs

Ainsi, via leur liaison aux domaines extra-cellulaires ou trans-membranaires des récepteurs, des ligands de natures distinctes semblent pouvoir stabiliser différentes conformations et réguler ainsi la fonction des RCPGs de façon sélective. Hors, des facteurs intra-cellulaires, notamment les modifications post-traductionnelles, peuvent également influencer la conformation des RCPGs et contribuer ainsi à la régulation de leur fonction. Entre autres, la phosphorylation des récepteurs peut, en plus de réguler directement leurs interactions protéine-protéine, moduler la fonction des RCPGs en induisant des changements de conformations. Par exemple, la phosphorylation du  $\beta_2$ AR par PKA induit un changement dans la conformation active du récepteur qui passe d'une faible à une haute affinité pour  $G_i$  alors qu'elle est découplée de  $G_s$  (Daaka et al. 1997).

De plus, nos travaux sur la palmitoylation du V2R démontrent que cette modification lipidique peut également réguler la fonction des RCPGs de façon différentielle (*article 2*). En effet, la palmitoylation du V2R semble favoriser l'interaction du récepteur avec  $\beta$ arrestine et, par conséquent, son endocytose ainsi que l'activation d'ERK1/2, sans affecter le couplage du récepteur à  $G_s$  et sa stimulation de l'activité adénylyl cyclase (Figure 23). Étant donné la proximité du groupement de sérines phosphorylées par les GRKs en aval des cystéines 341 et 342 palmitylées (Introduction, Figure 20) dans la queue C-terminale du V2R, ainsi que leur rôle dans la stabilité de l'interaction du récepteur avec  $\beta$ arrestine, nous proposons que la palmitoylation influence le positionnement de ce domaine d'interaction et ainsi l'association du récepteur avec la protéine adaptatrice (Figure 23). De plus, comme la palmitoylation semble régulée de façon dynamique au cours du cycle d'activation des récepteurs (Qanbar and Bouvier 2003) (voir section 1.4 de l'Introduction), des changements régulés de cette modification post-traductionnelle pourraient alors moduler l'endocytose du V2R et déterminer la contribution relative des différentes voies de signalisation en réponse à la stimulation du récepteur.



**Figure 23. Rôle de la palmitoylation du V2R.**

**A)** La palmitoylation du V2R semble induire une conformation du récepteur favorisant son interaction avec  $\beta$ arrestine, menant à l'endocytose du récepteur et à l'activation des MAPKs de façon efficace suite à une stimulation par l'AVP. **B)** Lorsque le récepteur est dépalmitylé, l'interaction avec  $\beta$ arrestine est moins efficace, possiblement due à une conformation ne favorisant pas l'interaction de la protéine adaptatrice avec le regroupement de résidus phosphorylés (P) en aval des sites de palmitoylation, menant alors à une réduction d'endocytose et d'activation des MAPKs.

Une telle modulation sélective de la fonction des RCPGs par la palmitoylation a également été suggérée par d'autres études (voir section 1.6.3 de l'Introduction). Notamment, la palmitoylation du CCR5 semble seulement influencer son couplage à certaines voies de son répertoire signalétique (Blanpain et al. 2001b); et celle de l'ET<sub>A</sub>R

affecte le couplage de ce récepteur avec Gq mais pas avec Gs (Cramer et al. 2001). Étant donné les multiples effets associés à la perte de palmylation en fonction du RCPG étudié, la possibilité que la palmylation possède un rôle général dans la régulation de la fonction de ces récepteurs apparaît à priori improbable. Toutefois, le rôle général de la palmylation des RCPGs peut être purement structural et consister en la régulation fine de la conformation des récepteurs. Un tel rôle pourrait expliquer les diverses effets observés par la perte de palmylation chez différents RCPGs, ainsi que les effets sélectifs pour un même récepteur, car ceux-ci dépendront de la nature des récepteurs et donc de leurs fonctions respectives. De plus, même si la palmylation des RCPGs influençait l'interaction des récepteurs avec  $\beta$ arrestine de façon générale, comme celle-ci peut jouer différents rôles régulateurs autant dans le trafic intra-cellulaire des récepteurs que dans leur signalisation, la perte de palmylation induirait différents effets selon le rôle de  $\beta$ arrestine dans la fonction du RCPG étudié.

### **3.2 Rôle de $\beta$ arrestine dans la fonction des RCPGs**

Comme mentionné plus haut, la transduction des signaux par les RCPGs peut prendre plusieurs formes, dictées par la nature des changements de conformations des récepteurs induite par la liaison du ligand. Ensuite, comme le suggèrent nos travaux, ces conformations peuvent être reconnues de façon différentielle par les différentes protéines interagissant avec les RCPGs (voir section 1.4 de l'Introduction), notamment par  $\beta$ arrestine. L'interaction de ces protéines avec les récepteurs activés les active à leur tour, se traduisant par des changements dans leur conformation. Entre autres, plusieurs études de mutagenèses, ou encore effectuées *in vitro*, suggèrent qu'un important changement conformationnel de la molécule de  $\beta$ arrestine accompagne son activation, et sa transition vers un état de haute affinité de liaison au récepteur, suivant sa reconnaissance initiale des RCPGs activés (Gurevich and Gurevich 2004) (voir section 1.3.1.2 de l'Introduction; Figure 9). Ces changements conformationnels exposent alors des sites d'interaction de



$\beta$ arrestine avec d'autres protéines, impliquées soit dans l'endocytose des récepteurs (par ex. clathrine et AP-2), soit dans leur transduction du signal (par ex. c-Src, Raf-1 et ERK1/2).

### **3.2.1 Activation et changements conformationnels de $\beta$ arrestine**

Par l'utilisation de la  $\beta$ arrestine double brillance, un biosenseur basé sur le BRET intra-moléculaire entre le donneur bioluminescent Luc et l'accepteur fluorescent YFP conjugués aux extrémités N- et C-terminales de  $\beta$ arrestine respectivement (Luc- $\beta$ arr-YFP), nos travaux ont permis de mettre en évidence le changement conformationnel de  $\beta$ arrestine induit par un ligand, en temps réel dans des cellules vivantes (*article 4*). En effet, par la mesure du BRET intra-moléculaire entre Luc et YFP dans la  $\beta$ arrestine double brillance, il nous a été possible de détecter des variations de BRET suite à une stimulation par l'AVP, suggérant la présence de changements conformationnels importants survenant dans la molécule de  $\beta$ arrestine lors de son activation. De plus, même si des variations de RET peuvent refléter des changements dans l'orientation autant que dans la distance entre le donneur et l'accepteur d'énergie (Andrews and Demidov 1999), l'observation que les changements conformationnels de  $\beta$ arrestine induits par l'agoniste se traduisent par une augmentation du signal de BRET peut suggérer la présence d'un rapprochement des extrémités N- et C-terminales lors du processus d'activation (*figure 1 et 3*). En fait, ceci serait en accord avec le modèle d'activation de  $\beta$ arrestine, proposant que l'extrémité C-terminale se rapproche du N-terminal dans la molécule de  $\beta$ arrestine active (Gurevich and Gurevich 2004) (voir section 1.3.1.2 de l'Introduction; Figure 9).

#### ***3.2.1.1 Nature du changement conformationnel détecté avec la $\beta$ arrestine double brillance***

De façon intéressante, les études parallèles du recrutement de la  $\beta$ arrestine double brillance au V2R-GFP et de son changement conformationnel en temps réel suggèrent que

ce dernier survient (*figure 3B*;  $t_{1/2}$ ,  $\sim 5$  min) significativement plus lentement que le recrutement de la protéine adaptatrice au V2R-GFP activé (*figure 2B*;  $t_{1/2}$ ,  $\sim 1$  min). Même si le modèle d'activation de  $\beta$ arrestine suggère que l'ouverture de la conformation « en selle », accompagnant l'activation de la protéine adaptatrice, survient après le recrutement initial de  $\beta$ arrestine au RCPG activé, la présence d'un tel décalage entre le recrutement de la  $\beta$ arrestine double brillance au V2R et son changement conformationnel remet en question la nature du changement détecté par la mesure du BRET intra-moléculaire. Selon le modèle, le changement conformationnel de  $\beta$ arrestine reflèterait sa transition vers une conformation de haute affinité de liaison au RCPG, suivant la reconnaissance initiale de la conformation active du récepteur, induite par l'interaction de  $\beta$ arrestine avec les résidus phosphorylés par les GRKs dans le domaine C-terminal des RCPGs (Gurevich and Gurevich 2003). Hors, par l'utilisation d'une  $\beta$ arrestine double brillance mutée en  $\beta$ arr(R169E), une mutation qui semble induire l'ouverture et l'activation constitutive de  $\beta$ arrestine liant alors les RCPGs de façon indépendante de leur état de phosphorylation (Kovoor et al. 1999), nos travaux suggèrent que les changements conformationnels détectés par les variations de BRET intra-moléculaire dans la  $\beta$ arrestine double brillance ne sont pas dus à la liaison des phosphates (*figure 4*). En effet, aucune différence n'a été observé dans les signaux de BRET basal ou induit par l'AVP entre la  $\beta$ arrestine double brillance insensible au phosphate (Luc- $\beta$ arr(R169E)-YFP) et celle sauvage.

Ainsi, comme le changement conformationnel de  $\beta$ arrestine détecté avec la  $\beta$ arrestine double brillance ne semble pas représenter l'ouverture de la protéine lors de sa liaison aux phosphates présents sur le récepteur activé, celui-ci représente vraisemblablement des changements de conformation induits par le recrutement subséquent de protéines interagissant avec la  $\beta$ arrestine dans sa conformation active. Comme mentionné dans l'Introduction (section 1.3.1.2; Figure 8A), une liste grandissante de protéines ont été identifiées comme interagissant avec  $\beta$ arrestine de façon dépendante ou indépendante du ligand (Lefkowitz and Whalen 2004a). Ainsi, l'interaction de  $\beta$ arrestine avec la clathrine (Goodman et al. 1996; Goodman, Jr. et al. 1997) et l'AP-2 (Laporte et al.

1999) est d'un intérêt particulier puisque celle-ci a été montrée comme étant induite par le ligand, impliquant la queue C-terminale de  $\beta$ arrestine. Il semble alors très probable que l'interaction de ces protéines avec la queue C-terminale de  $\beta$ arrestine, libérée de ses interactions intra-moléculaires suite à la liaison du RCPG activé, induise le changement conformationnel détecté comme une augmentation de BRET intra-moléculaire dans la  $\beta$ arrestine double brillance.

De façon intéressante, les changements conformationnels de  $\beta$ arrestine induits par la stimulation des RCPGs de classe A ( $\beta_2$ AR, V1aR,  $\delta$ OR; interaction transitoire avec  $\beta$ arrestine) s'avéra plus difficile à détecter que ceux induits par la stimulation des RCPGs de classe B (V2R, PAFR, CCR5, AT<sub>1A</sub>R; interaction stable avec  $\beta$ arrestine). Également, dans des conditions expérimentales permettant la détection des changements conformationnels de  $\beta$ arrestine induits par les deux classes de récepteurs, alors que les cinétiques sont semblables, l'amplitude du signal de BRET intra-moléculaire de la  $\beta$ arrestine double brillance induit par la stimulation des récepteurs de classe A tend à être plus faible que celle obtenue avec les récepteurs de classe B. Cela peut être expliqué par le fait que, résultant de leur faible interaction avec  $\beta$ arrestine, les RCPGs de classe A subissent moins d'endocytose que ceux de la classe B (Oakley et al. 1999). En effet, si le changement conformationnel de  $\beta$ arrestine détecté avec la  $\beta$ arrestine double brillance représente son interaction avec les protéines de la machinerie d'endocytose clathrine et AP-2 suivant son recrutement au récepteur, il est attendu que le changement conformationnel de  $\beta$ arrestine observé soit relié à l'amplitude d'internalisation des récepteurs.

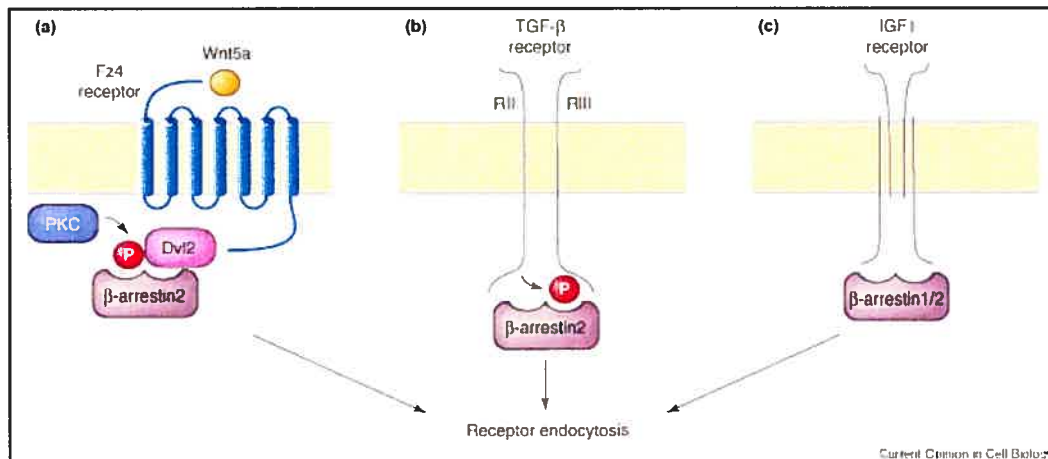
Ainsi, la  $\beta$ arrestine double brillance représente le premier biosenseur basé sur le BRET intra-moléculaire permettant la détection de changements conformationnels d'une protéine. Cela ouvrira inévitablement la porte au développement d'outils similaires pour l'étude d'autres protéines subissant d'importants changements conformationnels liés à leur fonction. Par exemple, un candidat intéressant pourrait être la protéine tyrosine c-Src (notamment impliquée dans l'activation d'ERK1/2 par l'AVP, discuté plus bas). En effet,

de façon similaire à  $\beta$ arrestine, la conformation inactive de c-Src est restreinte par des interactions intra-moléculaires, lesquelles sont perdues dans la conformation ouverte du c-Src activé (Xu et al. 1999).

### ***3.2.1.2 Un biosensor pour l'étude générale de l'activité des récepteurs***

La détection de changements conformationnels de  $\beta$ arrestine suite à la stimulation de diverses RCPGs suggère que la  $\beta$ arrestine double brillance peut être utilisée comme un biosenseur général de l'activité des RCPGs. Lorsque comparée aux essais de recrutement de  $\beta$ arrestine basés sur le BRET inter-moléculaire (Angers et al. 2000), la  $\beta$ arrestine double brillance évite les difficultés reliées à l'expression ratiométrique appropriée des constructions du donneur et de l'accepteur d'énergie, et permet l'étude de RCPGs non modifiés.

La  $\beta$ arrestine double brillance pourrait également s'avérer un outil avantageux dans l'étude des rôles de plus en plus diversifiés tenus par  $\beta$ arrestine, comme son implication dans la régulation d'autres systèmes réceptoriels (Figure 24). En effet, le spectre de récepteurs pouvant utiliser  $\beta$ arrestine pour l'endocytose via les puits de clathrines a significativement élargi (Lefkowitz and Whalen 2004). Entre autres,  $\beta$ arrestine semble requise pour l'internalisation du RCPG atypique Frizzled-4, via une interaction avec la protéine adaptatrice Dishevelled-2 phosphorylée par PKC (Chen et al. 2003); pour l'internalisation des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase du facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) de type RII et RIII, de façon dépendante de la phosphorylation de RIII par RII (Chen et al. 2003); ainsi que pour le récepteur due l'IGF1, de façon indépendante de sa phosphorylation (Dalle et al. 2001).



**Figure 24. Endocytose dépendante de  $\beta$ arrestine au-delà des RCPGs.**

(Lefkowitz and Whalen 2004)

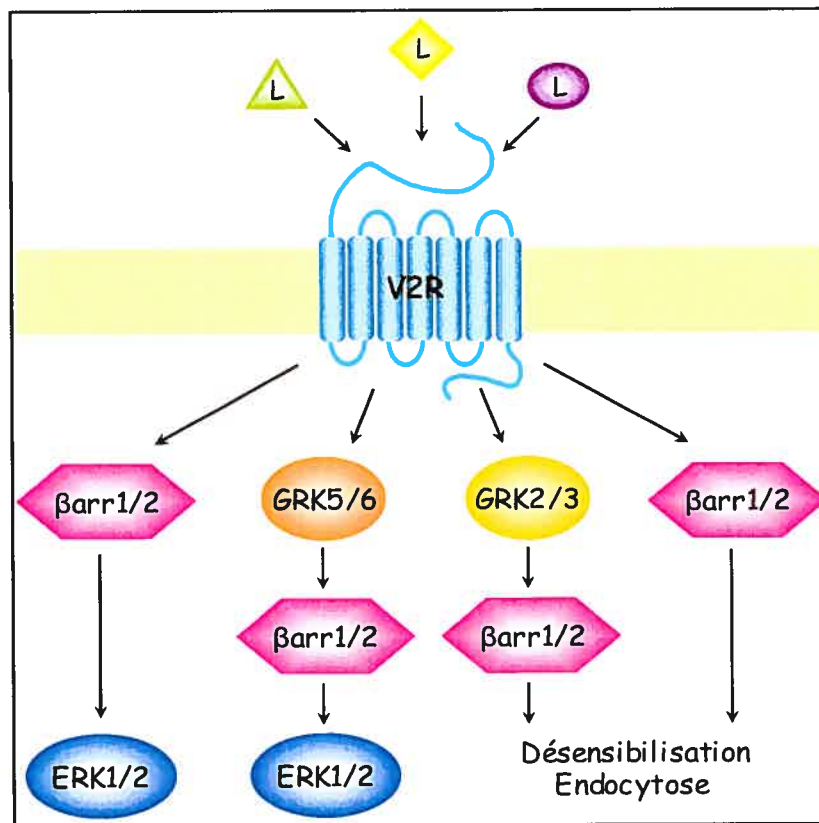
**A)** L'endocytose du récepteur Frizzled 4 (Fz4) stimulé par Wnt5a est orchestrée par  $\beta$ arrestine 2, de façon dépendante de la phosphorylation de la protéine adaptatrice Dishevelled 2 (Dvl2) par PKC. **B)** L'endocytose des sous-types RII et RIII des récepteurs du TGF- $\beta$ 1 est orchestrée par  $\beta$ arrestine 2, et facilitée par la phosphorylation de RIII par RII. **C)** L'endocytose du récepteur de l'IGF1 est orchestrée par  $\beta$ arrestine.

### 3.2.2 Fonction et régulation de l'interaction des RCPGs avec $\beta$ arrestine

Même si les  $\beta$ arrestines ont été découvertes dans le contexte de l'amortissement de la transduction du signal par les RCPGs, il est maintenant bien apprécié qu'elles peuvent également initier des signaux à partir du même récepteur qu'elles « désensibilisent ». Entre autres,  $\beta$ arrestine, recrutée aux récepteurs activés, peut mener à l'activation de protéines tyrosines kinases de la famille Src et servir d'échafaud pour l'activation des MAPKs par les

RCPGs (Perry and Lefkowitz 2002) (voir section 1.4.2 de l'Introduction ; Figure 13). Par conséquent, l'interaction des RCPGs avec  $\beta$ arrestine induite par le ligand ne déterminera pas seulement la désensibilisation du signal dépendant des protéines G hétéro-trimériques ainsi que leur trafic intra-cellulaire, mais également, la contribution d'autres voies de signalisation, comme celles menant à l'activation des MAPKs de façon indépendante de leur couplage aux protéines G.

Ainsi, dans plusieurs cas, le contrôle de l'interaction des RCPGs avec  $\beta$ arrestine occupe un rôle central dans la régulation de la fonction de ces récepteurs. De plus, nos travaux, en combinaison avec d'autres, démontrent clairement que cette interaction peut être régulée de manière très fine, en modulant la conformation des récepteurs. Entre autres, la nature ainsi que la fonction de l'interaction de  $\beta$ arrestine avec les RCPGs induite par un ligand peut varier de façon dépendante de la nature de celui-ci, via la stabilisation d'une conformation spécifique du récepteur. Par exemple, dans le cas du V2R, celui-ci est phosphorylé par les GRKs et, par conséquent, engage  $\beta$ arrestine dans une interaction stable suite à la liaison d'AVP ou bien, le V2R peut recruter directement  $\beta$ arrestine, probablement de façon transitoire, suite à la liaison du SR121463 (*article 1*). De plus, comme il a été mentionné plus haut, la modulation de la conformation du V2R par l'état de palmylation de son domaine C-terminal semble également pouvoir influencer la stabilité de son interaction avec  $\beta$ arrestine (*article 2*). Par conséquent, la nature de l'interaction du V2R, ou autres RCPGs, avec  $\beta$ arrestine semble ensuite déterminer la fonction de celle-ci, qui peut alors être la désensibilisation du signal et/ou l'endocytose du récepteur et/ou l'activation des MAPKs (Figure 25). De plus, la nature et la stabilité de l'interaction RCPG- $\beta$ arrestine semble déterminer la localisation cellulaire et, ainsi, la fonction de l'activité ERK1/2 stimulée par le récepteur impliqué (voir section 1.5.4 de l'Introduction).



**Figure 25. Régulation et fonction de l'interaction du V2R avec  $\beta$ arrestine.**

Selon la nature du ligand engagé avec le V2R (L), la conformation du récepteur qui est stabilisée peut être phosphorylée ou non par les GRKs de façon différentielle (GRK2/3 et/ou GRK5/6) et, par conséquent, déterminer la nature et la fonction de l'interaction du récepteur avec  $\beta$ arrestine 1 et/ou 2 ( $\beta$ arr1/2).

Également, la fonction de l'interaction de  $\beta$ arrestine avec les RCPGs peut potentiellement dépendre de l'isoforme de  $\beta$ arrestine recruté au récepteur. En effet, comme mentionné dans l'Introduction (section 1.3.1.2), un nombre grandissant d'études rapportent des différences fonctionnelles entre les  $\beta$ arrestines 1 et 2. De plus, au moment d'écrire ces lignes, un degré supplémentaire de régulation de la spécificité fonctionnelle de l'interaction

RCPG- $\beta$ arrestine fut révélé dans deux études parallèles (Kim et al. 2005; Ren et al. 2005). Ces études suggèrent que la phosphorylation des RCPGs, particulièrement l'AT<sub>1</sub>A<sub>R</sub> (Kim et al. 2005) et le V2R (Ren et al. 2005), par différentes GRKs gouverne non seulement la signalisation de ces récepteurs via les protéines G et  $\beta$ arrestine de façon différentielle, mais également la fonction des  $\beta$ arrestines recrutées. Alors que les GRK2 et GRK3 semblent responsables de la majorité de la phosphorylation des récepteurs, de leur désensibilisation, et du recrutement de  $\beta$ arrestine, une plus modeste phosphorylation des récepteurs par GRK5 et GRK6 semble supporter exclusivement l'activation d'ERK1/2 dépendante de  $\beta$ arrestine 2 (Figure 25).

### 3.2.3 Régulation de l'activité ERK1/2 par le V2R

Nos travaux ont permis de mettre en évidence la présence de différentes voies de signalisation, induites par l'AVP, impliquées dans la régulation des MAPKs ERK1/2 par le V2R. Même si le rôle de l'activité ERK1/2 dans la fonction du V2R *in vivo* n'est pas connu, celle-ci pourrait s'avérer à l'origine de plusieurs effets physiologiques de l'AVP inexplicables, comme la présence de signalisation combinatoire entre des signaux générés par la stimulation du V2R et des voies MAPK régulées par l'EGFR (Phillips et al. 1994; Yamada et al. 1995) et le récepteur du NGF TrkA (Good 1998) dans différents types de cellules rénales.

#### 3.2.3.1 Voies dépendantes de $\beta$ arrestine versus des protéines G

En plus de mettre en évidence l'influence de la palmylation du V2R sur l'interaction du récepteur avec  $\beta$ arrestine, l'étude du rôle de la palmylation du V2R nous a permis de démontrer l'implication majeure de la protéine adaptatrice dans l'activation d'ERK1/2 stimulée par l'AVP (*article 2, Figure 6*). En effet, la surexpression du mutant tronqué  $\beta$ arr(319-418), agissant comme dominant négatif de la  $\beta$ arrestine sauvage, mena à



une inhibition d'environ 80% de l'activité ERK1/2 stimulée par le V2R. De plus, bien que le V2R soit internalisé de façon dépendante de  $\beta$ arrestine, le rôle de celle-ci dans l'activation des MAPKs par le V2R ne semble pas être lié à son rôle dans l'endocytose des récepteurs. Effectivement, l'absence d'inhibition de l'activité ERK1/2 induite par l'AVP suite au blocage pharmacologique de l'endocytose des RCPGs avec la concanavaleine A indique que l'internalisation du V2R n'est pas requise dans l'activation d'ERK1/2 par ce récepteur. L'implication de l'endocytose dans l'activation des MAPKs par les RCPGs a en fait été suggéré par plusieurs études mais, dans certains cas, celle-ci semble plutôt impliquer l'internalisation du RTK trans-activé, et non celle du RCPG stimulé par l'agoniste (Ferguson 2001). Ainsi, même si nos travaux démontrent que l'endocytose du V2R n'est pas requise pour l'activation d'ERK1/2 par ce récepteur, ceux-ci n'excluent pas la possibilité que l'internalisation du PDGFR soit impliquée, comme la trans-activation de ce RTK semble nécessaire à la stimulation des MAPKs par l'AVP (*article 3, Figure 6A*).

L'importance de  $\beta$ arrestine dans l'activation des MAPKs par le V2R est davantage supportée par la démonstration que la réduction de l'expression des  $\beta$ arrestines endogènes, par la méthode d'interférence d'ARN, induit une inhibition quasi complète de l'activité ERK1/2 stimulée par l'AVP (*article 3, figure 7*). Ces résultats suggèrent alors que l'activation des MAPKs ERK1/2 par le V2R emprunte une seule voie, qui est dépendante de  $\beta$ arrestine. Un nombre grandissant d'études démontre l'implication de  $\beta$ arrestine dans l'activation des MAPKs par les RCPGs, mais aussi que  $\beta$ arrestine n'est responsable que d'une partie de l'activité ERK1/2 stimulée par les récepteurs. En effet, les RCPGs menant à l'activation d'ERK1/2 par une voie impliquant  $\beta$ arrestine semblent également stimuler l'activité de ces MAPKs par une voie dépendante de la signalisation par les protéines G hétéro-trimériques de façon simultanée. Par exemple, la stimulation de l'AT<sub>1A</sub>R mène à l'activation d'ERK1/2 par deux voies, indépendantes soit de Gq soit de  $\beta$ arrestine (Wei et al. 2003b; Ahn et al. 2003). Très récemment, une étude a même suggérée l'existence de deux voies de signalisations menant à l'activation d'ERK1/2 par le V2R: l'une indépendante de PKA, et l'autre indépendante de  $\beta$ arrestine (Ren et al. 2005).

Ces observations ont alors été remis en question par nos travaux, démontrant non seulement que des agonistes inverses envers l'activité adénylyl cyclase couplée au  $\beta_2$ AR stimulent l'activité ERK1/2 de façon dépendante de  $\beta$ arrestine, mais indépendante des protéines G hétéro-trimériques (*article 1*); mais aussi, que dans notre système, l'activation du V2R par l'AVP stimule l'activité ERK1/2 par une seule voie impliquant  $\beta$ arrestine, de façon indépendante des protéines G (*article 3*). La différence entre les mécanismes d'activation d'ERK1/2 par le V2R, rapportées dans l'étude de *Ren et al.* et la présente thèse, pourrait simplement être due à la nature distincte des cellules utilisées dans chacune des études. En effet, même si la lignée HEK293 a été utilisée dans les deux cas, il a été suggéré que les voies de signalisation induites par un récepteur peuvent varier même d'un isolat cellulaire à un autre. Par exemple, il a été montré que la sensibilité de l'activité ERK1/2, stimulée par le  $\beta_2$ AR, à un traitement par la PTX (inhibiteur  $G_{i/o}$ ) varie de complète à nulle, même dans des isolats différents de la lignée cellulaire HEK293 (Lefkowitz et al. 2002). Néanmoins, nos travaux démontrent que certains RCPGs peuvent stimuler l'activité ERK1/2 via une seule voie dépendante de  $\beta$ arrestine, indépendamment des protéines G hétéro-trimériques.

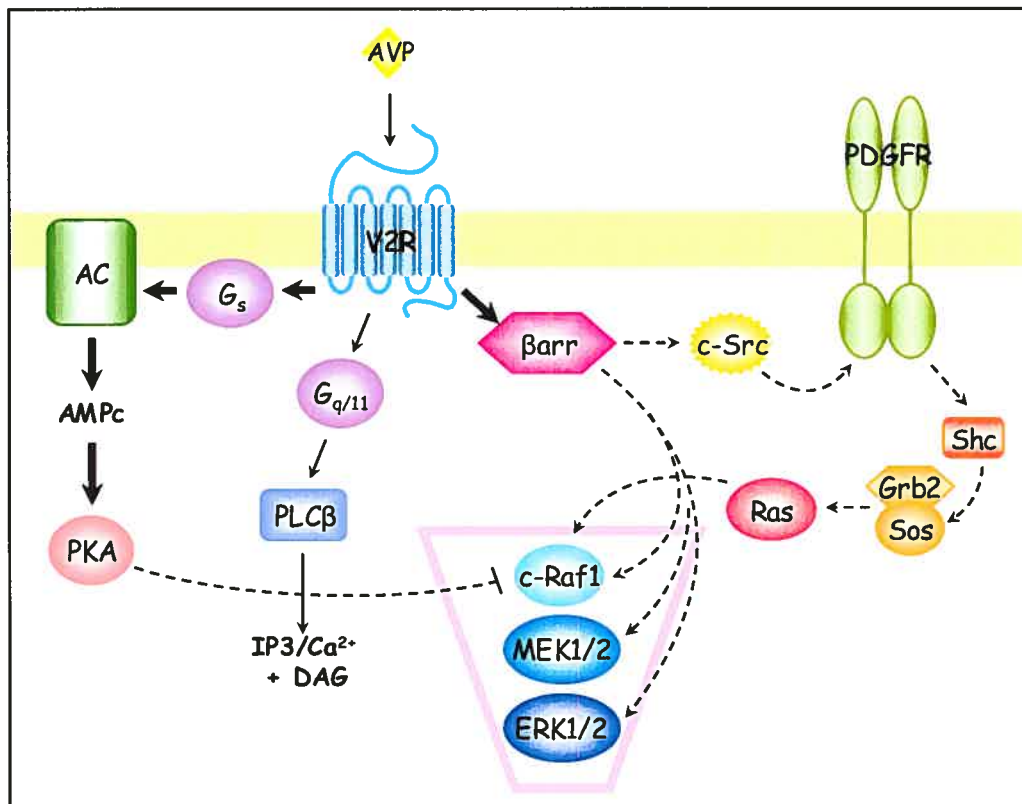
Ainsi, contrairement à plusieurs RCPGs, le V2R semble pouvoir induire l'activation d'ERK1/2 de façon indépendante de sa signalisation par les protéines G hétéro-trimériques (*article 3*). En effet, nos résultats démontrent que même si  $G_s$  et  $G_q$  peuvent être stimulées par le V2R, aucune voie dépendante des sous-unités  $G_\alpha$  de ces protéines G (*figures 1 et 3*), ni de complexes  $G\beta\gamma$  (*figure 5*) ne sont impliquées dans l'activation des MAPKs par l'AVP. La voie menant à l'activation d'ERK1/2 par le V2R ne semble pas non plus impliquer  $G_{i/o}$  puisque l'activité ERK1/2 stimulée par l'AVP est insensible à la PTX (*figure 2*). En outre, l'efficacité de l'AVP à induire l'activation d'ERK1/2, qui est très près de l'affinité du V2R pour ce ligand ( $\sim 10^{-9}$ M), supporte davantage le fait que la voie  $G_s$ -AMPc-PKA stimulée par l'AVP n'est pas impliquée dans l'activation des MAPKs (*article 2, figures 4*). Il est effectivement attendu que le processus d'amplification survenant lors de

la production d'AMPC augmente l'efficacité apparente de l'AVP ( $\sim 10^{-11}$ M; *article 2, figure 2*). Au contraire, le recrutement de  $\beta$ arrestine (*article 4, figure 2C*), et par conséquent les processus dépendants de celle-ci comme l'activation des MAPKs en l'occurrence, reflète la liaison de l'agoniste.

De plus, non seulement la voie Gs-AMPC-PKA activée par le V2R n'est pas impliquée dans l'activation d'ERK1/2, mais celle-ci semble inhiber l'activité des MAPKs. En effet, la régulation négative de Gs par un traitement soutenu à la CTX ou l'inhibition sélective de PKA mène à une potentialisation de l'activité ERK1/2 stimulée par l'AVP (*article 3; figure 1*). Même si la stimulation de production d'AMPC semble pouvoir stimuler l'activité ERK1/2 dans certains types cellulaires (voir section 1.5.2 de l'Introduction; Figure 15) (Luttrell 2003), via la phosphorylation de Rap-1 par PKA et l'activation subséquente de l'isoforme B-Raf, cela n'est pas toujours le cas. Dans plusieurs fibroblastes, par exemple, la phosphorylation directe de l'isoforme Raf-1 par PKA inhibe cette MAP3K, atténuant ainsi l'activation d'ERK1/2 par d'autres stimuli (Wu et al. 1993). Ainsi, nos travaux suggèrent que la stimulation du V2R génère deux signaux contradictoires régulant l'activité des MAPKs ERK1/2: d'une part, l'AVP stimule l'activité ERK1/2 par une voie impliquant  $\beta$ arrestine et d'autre part, par la stimulation de Gs et la production d'AMPC, l'AVP mène également à l'inhibition d'ERK1/2 (Figure 26).

### ***3.2.3.2 Rôle de $\beta$ arrestine dans l'activation des MAPKs par le V2R***

Le recherche de la voie de signalisation menant à l'activation d'ERK1/2 par le V2R permettra de mettre en évidence l'implication de la protéine tyrosine kinase c-Src ainsi que du PDGFR (*article 3, figures 4B et 6*) (Figure 26). De plus, nos travaux montrent que la stimulation du V2R par l'AVP n'induit pas la synthèse d'ADN, mais plutôt une réponse légèrement anti-mitogénique, comme il avait été rapporté précédemment (Thibonnier et al. 1998; Tohgo et al. 2002), suggérant que les ERK1/2 activés par l'AVP ne sont peut-être pas relocalisés dans le noyau après stimulation (*figure 6B*).



**Figure 26. Voies de signalisation engagées par le V2R.**

Schéma illustrant les différentes voies de signalisation cellulaires stimulées suite à l'activation du V2R par l'AVP dans les cellules HEK293. Les flèches en pointillé indique des liens incertains; →, indique une activation; ⊣, indique une inhibition.

Hors, une étude a récemment montrée que l'activité ERK1/2 stimulée par le V2R est retenue dans le cytoplasme, localisée aux endosomes, dans un complexe multiprotéique comprenant, entre autres, le récepteur internalisé avec βarrestine (Tohgo et al. 2002; Tohgo et al. 2003). Cela a été montré pour plusieurs RCPGs de class B, qui interagissent de façon stable avec les βarrestines recrutées aux récepteurs et sont retrouvés co-localisés avec la protéine adaptatrice dans les endosomes après leur internalisation. Par son interaction avec

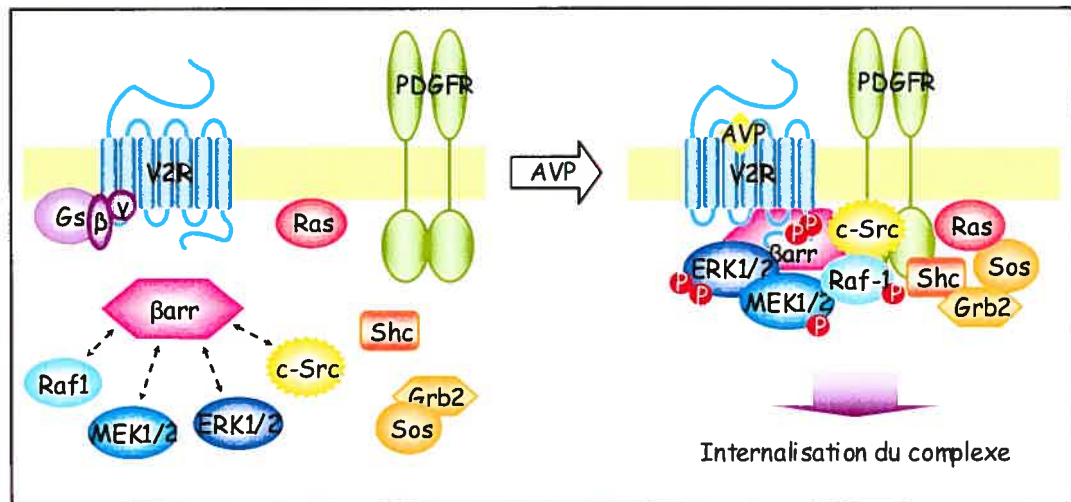
les récepteurs, Raf-1, et ERK1/2,  $\beta$ arrestine promeut la formation d'un complexe signalétique localisé aux endosomes, retenant ainsi les ERK1/2 activés dans le cytoplasme (voir section 1.5.4 de l'Introduction; Figure 16) (Luttrell 2003). Bien que cela reste à démontrer dans notre système, un tel complexe formé par  $\beta$ arrestine au V2R, retenant l'activité ERK1/2 dans le cytoplasme, pourrait expliquer l'effet anti-mitogénique de l'AVP, puisque ceci préviendrait la translocation nucléaire des MAPKs activées et, par conséquent, la stimulation de la synthèse d'ADN. De plus, par son interaction avec  $\beta$ arrestine, c-Src pourrait faire partie de ce complexe signalétique orchestré par celle-ci, et participer à l'activation d'ERK1/2. En effet, l'implication et la présence de c-Src dans un tel complexe de signalisation multiprotéique, formé par  $\beta$ arrestine et menant à l'activation d'ERK1/2, a déjà été rapporté, notamment pour le récepteur NK<sub>1</sub>R (voir section 1.4.2 de l'Introduction; Figure 13B) (Defea et al. 2000a; Perry and Lefkowitz 2002).

Comme les RTKs génèrent normalement une réponse mitogénique, la découverte que la voie menant à l'activation des MAPKs par le V2R, dépendante de  $\beta$ arrestine, requiert également la trans-activation du PDGFR est très intrigante. Toutefois, il a été montré que dans plusieurs cas où la trans-activation des RTKs est effectuée par des mécanismes uniquement intra-cellulaires, i.e. n'impliquant pas la relâche de ligand et l'activation autocrine du récepteur, la signalisation de ceux-ci est distincte de celle induite par leur ligand (Ferguson 2003). Hors, aucun modèle de relâche de PDGF à partir d'un pro ligand membranaire n'a été décrit pour la trans-activation du PDGFR. De plus, bien que l'EGFR semble le RTK trans-activé privilégié par plusieurs RCPGs (Wetzker and Bohmer 2003), un nombre grandissant d'études rapporte l'implication du PDGFR dans l'activation des MAPKs par les RCPGs; notamment par les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub>R (Nebigil et al. 2000), D2 et D4 de la dopamine (Oak et al. 2001), de la sphingosine 1-phosphate (Waters et al. 2003; Tanimoto et al. 2004), de l'acide lysophosphatidique (Wang et al. 2003), de nucléotides P2Y (Milenkovic et al. 2003; Liu et al. 2004), et l'AT<sub>1</sub>R (Yin et al. 2003; Kelly et al. 2004). En outre, dans certains cas, la trans-activation du PDGFR implique sa

phosphorylation par c-Src et parfois même la formation d'un complexe RCPG-PDGFR menant à l'activation d'ERK1/2 (Pyne et al. 2003).

Ainsi, bien que cela reste à démontrer, nous proposons que l'activation d'ERK1/2 par le V2R implique la formation d'un grand complexe multiprotéique où tous les composantes de la cascade signalétique sont rassemblées, incluant le V2R, le PDGFR,  $\beta$ arrestine, c-Src, et ERK1/2, ainsi que possiblement Grb2/SOS, Ras, Raf-1 et MEK1/2, faisant le pont entre le PDGFR et l'activation d'ERK1/2. Pour ce qui est de c-Src, celui-ci pourrait promouvoir la trans-activation du PDGFR en le phosphorylant directement (Figure 27). Plusieurs autres questions se posent alors concernant un tel mécanisme d'activation d'ERK1/2 par le V2R, comme par exemple: s'il existe des pré-complexes de  $\beta$ arrestine avec c-Src et/ou les MAPKs, ou bien si la formation de ceux-ci est induite par l'agoniste; s'il existe une spécificité relative à l'isoforme de  $\beta$ arrestine recruté au récepteur; ou encore, la nature de la spécificité de trans-activation du PDGFR. En effet, alors que les HEK293 semblent bien exprimer l'EGFR (vu par la forte stimulation de l'activité ERK1/2 par l'EGF; *article 3, figure 6*), la nature de la discrimination de celui-ci au profit du PDGFR comme RTK supportant l'activation d'ERK1/2 par le V2R demeure inconnue.

De façon intéressante, dans le cours de nos travaux, nous avons également observé une activation significative des MAPKs p38 induite par la stimulation du V2R par l'AVP (Figure 28). Ces résultats ne sont que préliminaires, mais le fait que la palmylation du V2R semble affecter sa stimulation de l'activité p38 indique possiblement que celle-ci est également dépendante de  $\beta$ arrestine, puisque nous avons montré que la palmylation du récepteur influence son interaction avec la protéine adaptatrice (*article 2*). L'échafaudage et l'activation de p38 par  $\beta$ arrestine suite à la stimulation d'un RCPG ont, en effet, déjà été suggérés (Sun et al. 2002).

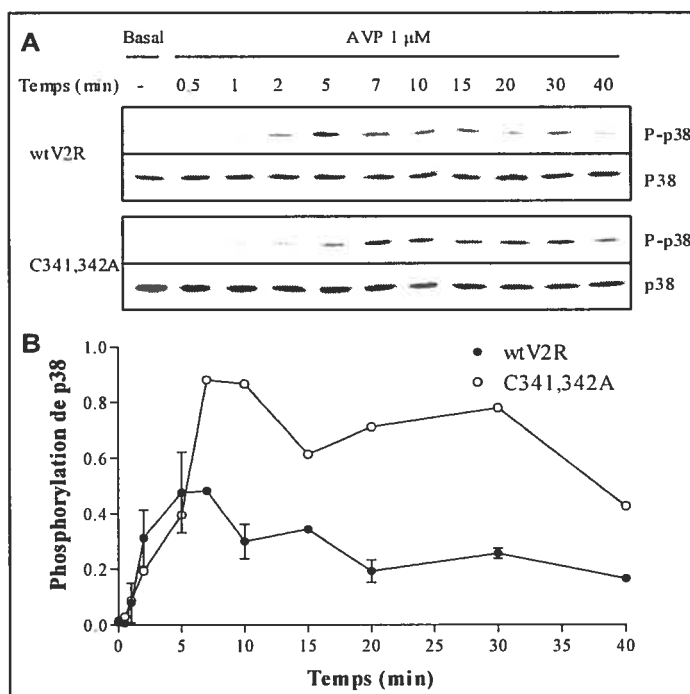


**Figure 27. Hypothèse du mécanisme d'activation des MAPKs ERK1/2 par le V2R.**

À gauche, en condition non-stimulée, le V2R est en équilibre d'interaction avec sa protéine G; l'existence incertaine de pré-complexes entre  $\beta$ arrestine et c-Src ou les MAPKs est indiqué par des flèches en pointillé. À droite, la stimulation du V2R par l'AVP induit la formation d'un complexe multi-protéique menant à l'activation d'ERK1/2 lié à  $\beta$ arrestine.

Le profil d'activation de ces MAPKs est toutefois très différent de celui d'ERK1/2. D'une part, l'activation maximale de p38 induite par l'AVP survient légèrement plus lentement (~5 min) que l'activation d'ERK1/2 (~2 min), et d'autre part, alors que l'activité ERK1/2 revient à un niveau basal après 15 min de stimulation par l'AVP (*article 2, figure 3B*), l'activation de p38 est légèrement diminuée mais demeure soutenue jusqu'à au moins 40 min après l'addition d'AVP (Figure 28). Ce profil d'activation de p38 par un RCPG est similaire à ce qui a été observé dans d'autres études (Faour et al. 2001), et suggère que cet MAPK possède des fonctions distinctes de celles d'ERK1/2. De plus, l'effet dû à la perte palmylation du V2R sur l'activation de p38 est bien différent de celui observé sur l'activation d'ERK1/2. Alors que, dans les deux cas, la cinétique initiale d'activation des MAPKs est ralentie avec le C341,342A-V2R, l'amplitude de l'activité ERK1/2 stimulée

par l'AVP est réduite par rapport au V2R sauvage (*article 2, figures 3B et 4*), tandis qu'au contraire, l'amplitude de l'activité p38 est augmentée (Figure 28B). Cela suggère alors que chacune de ces voies MAPKs activées par le V2R est régulée de façon différente, même si toutes deux s'avéraient dépendantes de  $\beta$ arrestine.



**Figure 28. Activation de p38 par le V2R.**

Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le V2R sauvage (wtV2R) ou mutant C341,342A-V2R ont été stimulées par 1  $\mu$ M AVP pour les périodes de temps indiquées. A) L'activité p38 a été détectée par immunobuvardage avec des anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée de p38 (P-p38), et la quantité de p38 a été contrôlée en utilisant des anticorps dirigés contre la population complète des kinases (p38). B) Représentation graphique des données, exprimées comme le rapport des immunoréactivités P-p38/p38, quantifiées par densitométrie. Les courbes représentent des résultats préliminaires obtenus, pour le wtV2R, dans deux expériences indépendantes.



Comme mentionné précédemment, la fonction de l'activation des MAPKs par le V2R *in vivo* n'est pas connue, et on sait encore moins si celle-ci emprunte la voie de signalisation mis en évidence par nos travaux. Toutefois, une telle voie de signalisation pourrait être impliquée dans les différents événements de signalisation combinatoire rapportés entre les voies stimulées par l'AVP et celles stimulées par les facteurs de croissance NGF (Good 1998) et EGF (Phillips et al. 1994; Yamada et al. 1995). De plus, même s'il a été démontré que la translocation rapide d'AQP2 est dépendante de PKA (Kuwahara et al. 1995), l'activation des MAPKs induite par l'AVP pourrait tout de même être impliquée dans la régulation de la perméabilité à l'eau du tube collecteur en agissant sur d'autres processus. Par exemple, les MAPKs pourraient être impliquées dans la translocation des transporteurs d'urées UT1 (Shayakul et al. 1996) ou encore dans la modulation de l'expression des UT1 ou AQPs à long terme via la régulation de facteurs de transcription, comme CREB-P qui a été montré comme étant impliqué dans le contrôle de l'expression des AQP2 et AQP3 (Nielsen et al. 2002) (voir section 1.7.1 dans l'Introduction; Figure 19). De façon intéressante, quelques études ont en effet démontré la régulation de CREB-P par les MAPKs, notamment par p38 suite à la stimulation d'un RCPG (Faour et al. 2001).

### **3.3 Conclusion**

Au début de la présente étude, bien peu de données concernant les mécanismes de stimulation et de régulation de l'activité MAPKs par les RCPGs étaient disponibles. Toutefois, les connaissances dans ce champ d'étude ont augmentées de façon exponentielle au cours des dernières années, et nous croyons que nos études ont participées de façon significative à l'avancement de ces connaissances.

En effet, nos travaux ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'activité ERK1/2 par les RCPGs, en mettant en évidence le rôle joué par la

protéine adaptatrice  $\beta$ arrestine dans l'activation des MAPKs par ces récepteurs. En particulier, nos résultats montrent que l'interaction de  $\beta$ arrestine avec les RCPGs peut être régulée de façon différentielle, indépendante de l'interaction des récepteurs avec les protéines G hétéro-trimériques, et selon la nature du ligand. Nos résultats suggèrent en effet que des ligands peuvent avoir des efficacités opposées sur différents systèmes effecteurs, en l'occurrence l'activité adénylyl cyclase et l'activité MAPK dépendante de  $\beta$ arrestine, engagés par le même récepteur. Ensuite, nos travaux effectués avec le V2R suggèrent que l'interaction du récepteur avec  $\beta$ arrestine peut aussi être régulée finement par la modulation de son état de palmylation, modulant alors de façon sélective l'endocytose des récepteurs ainsi que l'activation d'ERK1/2 dépendante de  $\beta$ arrestine. En démontrant ces degrés de sélectivité fonctionnelle des RCPGs, nos travaux mettent en évidence la possibilité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement certaines fonctions des RCPGs.

Enfin, nos travaux n'ont pas seulement contribué à mettre en évidence l'implication et l'importance de  $\beta$ arrestine dans l'activation des MAPKs par les RCPGs, mais nous croyons que le développement de la  $\beta$ arrestine double brillance, comme biosenseur détectant l'interaction de  $\beta$ arrestine avec des protéines, encore non identifiées, induite par le ligand, permettra d'aborder de façon originale certaines des questions concernant la régulation ou la fonction de cette protéine multifonctionnelle.

#### **4. BIBLIOGRAPHIE**

Ahn S., Nelson C. D., Garrison T. R., Miller W. E., and Lefkowitz R. J. (2003) Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1740-1744.

Alderton F., Rakhit S., Kong K. C., Palmer T., Sambhi B., Pyne S., and Pyne N. J. (2001) Tethering of the platelet-derived growth factor beta receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J Biol Chem* **276**, 28578-28585.

Ali M. S., Sayeski P. P., and Bernstein K. E. (2000) Jak2 acts as both a STAT1 kinase and as a molecular bridge linking STAT1 to the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* **275**, 15586-15593.

Ali M. S., Sayeski P. P., Dirksen L. B., Hayzer D. J., Marrero M. B., and Bernstein K. E. (1997) Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* **272**, 23382-23388.

Albert P. R. and Robillard L. (2002) G protein specificity: traffic direction required. *Cell Signal* **14**, 407-418.

Allouche S., Polastron J., Hasbi A., Homburger V., and Jauzac P. (1999) Differential G-protein activation by alkaloid and peptide opioid agonists in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE. *Biochem J* **342** ( Pt 1), 71-78.

Andrews D. L. and Demidov A. A. (1999) *Resonance Energy Transfer*, John Wiley and Sons, Chichester.

Angers S., Salahpour A., Joly E., Hilairat S., Chelsky D., Dennis M., and Bouvier M. (2000) Detection of beta2-Adrenergic Receptor Dimerization in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3684-3689.

Angers S., Salahpour A., and Bouvier M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 409-435.

Antonelli V., Bernasconi F., Wong Y. H., and Vallar L. (2000) Activation of B-Raf and regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the G(o) alpha chain. *Mol Biol Cell* **11**, 1129-1142.

Arcaro A. and Wymann M. P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* **296** ( Pt 2), 297-301.

- Azzi M., Charest P. G., Angers S., Rousseau G., Kohout T., Bouvier M., and Pineyro G. (2003a) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11406-11411.
- Barak L. S., Ferguson S. S., Zhang J., and Caron M. G. (1997) A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* **272**, 27497-27500.
- Barak L. S., Oakley R. H., Laporte S. A., and Caron M. G. (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 93-98.
- Beedle A. M., McRory J. E., Poirot O., Doering C. J., Altier C., Barrere C., Hamid J., Nargeot J., Bourinet E., and Zamponi G. W. (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci* **7**, 118-125.
- Belanger C., Ansanay H., Qanbar R., and Bouvier M. (2001) Primary sequence requirements for S-acylation of beta(2)-adrenergic receptor peptides. *FEBS Lett* **499**, 59-64.
- Benovic J. L. (2002) Novel beta2-adrenergic receptor signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol* **110**, S229-S235.
- Berrada K., Plesnicher C. L., Luo X., and Thibonnier M. (2000) Dynamic interaction of human vasopressin/oxytocin receptor subtypes with G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C after agonist stimulation. *J Biol Chem* **275**, 27229-27237.
- Berridge M. J. (1983) Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J* **212**, 849-858.
- Bertrand L., Parent S., Caron M., Legault M., Joly E., Angers S., Bouvier M., Brown M., Houle B., and Menard L. (2002) The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRs). *J Recept Signal Transduct Res* **22**, 533-541.
- Billah M. M. (1993) Phospholipase D and cell signaling. *Curr Opin Immunol* **5**, 114-123.
- Birnbaumer M. (1999) Vasopressin receptor mutations and nephrogenic diabetes insipidus. *Arch Med Res* **30**, 465-474.
- Birnbaumer M. (2000) Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 406-410.

- Bizzozero O. A., Bixler H. A., and Pastuszyn A. (2001) Structural determinants influencing the reaction of cysteine-containing peptides with palmitoyl-coenzyme A and other thioesters. *Biochim Biophys Acta* **1545**, 278-288.
- Bizzozero O.A., McGarry J. F., and Lees M. B. (1987) Autoacylation of Myelin Proteolipid Protein with Acyl Coenzyme A. *J Biol Chem* **262**, 13550-13557.
- Blanpain C., Wittamer V., Vanderwinden J. M., Boom A., Renneboog B., Lee B., Le Poul E., El Asmar L., Govaerts C., Vassart G., Doms R. W., and Parmentier M. (2001) Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* **276**, 23795-23804.
- Bockaert J., Claeysen S., Becamel C., Pinloche S., Dumuis A. (2002) G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. *Int Rev Cytol* **212**, 63-132.
- Bockaert J. and Pin J. P. (1998) Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success. *C R Acad Sci III* **321**, 529-551.
- Bockaert J. and Pin J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18**, 1723-1729.
- Bockaert J., Roussignol G., Becamel C., Gavarini S., Joubert L., Dumuis A., Fagni L., and Marin P. (2004) GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochem Soc Trans* **32**, 851-855.
- Bohm S. K., Grady E. F., Bunnet N. W. (1997) Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* **322**, 1-18.
- Bonventre J. V. (1992) Phospholipase A2 and signal transduction. *J Am Soc Nephrol* **3**, 128-150.
- Bouvier M., Collins S., O'Dowd B. F., Campbell P. T., De Blasi A., Kobilka B. K., MacGregor C., Irons G. P., Caron M. G., and Lefkowitz R. J. (1989) Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor: Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J Biol Chem* **264**, 16786-16792.
- Bouvier M., Moffett S., Loisel T. P., Mouillac B., Hebert T., and Chidiac P. (1995) Palmitoylation of G-protein coupled receptors: a dynamic modification with functional consequences. *Biochem Soc T* **23**, 116-120.
- Brakeman P. R., Lanahan A. A., O'Brien R., Roche K., Barnes C. A., Huganir R. L., and Worley P. F. (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**, 284-288.

- Bristow M. R., Hershberger R. E., Port J. D., Minobe W., and Rasmussen R. (1989)  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* **35**, 295-303.
- Brown M. T. and Cooper J. A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 121-149.
- Brzostowski J. A. and Kimmel A. R. (2001) Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci* **26**, 291-297.
- Burack W. R. and Shaw A. S. (2000) Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 211-216.
- Cabrera-Vera T. M., Vanhauwe J., Thomas T. O., Medkova M., Preininger A., Mazzoni M. R., Hamm H. E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**, 765-781.
- Camp L. A. and Hofmann S. L. (1993) Purification and properties of a palmitoyl-protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras. *J Biol Chem* **268**, 22566-22574.
- Canals M., Burgueno J., Marcellino D., Cabello N., Canela E. I., Mallol J., Agnati L., Ferre S., Bouvier M., Fuxe K., Ciruela F., Lluís C., and Franco R. (2004) Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* **88**, 726-734.
- Cao T. T., Deacon H. W., Reczek D., Bretscher A., von, and Zastrow M. (1999) A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **401**, 286-290.
- Cao W., Luttrell L. M., Medvedev A. V., Pierce K. L., Daniel K. W., Dixon T. M., Lefkowitz R. J., and Collins S. (2000) Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *J Biol Chem* **275**, 38131-38134.
- Carpenter G. (2000) EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci STKE* **2000**, E1.
- Castagliuolo I., Valenick L., Liu J., and Pothoulakis C. (2000) Epidermal growth factor receptor transactivation mediates substance P-induced mitogenic responses in U-373 MG cells. *J Biol Chem* **275**, 26545-26550.

Chan P. S., Coupet J., Park H. C., Lai F., Hartupée D., Cervoni P., Dusza J. P., Albright J. D., Ru X., Mazandarani H., Tanikella T., Shepherd C., Ochalski L., Bailey T., Lock T. Y., Ning X., Taylor J. R., and Spinelli W. (1998) VPA-985, a nonpeptide orally active and selective vasopressin V2 receptor antagonist. *Adv Exp Med Biol* **449**, 439-443.

Charest P. G. and Bouvier M. (2003) Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **278**, 41541-41551.

Chen S., Spiegelberg B. D., Lin F., Dell E.J., Hamm H. E. (2004) Interaction of Gbetagamma with RACK1 and other WD40 repeat proteins. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 399-406.

Chen W., Kirkbride K. C., How T., Nelson C. D., Mo J., Frederick J. P., Wang X. F., Lefkowitz R. J., and Blobel G. C. (2003b) Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* **301**, 1394-1397.

Chen W., ten Berge D., Brown J., Ahn S., Hu L. A., Miller W. E., Caron M. G., Barak L. S., Nüsse R., and Lefkowitz R. J. (2003a) Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* **301**, 1391-1394.

Cherif S., Leach M. R., Williams D. B., and Monneret C. (2002) Synthesis of a molecular mimic of the Glc1Man9 oligoside as potential inhibitor of calnexin binding to DeltaF508 CFTR protein. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 1237-1240.

Chevesich J., Kreuz A. J., and Montell C. (1997) Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. *NEURON* **18**, 95-105.

Chidiac P., Hebert T. E., Valiquette M., Dennis M., and Bouvier M. (1994) Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* **45**, 490-499.

Choi D. J., Koch W. J., Hunter J. J., and Rockman H. A. (1997) Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **272**, 17223-17229.

Choi K. Y., Satterberg B., Lyons D. M., and Elion E. A. (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *CELL* **78**, 499-512.

Chruscinski A. J., Rohrer D. K., Schauble E., Desai K. H., Bernstein D., and Kobilka B. K. (1999) Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* **274**, 16694-16700.

- Claing A., Laporte S. A., Caron M. G., and Lefkowitz R. J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**, 61-79.
- Clark R. B. (1986) Desensitization of hormonal stimuli coupled to regulation of cyclic AMP levels, in *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research, Vol. 20* (Greengard P. and Robison G. A., eds.), pp. 151-209. Raven Press, New York.
- Colledge M. and Scott J. D. (1999) AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol* **9**, 216-221.
- Collins S., Bouvier M., Bolanowski M. A., Caron M. G., and Lefkowitz R. J. (1989) Cyclic AMP stimulates transcription of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor gene in response to short term agonist exposure. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 4853-4857.
- Cong M., Perry S. J., Hu L. A., Hanson P. I., Claing A., and Lefkowitz R. J. (2001) Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J Biol Chem* **276**, 45145-45152.
- Couve A., Kittler J. T., Uren J. M., Calver A. R., Pangalos M. N., Walsh F. S., and Moss S. J. (2001) Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci* **17**, 317-328.
- Cramer H., Schmenger K., Heinrich K., Horstmeyer A., Boning H., Breit A., Piiper A., Lundstrom K., Muller-Esterl W., and Schroeder C. (2001) Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. *Eur J Biochem* **268**, 5449-5459.
- Crespo P., Cachero T. G., Xu N., and Gutkind J. S. (1995) Dual effect of beta-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **270**, 25259-25265.
- Crespo P., Xu N., Simonds W. F., and Gutkind J. S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **369**, 418-420.
- Daaka Y., Luttrell L. M., and Lefkowitz R. J. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91.
- Dalle S., Ricketts W., Imamura T., Vollenweider P., and Olefsky J. M. (2001) Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. *J Biol Chem* **276**, 15688-15695.
- Dascal N. (2001) Ion-channel regulation by G proteins. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 391-398.



- de Rooij J., Zwartkruis F. J., Verheijen M. H., Cool R. H., Nijman S. M., Wittinghofer A., and Bos J. L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- Defea K. A., Vaughn Z. D., O'Bryan E. M., Nishijima D., Dery O., and Bunnett N. W. (2000a) The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11086-11091.
- Defea K. A., Zalevsky J., Thoma M. S., Dery O., Mullins R. D., and Bunnett N. W. (2000b) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**, 1267-1281.
- Dikic I., Tokiwa G., Lev S., Courtneidge S. A., and Schlessinger J. (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* **383**, 547-550.
- Dohlman H. G., Bouvier M., Benovic J. L., Caron M. G., and Lefkowitz R. J. (1987) The multiple membrane spanning topography of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor: Localization of the sites of binding, glycosylation and regulatory phosphorylation by limited proteolysis. *J Biol Chem* **262**, 14282-14288.
- Duncan J. A. and Gilman A. G. (1998) A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J Biol Chem* **273**, 15830-15837.
- Eason M. G., Jacinto M. T., Theiss C. T., and Liggett S. B. (1994) The palmitoylated cysteine of the cytoplasmic tail of alpha-2A- adrenergic receptor confers subtype-specific agonist-promoted downregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 11178-11182.
- Ecelbarger C. A., Chou C. L., Lolait S. J., Knepper M. A., and DiGiovanni S. R. (1996) Evidence for dual signaling pathways for V2 vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* **270**, F623-F633.
- Elorza A., Sarnago S., and Mayor F., Jr. (2000) Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* **57**, 778-783.
- Faour W. H., He Y., He Q. W., de Ladurantaye M., Quintero M., Mancini A., and Di Battista J. A. (2001) Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 31720-31731.

Faure M., Voyno-Yasenetskaya T., and Bourne H. R. (1994) cAMP and beta-gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* **269**, 7851-7854.

Ferguson S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**, 1-24.

Ferguson S. S. (2003) Receptor tyrosine kinase transactivation: fine-tuning synaptic transmission. *Trends Neurosci* **26**, 119-122.

Filipek S., Krzysko K. A., Fotiadis D., Liang Y., Saperstein D. A., Engel A., Palczewski K. (2004) A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 628-638.

Filipek S., Teller D. C., Palczewski K., Stenkamp R. (2003) The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 375-397.

Fincham V. J., James M., Frame M. C., and Winder S. J. (2000) Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J* **19**, 2911-2923.

Fotiadis D., Liang Y., Filipek S., Saperstein D. A., Engel A., Palczewski K. (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**, 127-128.

Fraser I. D., Cong M., Kim J., Rollins E. N., Daaka Y., Lefkowitz R. J., and Scott J. D. (2000) Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Curr Biol* **10**, 409-412.

Fujita N., Ishikawa S. E., Sasaki S., Fujisawa G., Fushimi K., Marumo F., and Saito T. (1995) Role of water channel AQP-CD in water retention in SIADH and cirrhotic rats. *Am J Physiol* **269**, F926-F931.

Fukushima Y., Saitoh T., Anai M., Ogihara T., Inukai K., Funaki M., Sakoda H., Onishi Y., Ono H., Fujishiro M., Ishikawa T., Takata K., Nagai R., Omata M., and Asano T. (2001) Palmitoylation of the canine histamine H2 receptor occurs at Cys(305) and is important for cell surface targeting. *Biochim Biophys Acta* **1539**, 181-191.

Gagnon A. W., Kallal L., and Benovic J. L. (1998) Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **273**, 6976-6981.

- Gainer H. (1998) Cell-specific gene expression in oxytocin and vasopressin magnocellular neurons. *Adv Exp Med Biol* **449**, 15-27.
- Gainetdinov R. R., Premont R. T., Bohn L. M., Lefkowitz R. J., Caron M. G. (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* **27**, 107-144.
- Gattone V. H., Wang X., Harris P. C., and Torres V. E. (2003) Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med* **9**, 1323-1326.
- Ghanouni P., Steenhuis J. J., Farrens D. L., and Kobilka B. K. (2001) Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5997-6002.
- Good D. W. (1998) Nerve growth factor regulates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption in thick ascending limb: modifying effects of vasopressin. *Am J Physiol* **274**, C931-C939.
- Goodman O. B., Krupnick J. G., Santini F., Gurevich V. V., Penn R. B., Gagnon A. B., Keen J. H., and Benovic J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450.
- Goodman O. B., Jr., Krupnick J. G., Gurevich V. V., Benovic J. L., and Keen J. H. (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* **272**, 15017-15022.
- Grantham J. J. and Burg M. B. (1966) Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. *Am J Physiol* **211**, 255-259.
- Grewal J. S., Luttrell L. M., and Raymond J. R. (2001) G protein-coupled receptors desensitize and down-regulate epidermal growth factor receptors in renal mesangial cells. *J Biol Chem* **276**, 27335-27344.
- Grewal S. S., Horgan A. M., York R. D., Withers G. S., Banker G. A., and Stork P. J. (2000) Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **275**, 3722-3728.
- Grimes M. L. and Miettinen H. M. (2003) Receptor tyrosine kinase and G-protein coupled receptor signaling and sorting within endosomes. *J Neurochem* **84**, 905-918.

- Groarke D. A., Drmotá T., Bahia D. S., Evans N. A., Wilson S., and Milligan G. (2001) Analysis of the C-terminal tail of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor-1 in interactions and cointernalization with beta-arrestin 1-green fluorescent protein. *Mol Pharmacol* **59**, 375-385.
- Gromiha M. M. and Selvaraj S. (2004) Inter-residue interactions in protein folding and stability. *Prog Biophys Mol Biol* **86**, 235-277.
- Gschwind A., Zwick E., Prenzel N., Leserer M., and Ullrich A. (2001) Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* **20**, 1594-1600.
- Guillet-Deniau I., Burnol A. F., and Girard J. (1997) Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem* **272**, 14825-14829.
- Gurevich V. V. and Benovic J. L. (1993) Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* **268**, 11628-11638.
- Gurevich V. V. and Gurevich E. V. (2003) The new face of active receptor bound arrestin attracts new partners. *Structure (Camb)* **11**, 1037-1042.
- Gurevich V. V. and Gurevich E. V. (2004) The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 105-111.
- Hadcock J. R., Port J. D., Gelman M. S., and Malbon C. C. (1992) Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in response to insulin. *J Biol Chem* **267**, 26017-26022.
- Hall R. A. and Lefkowitz R. J. (2002) Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res* **91**, 672-680.
- Hall R. A., Premont R. T., Chow C.-W., Blitzer J. T., Pitcher J. A., Claing A., Stoffel R. H., Barak L. S., Shenolikars S., Weinman E. J., Grinstein S., and Lefkowitz R. J. (1998) The beta-2 adrenergic receptor interacts with the Na/H-exchanger regulatory factor to control NA/H exchange. *Nature* **329**, 626-630.
- Hall R. A., Premont R. T., and Lefkowitz R. J. (1999) Heptahelical receptor signaling: Beyond the G protein paradigm. *Journal of Cell Biology* **145**, 927-932.

- Hamdan F. F., Ward S. D., Siddiqui N. A., Bloodworth L. M., and Wess J. (2002) Use of an in situ disulfide cross-linking strategy to map proximities between amino acid residues in transmembrane domains I and VII of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **41**, 7647-7658.
- Hamm H. E. and Gilchrist A. (1996) Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 189-196.
- Han M., Gurevich V. V., Vishnivetskiy S. A., Sigler P. B., and Schubert C. (2001) Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* **9**, 869-880.
- Hanke J. H., Gardner J. P., Dow R. L., Changelian P. S., Brissette W. H., Weringer E. J., Pollok B. A., and Connelly P. A. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **271**, 695-701.
- Harding S. E. and Gong H. (2004) beta-adrenoceptor blockers as agonists: coupling of beta2-adrenoceptors to multiple G-proteins in the failing human heart. *Congest Heart Fail* **10**, 181-185.
- Hawes B. E., Luttrell L. M., van Biesen T., and Lefkowitz R. J. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* **271**, 12133-12136.
- Hawes B. E., van Biesen T., Koch W. J., Luttrell L. M., and Lefkowitz R. J. (1995) Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**, 17148-17153.
- Hawtin S. R., Tobin A. B., Patel S., and Wheatley M. (2001) Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem* **276**, 38139-38146.
- Hayashi M. K. and Haga T. (1997) Palmitoylation of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: reduction in their ability to activate G proteins by mutation of a putative palmitoylation site, cysteine 457, in the carboxyl- terminal tail. *Arch Biochem Biophys* **340**, 376-382.
- Hebert T. E., Moffett S., Morello J. P., Loisel T. P., Bichet D. G., Barret C., and Bouvier M. (1996) A peptide derived from a  $\beta$ 2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**, 16384-16392.
- Heck D. A. and Bylund D. B. (1998) Differential down-regulation of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *Life Sci* **62**, 1467-1472.

- Heding A. (2004) Use of the BRET 7TM receptor/beta-arrestin assay in drug discovery and screening. *Expert Rev Mol Diagn* **4**, 403-411.
- Heldin C. H., Ostman A., and Ronnstrand L. (1998) Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* **1378**, F79-113.
- Helenius A. and Aebi M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**, 1019-1049.
- Hermans E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**, 25-44.
- Herrlich A., Daub H., Knebel A., Herrlich P., Ullrich A., Schultz G., and Gudermann T. (1998) Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8985-8990.
- Heuss C. and Gerber U. (2000) G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* **23**, 469-475.
- Hirsch J. A., Schubert C., Gurevich V. V., and Sigler P. B. (1999) The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *CELL* **97**, 257-269.
- Horstmeyer A., Cramer H., Sauer T., Muller-Esterl W., and Schroeder C. (1996) Palmitoylation of endothelin receptor A. *J Biol Chem* **271**, 20811-20819.
- Hu L. A., Tang Y., Miller W. E., Cong M., Lau A. G., Lefkowitz R. J., and Hall R. A. (2000) beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **275**, 38659-38666.
- Huber A. (2001) Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction. *Eur J Neurosci* **14**, 769-776.
- Hukovic N., Panetta R., Kumar U., Rocheville M., and Patel Y. C. (1998) The cytoplasmic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase and in mediating desensitization and internalization. *J Biol Chem* **273**, 21416-21422.
- Hur E. M. and Kim K. T. (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* **14**, 397-405.

- Iiri T., Backlund P. S. J., Jones T. L. Z., Wedegaertner P. B., and Bourne H. R. (1996) Reciprocal regulation of G $\alpha$  by palmitate and the beta/gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14592-14597.
- Inglese J., Koch W. J., Caron M. G., and Lefkowitz R. J. (1992) Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* **359**, 147-150.
- Innamorati G., Sadeghi H., and Birnbaumer M. (1996) A fully active nonglycosylated V2 vasopressin receptor. *Mol Pharmacol* **50**, 467-473.
- Innamorati G., Sadeghi H., Eberle A. N., and Birnbaumer M. (1997) Phosphorylation of the V2 vasopressin receptor. *J Biol Chem* **272**, 2486-2492.
- Innamorati G., Sadeghi H. M., Tran N. T., and Birnbaumer M. (1998) A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2222-2226.
- Inoue T., Nonoguchi H., and Tomita K. (2001) Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc Res* **51**, 470-480.
- Jelsema C. L. and Axelrod J. (1987) Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segment by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3623-3627.
- Jensen A. A., Pedersen U. B., Kiemer A., Din N., and Andersen P. H. (1995) Functional importance of the carboxyl tail cysteine residues in the human D1 dopamine receptor. *J Neurochem* **65**, 1325-1331.
- Jockers R., Angers S., Da Silva A., Benaroch P., Strosberg A. D., Bouvier M., and Marullo S. (1999) Beta-2 adrenergic receptor down-regulation: Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J Biol Chem* **274**, 28900-28908.
- Ju H., Venema V. J., Marrero M. B., and Venema R. C. (1998) Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **273**, 24025-24029.
- Karoor V., Wang L., Wang H. Y., and Malbon C. C. (1998) Insulin stimulates sequestration of beta-adrenergic receptors and enhanced association of beta-adrenergic receptors with Grb2 via tyrosine 350. *J Biol Chem* **273**, 33035-33041.
- Kato A., Ozawa F., Saitoh Y., Fukazawa Y., Sugiyama H., and Inokuchi K. (1998) Novel members of the Ves1/Homer family of PDZ proteins that bind metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* **273**, 23969-23975.

- Kawate N. and Menon K. M. (1994) Palmitoylation of luteinizing hormone/human choriogonadotropin receptors in transfected cells. *J Biol Chem* **269**, 30651-30658.
- Kawate N., Peegel H., and Menon K. M. (1997) Role of palmitoylation of conserved cysteine residues of luteinizing hormone/human choriogonadotropin receptors in receptor down-regulation. *Mol Cell Endocrinol* **127**, 211-219.
- Kaykas A., Yang-Snyder J., Heroux M., Shah K. V., Bouvier M., and Moon R. T. (2004) Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization. *Nat Cell Biol* **6**, 52-58.
- Kefalas P., Brown T. R., and Brickell P. M. (1995) Signalling by the p60c-src family of protein-tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 551-563.
- Kelly D. J., Cox A. J., Gow R. M., Zhang Y., Kemp B. E., and Gilbert R. E. (2004) Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension* **44**, 195-202.
- Kenakin T. (1995) Agonist-receptor efficacy II: agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 232-238.
- Kenakin T. (1997) Proteans agonists. Keys to receptor active states? *Ann. New York Acad. Science* **812**, 116-125.
- Kenakin T. (2002) Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 349-379.
- Kenakin T. (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 346-354.
- Kenakin T. (2004) Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol* **65**, 2-11.
- Kennedy M. and Limbird L. E. (1994) Palmitoylation of the alpha-2A-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **269**, 31915-31922.
- Kikuchi A. and Williams L. T. (1996) Regulation of interaction of ras p21 with RalGDS and Raf-1 by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 588-594.



- Kim J., Ahn S., Ren X. R., Whalen E. J., Reiter E., Wei H., and Lefkowitz R. J. (2005) Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for  $\beta$ -arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1442-1447.
- Kim Y. M., Barak L. S., Caron M. G., and Benovic J. L. (2002) Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem* **277**, 16837-16846.
- Kirk K. L. (1988) Binding and internalization of a fluorescent vasopressin analogue by collecting duct cells. *Am J Physiol* **255**, C622-C632.
- Kitano J., Nishida M., Itsukaichi Y., Minami I., Ogawa M., Hirano T., Mori Y., and Nakanishi S. (2003) Direct interaction and functional coupling between metabotropic glutamate receptor subtype 1 and voltage-sensitive Cav2.1 Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem* **278**, 25101-25108.
- Knall C. and Johnson G. L. (1998) G-protein regulatory pathways: rocketing into the twenty-first century. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**, 137-146.
- Knepper M. A. (1997) Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol* **272**, F3-12.
- Koch W. J., Hawes B. E., Inglese J., Luttrell L. M., and Lefkowitz R. J. (1994) Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem* **269**, 6193-6197.
- Koch W. J., Inglese J., Stone W. C., and Lefkowitz R. J. (1993) The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**, 8256-8260.
- Kohout T. A., Lin F. S., Perry S. J., Conner D. A., and Lefkowitz R. J. (2001) beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1601-1606.
- Kojro E. and Fahrenholz F. (1995) Ligand-induced cleavage of the V2 vasopressin receptor by a plasma membrane metalloproteinase. *J Biol Chem* **270**, 6476-6481.
- Kolch W., Heidecker G., Kochs G., Hummel R., Vahidi H., Mischak H., Finkenzeller G., Marme D., and Rapp U. R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**, 249-252.

- Kosugi S. and Mori T. (1996) Cysteine-699, a possible palmitoylation site of the thyrotropin receptor, is not crucial for cAMP or phosphoinositide signaling but is necessary for full surface expression. *Biochem Biophys Res Commun* **221**, 636-640.
- Kovoor A., Celver J., Abdryashitov R. I., Chavkin C., and Gurevich V. V. (1999) Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J Biol Chem* **274**, 6831-6834.
- Kraft K., Olbrich H., Majoul I., Mack M., Proudfoot A., and Oppermann M. (2001) Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *J Biol Chem* **276**, 34408-34418.
- Krupnick J. G. and Benovic J. L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 289-319.
- Kurose H. (2003) Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci* **74**, 155-161.
- Kuwahara M., Fushimi K., Terada Y., Bai L., Marumo F., and Sasaki S. (1995) cAMP-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **270**, 10384-10387.
- Kwon T. H., Frokiaer J., Knepper M. A., and Nielsen S. (1998) Reduced AQP1, -2, and -3 levels in kidneys of rats with CRF induced by surgical reduction in renal mass. *Am J Physiol* **275**, F724-F741.
- Lachance M., Ethier N., Wolbring G., Schnetkamp P. P., Hebert T. E. (1999) Stable association of G proteins with beta 2AR is independent of the state of receptor activation. *Cell Signal* **11**, 523-533.
- Laporte S. A., Oakley R. H., Zhang J., Holt J. A., Ferguson S. S., Caron M. G., Barak L. S. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3712-3727.
- Laszlo F. A., Laszlo F., Jr., and De Wied D. (1991) Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. *Pharmacol Rev* **43**, 73-108.
- Lawler O. A., Miggin S. M., and Kinsella B. T. (2001) Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *J Biol Chem* **276**, 33596-33607.

- Lee F. J., Xue S., Pei L., Vukusic B., Chery N., Wang Y., Wang Y. T., Niznik H. B., Yu X. M., and Liu F. (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *CELL* **111**, 219-230.
- Lefkowitz R. J. and Caron M. G. (1990) The adrenergic receptors. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **24**, 1-8.
- Lefkowitz R. J., Pierce K. L., and Luttrell L. M. (2002) Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol Pharmacol* **62**, 971-974.
- Lefkowitz R. J. and Whalen E. J. (2004) beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 162-168.
- Lev S., Moreno H., Martinez R., Canoll P., Peles E., Musacchio J. M., Plowman G. D., Rudy B., and Schlessinger J. (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* **376**, 737-745.
- Levitzki A. and Gilon C. (1995) Tyrphostins as molecular tools and potential antiproliferative drugs. *Trends Pharmacol Sci* .
- Liggett S. B., Tepe N. M., Lorenz J. N., Canning A. M., Jantz T. D., Mitarai S., Yatani A., and Dorn G. W. (2000) Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *CIRCULATION* **101**, 1707-1714.
- Lin F. T., Chen W., Shenoy S., Cong M., Exum S. T., and Lefkowitz R. J. (2002) Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* **41**, 10692-10699.
- Lin F. T., Miller W. E., Luttrell L. M., and Lefkowitz R. J. (1999) Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **274**, 15971-15974.
- Liu F., Wan Q., Pristupa Z. B., Yu X. M., Wang Y. T., and Niznik H. B. (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* **403**, 274-280.
- Liu J., Liao Z., Camden J., Griffin K. D., Garrad R. C., Santiago-Perez L. I., Gonzalez F. A., Seye C. I., Weisman G. A., and Erb L. (2004) Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with

- Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J Biol Chem* **279**, 8212-8218.
- Lohse M. J., Benovic J. L., Caron M. G., and Lefkowitz R. J. (1990) Multiple pathways of rapid  $\beta_2$ -adrenergic receptor desensitization: Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* **265**, 3202-3209.
- Loisel T. P., Adam L., Hebert T., and Bouvier M. (1996) Agonist Stimulation Increases the Turnover Rate of Beta2AR-bound Palmitate and Promotes Receptor Depalmitoylation. *Biochemistry* **35**, 15923-15932.
- Loisel T. P., Ansanay H., Adam L., Marullo S., Seifert R., Lagace M., and Bouvier M. (1999) Activation of the beta(2)-adrenergic receptor-Galphi(s) complex leads to rapid depalmitoylation and inhibition of repalmitoylation of both the receptor and Galphi(s). *J Biol Chem* **274**, 31014-31019.
- Lopez-Illasaca M. (1998) Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol* **56**, 269-277.
- Lopez-Sendon J., Swedberg K., McMurray J., Tamargo J., Maggioni A. P., Dargie H., Tendera M., Waagstein F., Kjekshus J., Lechat P., and Torp-Pedersen C. (2004) Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J* **25**, 1341-1362.
- Lowe M. D., Grace A. A., Vandenberg J. I., and Kaumann A. J. (1998) Action potential shortening through the putative beta4-adrenoceptor in ferret ventricle: comparison with beta1- and beta2-adrenoceptor-mediated effects. *British Journal of Pharmacology* **124**, 1341-1344.
- Luttrell D. K. and Luttrell L. M. (2003) Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases. *Assay Drug Dev Technol* **1**, 327-338.
- Luttrell D. K. and Luttrell L. M. (2004) Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* **23**, 7969-7978.
- Luttrell L., Ferguson S. S., Daaka Y., Miller W. E., Maudsley S., Della Rocca G. J., Lin F. T., Kawakatsu H., Owada K., Luttrell D. K., Caron M. G., and Lefkowitz R. J. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta-2-adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661.
- Luttrell L. M. (2003) 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* **30**, 117-126.

- Luttrell L. M., Della R. G., van Biesen T., Luttrell D. K., and Lefkowitz R. J. (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem* **272**, 4637-4644.
- Luttrell L. M. and Lefkowitz R. J. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**, 455-465.
- Luttrell L. M., Roudabush F. L., Choy E. W., Miller W. E., Field M. E., Pierce K. L., and Lefkowitz R. J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2449-2454.
- Magee A. I., Gutierrez L., McKay I. A., Marshall J., and Hall A. (1987) Dynamic fatty acylation of p21n-ras. *EMBO J* **6**, 3353-3357.
- Mahajan V. B., Pai K. S., Lau A., and Cunningham D. D. (2000) Creatine kinase, an ATP-generating enzyme, is required for thrombin receptor signaling to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12062-12067.
- Marchese A. and Benovic J. L. (2001) Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* **276**, 45509-45512.
- Marchese A., Chen C., Kim Y. M., and Benovic J. L. (2003) The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* **28**, 369-376.
- Marinissen M. J. and Gutkind J. S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 368-376.
- Marrache A. M., Gobeil F., Jr., Bernier S. G., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Choufani S., Bkaily G., Bourdeau A., Sirois M. G., Vazquez-Tello A., Fan L., Joyal J. S., Filep J. G., Varma D. R., Ribeiro-Da-Silva A., and Chemtob S. (2002) Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* **169**, 6474-6481.
- Marrero M. B., Schieffer B., Paxton W. G., Heerdt L., Berk B. C., Delafontaine P., and Bernstein K. E. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* **375**, 247-250.
- Marrero M. B., Venema V. J., Ju H., He H., Liang H., Caldwell R. B., and Venema R. C. (1999) Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem J* **343 Pt 2**, 335-340.
- Martin N. P., Lefkowitz R. J., and Shenoy S. K. (2003) Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist promoted Ubiquitination. *J Biol Chem* **278**, 45954-45959.

- Masilamani S., Knepper M.A., and Burg M.B. (1999) in *The Kidney* (Brenner B.M. and Philadelphia P.A., eds.), pp. 595-635.
- McDonald P. H., Chow C. W., Miller W. E., Laporte S. A., Field M. E., Lin F. T., Davis R. J., and Lefkowitz R. J. (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**, 1574-1577.
- McIlhinney R. A. S., Pelly S. J., Chadwick J. K., and Cowley G. P. (1985) Studies on the attachment of myristic and palmitic acid to cell proteins in human squamous carcinoma cell lines: evidence for two pathways. *EMBO J* **4**, 1145-1152.
- McLatchie L. M., Fraser N. J., Main M. J., Wise A., Brown J., Thompson N., Solari R., Lee M. G., and Foord S. M. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**, 333-339.
- Mercier J. F., Salahpour A., Angers S., Breit A., and Bouvier M. (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277**, 44925-44931.
- Mialet-Perez J., Green S. A., Miller W. E., and Liggett S. B. (2004) A primate-dominant third glycosylation site of the beta2-adrenergic receptor routes receptors to degradation during agonist regulation. *J Biol Chem* **279**, 38603-38607.
- Milenkovic I., Weick M., Wiedemann P., Reichenbach A., and Bringmann A. (2003) P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1211-1220.
- Miller W. E. and Lefkowitz R. J. (2001) Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 139-145.
- Miller W. E., Maudsley S., Ahn S., Khan K. D., Luttrell L. M., and Lefkowitz R. J. (2000) beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem* **275**, 11312-11319.
- Milligan G. (2004) Applications of bioluminescence- and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. *Eur J Pharm Sci* **21**, 397-405.
- Milligan G. and Grassie M. A. (1997) How do G-proteins stay at the plasma membrane? *Essays Biochem* **32**, 49-60.

- Milligan G. and White J. H. (2001) Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 513-518.
- Mischak H., Seitz T., Janosch P., Eulitz M., Steen H., Schellerer M., Philipp A., and Kolch W. (1996) Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol Cell Biol* **16**, 5409-5418.
- Miserey-Lenkei S., Parnot C., Bardin S., Corvol P., and Clauser E. (2002) Constitutive internalization of constitutively active angiotensin II AT(1A) receptor mutants is blocked by inverse agonists. *J Biol Chem* **277**, 5891-5901.
- Moench S. J., Moreland J., Steward D. H., and Dewey T. G. (1994) Fluorescent studies of the location and membrane accessibility of the palmitoylation sites of rhodopsin. *Biochemistry* **33**, 5791-5796.
- Moffett S., Adam L., Bonin H., Loisel T. P., Bouvier M., and Mouillac B. (1996) Palmitoylated cysteine 341 modulates phosphorylation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 21490-21497.
- Moffett S., Mouillac B., Bonin H., and Bouvier M. (1993) Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human  $\beta_2$ -adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J* **12**, 349-356.
- Moffett S., Rousseau G., Lagace M., and Bouvier M. (2001) The palmitoylation state of the beta(2)-adrenergic receptor regulates the synergistic action of cyclic AMP-dependent protein kinase and beta-adrenergic receptor kinase involved in its phosphorylation and desensitization. *J Neurochem* **76**, 269-279.
- Morello J.-P., Salahpour A., Laperriere A., Bernier V., Arthus M. F., Lonergan M., Petaja-Repo U., Angers S., Morin D., Bichet D. G., and Bouvier M. (2000) Pharmacological chaperones promote cell surface expression and functional rescue of V2-vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* (in press).
- Morello J. P. and Bichet D. G. (2001) Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* **63**, 607-630.
- Morello J. P., Salahpour A., Petaja-Repo U. E., Laperriere A., Lonergan M., Arthus M. F., Nabi I. R., Bichet D. G., and Bouvier M. (2001) Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus. *Biochemistry* **40**, 6766-6775.
- Morfis M., Christopoulos A., and Sexton P. M. (2003) RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends Pharmacol Sci* **24**, 596-601.

- Morin D., Cotte N., Balestre M. N., Mouillac B., Manning M., Breton C., and Barberis C. (1998) The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities. *FEBS Lett* **441**, 470-475.
- Mukhopadhyay D., Tsiokas L., Zhou X. M., Foster D., Brugge J. S., and Sukhatme V. P. (1995) Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* **375**, 577-581.
- Murasawa S., Mori Y., Nozawa Y., Gotoh N., Shibuya M., Masaki H., Maruyama K., Tsutsumi Y., Moriguchi Y., Shibasaki Y., Tanaka Y., Iwasaka T., Inada M., and Matsubara H. (1998) Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *Circ Res* **82**, 1338-1348.
- Murayama T. and Ui M. (1983) Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J Biol Chem* **258**, 3319-3326.
- Nebigil C. G., Launay J. M., Hickel P., Tournois C., and Maroteaux L. (2000a) 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2591-2596.
- Nebigil C. G., Launay J. M., Hickel P., Tournois C., and Maroteaux L. (2000b) 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2591-2596.
- Neubig R. R. and Siderovski D. P. (2002) Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 187-197.
- Neves S. R., Ram P. T., and Iyengar R. (2002) G protein pathways. *Science* **296**, 1636-1639.
- Ng G. Y., Mouillac B., George S., Caron M., Dennis M., Bouvier M., and O'Dowd B. (1994) Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human D1 dopamine receptor. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol Sec* **267**, 7-19.
- Nielsen S., Chou C. L., Marples D., Christensen E. I., Kishore B. K., and Knepper M. A. (1995) Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1013-1017.



- Nielsen S., DiGiovanni S. R., Christensen E. I., Knepper M. A., and Harris H. W. (1993) Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11663-11667.
- Nielsen S., Frokiaer J., Marples D., Kwon T. H., Agre P., and Knepper M. A. (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* **82**, 205-244.
- North W. G. (2000) Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. *Exp Physiol* **85 Spec No**, 27S-40S.
- Nussenzveig D. R., Heinfliink M., and Gershengorn M. C. (1993) Agonist-stimulated internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor is dependent on two domains in the receptor carboxy terminus. *J Biol Chem* **268**, 2389-2392.
- O'Brien P. J. and Zatz M. (1984) Acylation of bovine rhodopsin by [<sup>3</sup>H]palmitic acid. *J Biol Chem* **259**, 5054-5057.
- O'Dowd B. F., Hnатовich M., Caron M. G., Lefkowitz R. J., and Bouvier M. (1989a) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* **264**, 7564-7569.
- O'Dowd B. F., Hnатовich M., Caron M. G., Lefkowitz R. J., and Bouvier M. (1989b) Palmitoylation of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor. Mutation of CYS<sup>341</sup> in the carboxyl tail leads to an uncoupled non-palmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* **264**, 7564-7569.
- Oak J. N., Lavine N., and Van Tol H. H. (2001b) Dopamine D(4) and D(2L) Receptor Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Dependent on trans-Activation of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor. *Mol Pharmacol* **60**, 92-103.
- Oak J. N., Lavine N., and Van Tol H. H. (2001a) Dopamine D(4) and D(2L) Receptor Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Dependent on trans-Activation of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor. *Mol Pharmacol* **60**, 92-103.
- Oakley R. H., Laporte S. A., Holt J. A., Barak L. S., and Caron M. G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* **274**, 32248-32257.

- Oakley R. H., Laporte S. A., Holt J. A., Barak L. S., and Caron M. G. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J Biol Chem* **276**, 19452-19460.
- Oakley R. H., Laporte S. A., Holt J. A., Caron M. G., and Barak L. S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**, 17201-17210.
- Ogier-Denis E., Pattingre S., El Benna J., and Codogno P. (2000) Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J Biol Chem* **275**, 39090-39095.
- Okamoto Y., Ninomiya H., Tanioka M., Sakamoto A., Miwa S., and Masaki T. (1998) Cysteine residues in the carboxyl terminal domain of the endothelin-B receptor are required for coupling with G-proteins. *J Cardiovasc Pharmacol* **31 Suppl 1**, S230-S232.
- Ovchinnikov Y. A., Abdulaev N. G., and Bogachuk A. S. (1988) Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett* **230**, 1-5.
- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le T., I, Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., and Miyano M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
- Palmer T. M. and Stiles G. L. (2000) Identification of threonine residues controlling the agonist dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor. *Mol Pharmacol* **57**, 539-545.
- Pao C. S. and Benovic J. L. (2002) Phosphorylation-independent desensitization of G protein-coupled receptors? *Sci STKE* **153**, PE42.
- Papoucheva E., Dumuis A., Sebben M., Richter D. W., and Ponimaskin E. G. (2004) The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with Gi protein. *J Biol Chem* **279**, 3280-3291.
- Paquet M. E. and Williams D. B. (2002) Mutant MHC class I molecules define interactions between components of the peptide-loading complex. *Int Immunol* **14**, 347-358.
- Pearson G., Robinson F., Beers G. T., Xu B. E., Karandikar M., Berman K., and Cobb M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183.

- Penela P., Ribas C., Mayor F. Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* **15**, 973-981.
- Percherancier Y., Planchenault T., Valenzuela-Fernandez A., Virelizier J. L., Arenzana-Seisdedos F., and Bachelier F. (2001) Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *J Biol Chem* **276**, 31936-31944.
- Perroy J., Adam L., Qanbar R., Chenier S., and Bouvier M. (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* **22**, 3816-3824.
- Perry S. J. and Lefkowitz R. J. (2002) Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends Cell Biol* **12**, 130-138.
- Petaja-Repo U. E., Hogue M., Bhalla S., Laperriere A., Morello J. P., and Bouvier M. (2002) Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *EMBO J* **21**, 1628-1637.
- Phillips P. A., Grant S. L., Davidson A. F., Risvanis J., Stephenson J., and Gow C. B. (1994) Epidermal growth factor antagonizes vasopressin in vivo and in vitro. *Kidney Int* **45**, 1028-1036.
- Pickart C. M. (2001) Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* **8**, 499-504.
- Pierce K. L. and Lefkowitz R. J. (2001) Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 727-733.
- Pierce K. L., Tohgo A., Ahn S., Field M. E., Luttrell L. M., and Lefkowitz R. J. (2001) Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J Biol Chem* **276**, 23155-23160.
- Pippig S., Andexinger S., and Lohse M. J. (1995) Sequestration and recycling of beta2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol* **47**, 666-676.
- Pitcher J. A., Freedman N. J., Lefkowitz R. J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**, 653-692.
- Pitcher J. A., Payne E. S., Csontos C., DePaoli-Roach A. A., and Lefkowitz R. J. (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci US A* **92**, 8343-8347.

- Pitcher J. A., Tesmer J. J., Freeman J. L., Capel W. D., Stone W. C., and Lefkowitz R. J. (1999) Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **274**, 34531-34534.
- Pizard A., Blaukat A., Michineau S., Dikic I., Muller-Esterl W., Alhenc-Gelas F., and Rajerison R. M. (2001) Palmitoylation of the human bradykinin B2 receptor influences ligand efficacy. *Biochemistry* **40**, 15743-15751.
- Pleskoff O., Treboute C., BreLOT A., Heveker N., Seman M., and Alizon M. (1997) Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* **276**, 1874-1878.
- Ponimaskin E., Dumuis A., Gaven F., Barthet G., Heine M., Glebov K., Richter D. W., and Oppermann M. (2005) Palmitoylation of the 5-Hydroxytryptamine(4a) Receptor Regulates Receptor Phosphorylation, Desensitization and  $\beta$ Arrestin mediated Endocytosis. *Mol Pharmacol*.
- Powis G. and Phil D. (1994) Inhibitors of phosphatidylinositol signalling as antiproliferative agents. *Cancer Metastasis Rev* **13**, 91-103.
- Prenzel N., Zwick E., Daub H., Leserer M., Abraham R., Wallasch C., and Ullrich A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**, 884-888.
- Prezeau L., Richman J. G., Edwards S. W., and Limbird L. E. (1999) The zeta isoform of 14-3-3 proteins interacts with the third intracellular loop of different  $\alpha$ 2-adrenergic receptor subtypes. *J Biol Chem* **274**, 13462-13469.
- Prossnitz E. R. (2004) Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. *Life Sci* **75**, 893-899.
- Pyne N. J., Waters C., Moughal N. A., Sambhi B. S., and Pyne S. (2003) Receptor tyrosine kinase-GPCR signal complexes. *Biochem Soc Trans* **31**, 1220-1225.
- Qanbar R. and Bouvier M. (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther* **97**, 1-33.
- Rands E., Candelore M. R., Cheung A. H., Hill W. S., Strader C. D., and Dixon R. A. F. (1990) Mutational analysis of  $\beta$ -adrenergic receptor glycosylation. *J Biol Chem* **265**, 10759-10764.

- Rebois R. V. and Hebert T. E. (2003) Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. *Receptors Channels* **9**, 169-194.
- Ren X. R., Reiter E., Ahn S., Kim J., Chen W., and Lefkowitz R. J. (2005) Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and  $\beta$ -arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1448-1453.
- Resh M. D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 1-16.
- Riese D. J. and Stern D. F. (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* **20**, 41-48.
- Rockman H. A., Koch W. J., and Lefkowitz R. J. (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206-212.
- Ross N. W. and Braun P. E. (1988) Acylation in vitro of the myelin proteolipid protein and comparison with acylation in vivo: acylation of a cysteine occurs nonenzymatically. *J Neurosci Res* **21**, 35-44.
- Roychowdhury S., Panda D., Wilson L., Rasenick M. M. (1999) G protein alpha subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem* **274**, 13485-13490.
- Ruddon R. W. and Bedows E. (1997) Assisted protein folding. *J Biol Chem* **272**, 3125-3128.
- Sadeghi H. and Birnbaumer M. (1999) O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology* **9**, 731-737.
- Sadeghi H., Robertson G. L., Bichet D. G., Innamorati G., and Birnbaumer M. (1997) Biochemical basis of partial nephrogenic diabetes insipidus phenotypes. *Mol Endo* **11**, 1806-1813.
- Saito S., Frank G. D., Mifune M., Ohba M., Utsunomiya H., Motley E. D., Inagami T., and Eguchi S. (2002) Ligand-independent trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor by reactive oxygen species requires protein kinase C-delta and c-Src. *J Biol Chem* **277**, 44695-44700.
- Salahpour A., Angers S., and Bouvier M. (2000) Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 163-168.
- Salomon Y., Londos C., and Rodbell M. (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem* **58**, 541-548.

- Salpeter S. R. (2004) Cardiovascular safety of beta(2)-adrenoceptor agonist use in patients with obstructive airway disease: a systematic review. *Drugs Aging* **21**, 405-414.
- Samama P., Cotecchia S., Costa T., and Lefkowitz R. J. (1993) A mutation-induced activated state of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **268**(7), 4625-4636.
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santini F., Gaidarov I., and Keen J. H. (2002) G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery. *J Cell Biol* **156**, 665-676.
- Schlondorff J. and Blobel C. P. (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* **112** ( Pt 21), 3603-3617.
- Schmitt J. M. and Stork P. J. (2002) PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell* **9**, 85-94.
- Schulein R., Liebenhoff U., Muller H., Birnbaumer M., and Rosenthal W. (1996) Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *Biochem J* **313** ( Pt 2), 611-616.
- Schulein R., Zuhlke K., Oksche A., Hermosilla R., Furkert J., and Rosenthal W. (2000) The role of conserved extracellular cysteine residues in vasopressin V2 receptor function and properties of two naturally occurring mutant receptors with additional extracellular cysteine residues. *FEBS Lett* **466**, 101-106.
- Scott M. G., Benmerah A., Muntaner O., and Marullo S. (2002) Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J Biol Chem* **277**, 3552-3559.
- Seidel M. G., Klinger M., Freissmuth M., and Holler C. (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**, 25833-25841.
- Serradeil-Le G. C., Lacour C., Valette G., Garcia G., Foulon L., Galindo G., Bankir L., Pouzet B., Guillon G., Barberis C., Chicot D., Jard S., Vilain P., Garcia C., Marty E., Raufaste D., Brossard G., Nisato D., Maffrand J. P., and Le Fur G. (1996) Characterization of SR 121463A, a highly potent and selective, orally active vasopressin V2 receptor antagonist. *J Clin Invest* **98**, 2729-2738.

- Seta K., Nanamori M., Modrall J. G., Neubig R. R., and Sadoshima J. (2002) AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol Chem* **277**, 9268-9277.
- Sever S. (2002) Dynamin and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 463-467.
- Shayakul C., Steel A., and Hediger M. A. (1996) Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts. *J Clin Invest* **98**, 2580-2587.
- Sheng M. and Sala C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1-29.
- Shenoy S. K. and Lefkowitz R. J. (2003a) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* **375**, 503-515.
- Shenoy S. K. and Lefkowitz R. J. (2003b) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* **278**, 14498-14506.
- Shenoy S. K., McDonald P. H., Kohout T. A., and Lefkowitz R. J. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**, 1307-1313.
- Shih M., Lin F., Scott J. D., Wang H. Y., and Malbon C. C. (1999) Dynamic complexes of beta2-adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J Biol Chem* **274**, 1588-1595.
- Simpson C. S. and Morris B. J. (1995) Induction of c-fos and zif/268 gene expression in rat striatal neurons, following stimulation of D1-like dopamine receptors, involves protein kinase A and protein kinase C. *Neuroscience* **68**, 97-106.
- Slessareva J. E., Ma H., Depree K. M., Flood L. A., Bae H., Cabrera-Vera T. M., Hamm H. E., Graber S. G. (2003) Closely related G-protein-coupled receptors use multiple and distinct domains on G-protein-alpha-subunits for selective coupling. *J Biol Chem* **278**, 50530-50536.
- Smotrys J. E. and Linder M. E. (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem* **73**, 559-587.
- Soskic V., Nyakatura E., Roos M., Muller-Esterl W., and Godovac-Zimmermann J. (1999) Correlations in palmitoylation and multiple phosphorylation of rat bradykinin B2 receptor in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **274**, 8539-8545.

- Spiro R. G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R-56R.
- St Jules R. S. and O'Brien P. J. (1986) The acylation of rat rhodopsin in vitro and in vivo. *Experimental Eye Research* **43**, 929-940.
- Strasser R. H., Ihl-Vahl R., and Marquetant R. (1992) Molecular biology of adrenergic receptors. *J Hypertens* **10**, 501-506.
- Sun Y., Cheng Z., Ma L., and Pei G. (2002) Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **277**, 49212-49219.
- Tahara A., Saito M., Sugimoto T., Tomura Y., Wada K., Kusayama T., Tsukada J., Ishii N., Yatsu T., Uchida W., and Tanaka A. (1998) Pharmacological characterization of the human vasopressin receptor subtypes stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* **125**, 1463-1470.
- Tanimoto T., Lungu A. O., and Berk B. C. (2004) Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **94**, 1050-1058.
- Taussig R. and Zimmermann G. (1998) Tyrosine-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **32**, 81-98.
- Tazawa H., Takahashi S., and Zilliacus J. (2003) Interaction of the parathyroid hormone receptor with the 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta* **1620**, 32-38.
- Terada Y., Tomita K., Nonoguchi H., Yang T., and Marumo F. (1993) Different localization and regulation of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. *J Clin Invest* **92**, 2339-2345.
- Terrillon S., Barberis C., and Bouvier M. (2004) Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1548-1553.
- Terrillon S. and Bouvier M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**, 30-34.



- Terrillon S., Durroux T., Mouillac B., Breit A., Ayoub M. A., Taulan M., Jockers R., Barberis C., and Bouvier M. (2003) Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive. *Mol Endocrinol* **17**, 677-691.
- Terris J., Ecelbarger C. A., Nielsen S., and Knepper M. A. (1996) Long-term regulation of four renal aquaporins in rats. *Am J Physiol* **271**, F414-F422.
- Thibonnier M., Conarty D. M., Preston J. A., Wilkins P. L., Berti-Mattera L. N., and Mattera R. (1998) Molecular pharmacology of human vasopressin receptors. *Adv Exp Med Biol* **449**, 251-276.
- Tholanikunnel B. G. and Malbon C. C. (1997) A 20-nucleotide (A + U)-rich element of beta2-adrenergic receptor (beta2AR) mRNA mediates binding to beta2AR-binding protein and is obligate for agonist-induced destabilization of receptor mRNA. *J Biol Chem* **272**, 11471-11478.
- Tohgo A., Choy E. W., Gesty-Palmer D., Pierce K. L., Laporte S., Oakley R. H., Caron M. G., Lefkowitz R. J., and Luttrell L. M. (2003) The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* **278**, 6258-6267.
- Tohgo A., Pierce K. L., Choy E. W., Lefkowitz R. J., and Luttrell L. M. (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* **277**, 9429-9436.
- Tominaga L., Ogawa Y., Taniguchi M., Ohno K., Matsuda J., Oshima A., Suzuki Y., and Nanba E. (2001) Galactonojirimycin derivatives restore mutant human beta-galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain & Development* **23**, 284-287.
- Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., Baudet V., Boissin P., Boursier E., Loriolle F., and . (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**, 15771-15781.
- Tsao P., Cao T., and Von Zastrow M. (2001) Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 91-96.
- Tu J. C., Xiao B., Yuan J. P., Lanahan A. A., Leoffert K., Li M., Linden D. J., and Worley P. F. (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group I metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *NEURON* **21**, 717-726.
- Tu Y., Wang J., Ross E. M. (1997) Inhibition of brain Gz GAP and other RGS proteins by palmitoylation of G protein alpha subunits. *Science* **278**, 1132-1135.

- Ungerer M., Parruti G., Bohm M., Puzicha M., DeBlasi A., Erdmann E., and Lohse M. J. (1994) Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* **74**, 206-213.
- Ushio-Fukai M., Alexander R. W., Akers M., Lyons P. R., Lassegue B., Griendling K. K. (1999) Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunit of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **55**, 142-149.
- Valiquette M., Parent S., Loisel T. P., and Bouvier M. (1995) Mutation of tyrosine-141 inhibits insulin-promoted tyrosine phosphorylation and increased responsiveness of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *EMBO J* **14**, 5542-5549.
- van Biesen T., Hawes B. E., Luttrell D. K., Krueger K. M., Touhara K., Porfiri E., Sakaue M., Luttrell L. M., and Lefkowitz R. J. (1995) Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* **376**, 781-784.
- van Biesen T., Hawes B. E., Raymond J. R., Luttrell L. M., Koch W. J., and Lefkowitz R. J. (1996) G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* **271**, 1266-1269.
- Veit M., Sachs K., Heckelmann M., Maretzki D., Hofmann K. P., and Schmidt M. F. (1998) Palmitoylation of rhodopsin with S-protein acyltransferase: enzyme catalyzed reaction versus autocatalytic acylation. *Biochim Biophys Acta* **1394**, 90-98.
- Venema R. C., Venema V. J., Eaton D. C., and Marrero M. B. (1998) Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J Biol Chem* **273**, 30795-30800.
- Vishnivetskiy S. A., Hirsch J. A., Velez M. G., Gurevich Y. V., and Gurevich V. V. (2002) Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J Biol Chem* **277**, 43961-43967.
- Vishnivetskiy S. A., Paz C. L., Schubert C., Hirsch J. A., Sigler P. B., and Gurevich V. V. (1999) How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J Biol Chem* **274**, 11451-11454.
- Vishnivetskiy S. A., Schubert C., Climaco G. C., Gurevich Y. V., Velez M. G., and Gurevich V. V. (2000) An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem* **275**, 41049-41057.

- Vossler M. R., Yao H., York R. D., Pan M. G., Rim C. S., and Stork P. J. (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *CELL* **89**, 73-82.
- Vrecl M., Jorgensen R., Pogacnik A., and Heding A. (2004) Development of a BRET2 screening assay using beta-arrestin 2 mutants. *J Biomol Screen* **9**, 322-333.
- Wang L., Cummings R., Zhao Y., Kazlauskas A., Sham J. K., Morris A., Georas S., Brindley D. N., and Natarajan V. (2003b) Involvement of phospholipase D2 in lysophosphatidate-induced transactivation of platelet-derived growth factor receptor-beta in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* **278**, 39931-39940.
- Wang P., Wu Y., Ge X., Ma L., and Pei G. (2003a) Subcellular localization of beta-arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus. *J Biol Chem* **278**, 11648-11653.
- Waters C., Sambhi B., Kong K. C., Thompson D., Pitson S. M., Pyne S., and Pyne N. J. (2003) Sphingosine 1-phosphate and platelet-derived growth factor (PDGF) act via PDGF beta receptor-sphingosine 1-phosphate receptor complexes in airway smooth muscle cells. *J Biol Chem* **278**, 6282-6290.
- Waters C. M., Connell M. C., Pyne S., and Pyne N. J. (2005) c-Src is involved in regulating signal transmission from PDGFbeta receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells. *Cell Signal* **17**, 263-277.
- Wei H., Ahn S., Shenoy S. K., Karnik S. S., Hunyady L., Luttrell L. M., and Lefkowitz R. J. (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10782-10787.
- Wei J. and Hendershot L. M. (1996) Protein folding and assembly in the endoplasmic reticulum. *EXS* **77**, 41-55.
- Weiss J. M., Morgan P. H., Lutz M. W., and Kenakin T. P. (1996) The cubic ternary complex receptor-occupancy model I. Model description. *J Theor Biol* **178**, 151-167.
- Wetzker R. and Bohmer F. D. (2003) Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 651-657.
- Whistler J. L. and Von Zastrow M. (1998) Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9914-9919.
- Wojcikiewicz R. J. (2004) Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 35-41.

- Wu J., Dent P., Jelinek T., Wolfman A., Weber M. J. and Sturgill T. W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signalling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **262**, 1065-1069.
- Xiao K., Shenoy S. K., Nobles K., and Lefkowitz R. J. (2004) Activation-dependent conformational changes in beta-arrestin 2. *J Biol Chem* **279**, 55744-55753.
- Xu Y., Piston D. W., and Johnson C. H. (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 151-156.
- Yamada T., Terada Y., Homma M. K., Nonoguchi H., Sasaki S., Yuasa Y., Tomita K., and Marumo F. (1995) AVP inhibits EGF-stimulated MAP kinase cascade in Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney Int* **48**, 745-752.
- Yart A., Roche S., Wetzker R., Laffargue M., Tonks N., Mayeux P., Chap H., and Raynal P. (2002) A function for phosphoinositide 3-kinase beta lipid products in coupling beta gamma to Ras activation in response to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **277**, 21167-21178.
- Yasuda J., Whitmarsh A. J., Cavanagh J., Sharma M., and Davis R. J. (1999) The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 7245-7254.
- Yin G., Yan C., and Berk B. C. (2003) Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 780-783.
- Yoshimura T., Agrawal D., and Agrawal H. C. (1987) Cell-free acylation of rat brain myelin proteolipid protein and DM-20. *Biochem J* **246**, 611-617.
- Zhang J., Campbell R. E., Ting A. Y., and Tsien R. Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 906-918.
- Zhang J., Ferguson S. S., Barak L. S., Bodduluri S. R., Laporte S. A., Law P. Y., and Caron M. G. (1998) Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7157-7162.
- Zhu H., Wang H., and Ascoli M. (1995) The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. *Mol Endocrinol* **9**, 141-150.
- Zhu X., Gilbert S., Birnbaumer M., and Birnbaumer L. (1994) Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol* **46**, 460-469.

***ANNEXES***

**Annexe I**

**Contributions additionnelles.**

## **Article 5**

### **Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET.**

Julie Perroy, Stéphanie Pontier, **Pascale G Charest**, Muriel Aubry et Michel Bouvier.

*Nature Methods* 1:203 (2003).

Ma contribution à ces travaux est significative (~20%) et consiste en une participation à l'élaboration de l'approche expérimentale, à l'exécution des expériences ainsi qu'à l'analyse des résultats.

# Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET

Julie Perroy<sup>1-3</sup>, Stephanie Pontier<sup>1,3</sup>, Pascale G Charest<sup>1</sup>, Muriel Aubry<sup>1</sup> & Michel Bouvier<sup>1</sup>

Ubiquitin has emerged as an important regulator of protein stability and function in organisms ranging from yeast to mammals. The ability to detect *in situ* changes in protein ubiquitination without perturbing the physiological environment of cells would be a major step forward in understanding the ubiquitination process and its consequences. Here, we describe a new method to study this dynamic post-translational modification in intact human embryonic kidney cells. Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET), we measured the ubiquitination of  $\beta$ -arrestin 2, a regulatory protein implicated in the modulation of G protein-coupled receptors. In addition to allowing the detection of basal and GPCR-regulated ubiquitination of  $\beta$ -arrestin 2 in living cells, real-time BRET measurements permitted the recording of distinct ubiquitination kinetics that are dictated by the identity of the activated receptor. The ubiquitination BRET assay should prove to be a useful tool for studying the dynamic ubiquitination of proteins and for understanding which cellular functions are regulated by this post-translational event.

Ubiquitination is a rapid and reversible post-translational modification that is involved in numerous aspects of biology. The 76-residue polypeptide ubiquitin fulfils essential functions in eukaryotes through its covalent attachment to other intracellular proteins<sup>1,2</sup>. Historically, the best-characterized role for this modification is the targeting of proteins for degradation by the 26S proteasome after the transfer of an ubiquitin chain of at least four units, referred to as polyubiquitination<sup>3</sup>. More recently, the addition of a single ubiquitin to one (monoubiquitination) or multiple (multiubiquitination) protein sites has been described<sup>4</sup>. In these cases, the post-translational modification serves as a reversible signal involved in a variety of key cellular functions including intracellular signaling, subcellular localization and protein-protein interactions.

Despite the growing interest in ubiquitination, inspired by the diversity of cellular functions that appear to be influenced by this process, the lack of tools for monitoring its dynamic regulation limits studies in this field. Western blot analysis using antibodies to ubiquitin allows the detection of protein ubiquitination. Although

this assay can be used to determine whether a protein is ubiquitinated, it cannot be easily adapted to study the dynamic nature of the ubiquitination and deubiquitination cycles. To monitor the ubiquitination process in living cells, we took advantage of a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) method, which allows real-time detection of protein-protein interactions *in vivo*. This technique is based on the nonradiative transfer of energy between a luminescent energy donor (here, *Renilla* luciferase, *Rluc*) and a fluorescent energy acceptor (here, green fluorescent protein, GFP). This is a system of choice for monitoring both constitutive and regulated intermolecular interactions because of the strict dependence on molecular proximity ( $< 100 \text{ \AA}$ ) between the donor and acceptor molecules for energy transfer<sup>5</sup>.

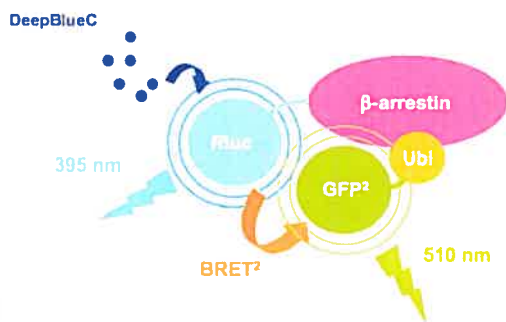
It was recently proposed that  $\beta$ -arrestin 2 ( $\beta$ -arrestin), a versatile protein involved in the regulation of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling<sup>6</sup>, is ubiquitinated in response to receptor activation<sup>7</sup>. Based on the stability of their interaction with  $\beta$ -arrestin, two broad classes of GPCRs are distinguishable<sup>8,9</sup>: GPCRs known as class A receptors (for example, the  $\beta_2$ -adrenergic receptor,  $\beta_2\text{AR}$ ) interact only transiently with  $\beta$ -arrestin after their activation, whereas activated class B receptors (for example, the  $V_2$ -vasopressin receptor,  $V_2\text{R}$ ) form stable complexes with  $\beta$ -arrestin. Recent findings<sup>10</sup> are suggestive of a link between the dynamics of  $\beta$ -arrestin ubiquitination and the nature of its interaction with the activated receptor. A stable interaction correlates with sustained  $\beta$ -arrestin ubiquitination, whereas a transient interaction results in short-lived ubiquitination. Using  $\beta$ -arrestin as a model ubiquitinated protein, we report here that BRET allows monitoring of the changes in the ubiquitination state of a protein in real time.

## RESULTS

### Ubiquitination monitored by BRET in living cells

As ubiquitination results from the covalent attachment of ubiquitin to specific protein substrates, BRET should be adaptable to monitoring this post-translational modification in living cells. The covalent attachment of a GFP-ubiquitin fusion protein to a substrate fused to *Renilla* luciferase (*Rluc*) should bring the *Rluc* and GFP moieties within a BRET-permissive distance, resulting in a detectable BRET signal. To determine whether we could use BRET

<sup>1</sup>Département de Biochimie and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-Ville Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. <sup>2</sup>Laboratory of Functional Genomics, UPR CNRS 2580 CCIPE, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier, Cedex 05 France. <sup>3</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to M.B.



**Figure 1** | Schematic representation of the  $\beta$ -arrestin ubiquitination BRET<sup>2</sup> assay. Upon degradation of its catalytic substrate (DeepBlueC coelenterazine), the Rluc fused to the N terminus of  $\beta$ -arrestin emits blue light with an emission peak at 395 nm. If the  $\beta$ -arrestin is ubiquitinated, a nonradiative transfer of energy will occur between Rluc and the GFP<sup>2</sup> fused to the N terminus of ubiquitin, resulting in re-emission of light with an emission peak at 510 nm.

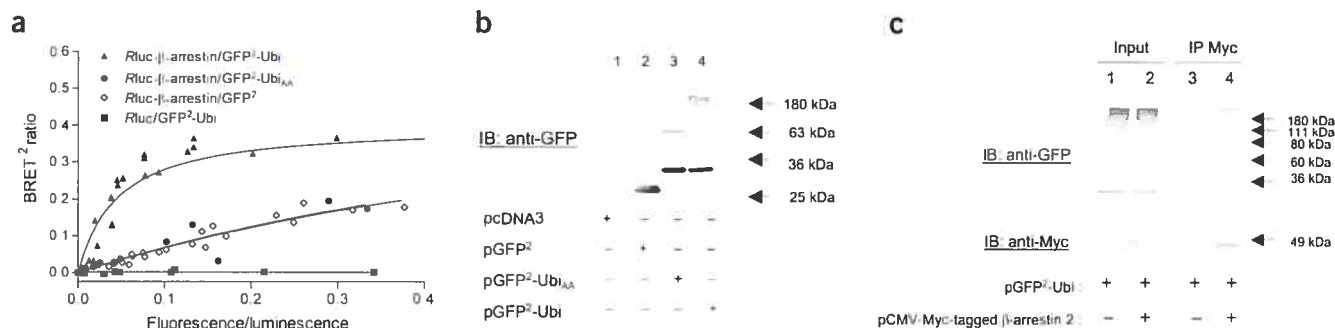
to study ubiquitination of  $\beta$ -arrestin, we designed N-terminally tagged Rluc- $\beta$ -arrestin and GFP-ubiquitin (GFP<sup>2</sup>-Ubi) fusion protein constructs. The close proximity of several GFP<sup>2</sup> moieties could cause quenching or interference phenomena that could lead to a decrease in the BRET signal, and indeed, we observed this (Supplementary Fig. 1 online). To limit the formation of poly(GFP<sup>2</sup>-Ubi) chains<sup>11</sup>, we created a mutant GFP<sup>2</sup>-Ubi protein by changing Lys48 and Lys63, the two residues through which linkages occur, to alanine residues.

To initiate the energy transfer between Rluc and GFP<sup>2</sup> in cells coexpressing Rluc- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi, we used the luciferase substrate DeepBlueC coelenterazine, which readily crosses the plasma membrane. Hydrolysis of DeepBlueC coelenterazine leads to the emission of light with a spectrum overlapping the excitation spectrum of GFP<sup>2</sup>, thus allowing BRET<sup>2</sup> (Fig. 1). Coexpression of a constant level of Rluc- $\beta$ -arrestin with increasing concentrations of GFP<sup>2</sup>-Ubi led to an increase in the BRET<sup>2</sup> signal (Fig. 2a). The

energy transfer increased hyperbolically as a function of the GFP<sup>2</sup>-Ubi expression level, indicative of a specific interaction between the two proteins<sup>12</sup>. To confirm that the signal specifically reflects the ubiquitination process, we used either a GFP<sup>2</sup>-tagged ubiquitin mutant that is unable to take part in the ubiquitination process as a result of the replacement of its last two glycines by alanine residues (GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub>) or GFP<sup>2</sup> alone as negative controls. Coexpression of Rluc- $\beta$ -arrestin with GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> or GFP<sup>2</sup> led to weaker signals that increased linearly rather than hyperbolically with the increase in the fluorescence/luminescence ratio, most likely reflecting random collision (bystander BRET) between Rluc- $\beta$ -arrestin and these two GFP<sup>2</sup> constructs. Western blot analysis of lysates from cells expressing GFP<sup>2</sup>, GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> or GFP<sup>2</sup>-Ubi corroborated the lack of integration of GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> into proteins (Fig. 2b). The smeared band detected above 63 kDa in lysates from cells expressing GFP<sup>2</sup>-Ubi most likely reflects ubiquitination of multiple proteins, and the sharp bands observed in lysates from cells expressing GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> probably correspond to monomeric and multimeric forms of the GFP<sup>2</sup>-tagged ubiquitin. The BRET<sup>2</sup> signal detected between Rluc- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi did not result from the ubiquitination of the Rluc moiety itself, as no signal was detected when only GFP<sup>2</sup>-Ubi and Rluc were coexpressed (Fig. 2a). To determine whether the GFP<sup>2</sup>-Ubi protein can covalently modify  $\beta$ -arrestin, we immunoprecipitated Myc-tagged  $\beta$ -arrestin and detected GFP<sup>2</sup>-Ubi-immunoreactive species, which probably correspond to a ubiquitinated  $\beta$ -arrestin population (Fig. 2c). Taken together, these results demonstrated that energy transfer between GFP<sup>2</sup>-Ubi and Rluc- $\beta$ -arrestin reflects a nonrandom clustering of these two proteins and the covalent ubiquitination of  $\beta$ -arrestin *in vivo*.

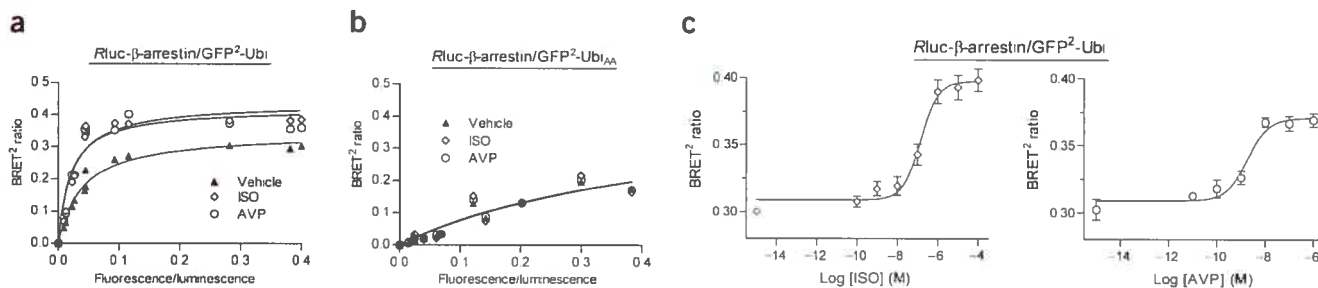
### Detection of agonist-induced ubiquitination

In a recent study, *ex vivo* western blot analysis suggested that GPCR activation modulates  $\beta$ -arrestin ubiquitination<sup>7,10</sup>. To assess whether BRET can detect receptor-regulated ubiquitination in living cells, we monitored the transfer of energy between Rluc- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi in the presence of coexpressed  $\beta_2$ AR and



**Figure 2** | Specific BRET<sup>2</sup> signal between Rluc- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi. (a) HEK 293 cells were cotransfected either with constant concentrations of Rluc- $\beta$ -arrestin, Myc-tagged  $\beta_2$ AR and HA-tagged  $\beta_2$ AR DNA constructs and increasing concentrations of plasmids encoding GFP<sup>2</sup>-Ubi (▲), GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> (●) or GFP<sup>2</sup> (◇), or with a constant concentration of Rluc and increasing concentrations of GFP<sup>2</sup>-Ubi DNAs (■). The data shown represent pooled individual readings obtained from five to eight independent experiments. The curves were fitted using a nonlinear regression equation, assuming a single binding site (GraphPad Prism). (b) Lysates obtained from mock-transfected HEK 293 cells or cells transfected with pGFP<sup>2</sup>, pGFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> or pGFP<sup>2</sup>-Ubi were resolved by SDS-PAGE, and the attachment of ubiquitin to proteins was assessed by western blot analysis using an antibody to GFP. Numbers on the right indicate molecular weight of protein markers. The blot shown is representative of two independent experiments. (c) Immunoprecipitation with an antibody to Myc was performed on lysates prepared from cells expressing pGFP<sup>2</sup>-Ubi or pGFP<sup>2</sup>-Ubi and pCMV-Myc-tagged  $\beta$ -arrestin. GFP<sup>2</sup>-Ubi protein associated with the immunoprecipitated  $\beta$ -arrestin was revealed as in b with an antibody to GFP, whereas the amount of  $\beta$ -arrestin immunoprecipitated was controlled with an antibody to Myc.





**Figure 3** | Detection of GPCR-induced  $\beta$ -arrestin ubiquitination. (a,b) Cells cotransfected with a constant concentration of *Rluc*- $\beta$ -arrestin, Myc-tagged  $V_2R$  and HA-tagged  $\beta_2AR$  plasmids and increasing concentrations of GFP<sup>2</sup>-Ubi (a) or GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> (b) constructs were unstimulated ( $\blacktriangle$ ) or stimulated with  $10^{-5}$  M ISO ( $\diamond$ ) or  $10^{-6}$  M AVP ( $\circ$ ) for 120 s before BRET measurement. DeepBlueC coelenterazine was added in the continuous presence of the agonists and the BRET measurements were taken 20 s after the addition of luciferase substrate. The data shown represent pooled individual readings obtained from three independent experiments. (c) Cells expressing the same construct as in a and displaying a GFP<sup>2</sup>-Ubi/*Rluc*- $\beta$ -arrestin expression ratio of  $0.1 \pm 0.005$  (assessed by measuring total fluorescence and luminescence signals) were stimulated with increasing concentration of ISO (left) or AVP (right) for 120 s; BRET measurements were then collected as in a. The curves shown represent the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments.

$V_2R$ . Activation of each receptor with its selective agonist, isoproterenol (ISO) for the  $\beta_2AR$  and arginine-vasopressin (AVP) for the  $V_2R$ , substantially increased the BRET<sup>2</sup> signal (Fig. 3a). In contrast, ligands did not have an effect on the bystander BRET<sup>2</sup> observed between GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> and *Rluc*- $\beta$ -arrestin (Fig. 3b), confirming the selectivity of the agonist-promoted ubiquitination observed with GFP<sup>2</sup>-Ubi. This increase in BRET<sup>2</sup> signal was dose dependent, and the agonist concentrations yielding a half-maximal response ( $EC_{50}$ ) were 140 and 1.8 nM for ISO and AVP, respectively, consistent with the affinity of these ligands for their receptors (Fig. 3c).

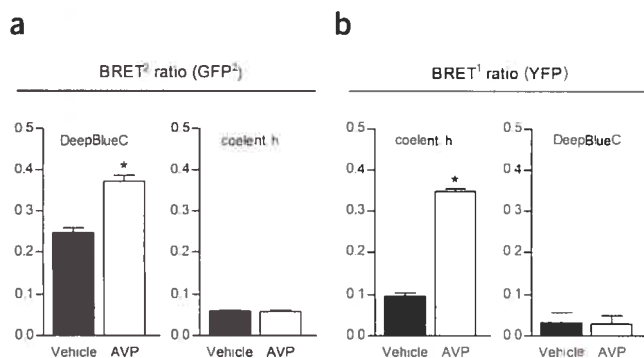
#### Concomitant detection of ubiquitination and recruitment

It has been suggested that receptor activation may regulate the ubiquitination of  $\beta$ -arrestin and its recruitment to GPCRs<sup>10,13</sup> in a coordinated fashion. To monitor these two events simultaneously in the same cells, we took advantage of the distinct spectral properties of two luciferase substrates that allow energy transfer with two different fluorescent proteins. Whereas the *Rluc*-catalyzed oxidation of DeepBlueC coelenterazine leads to BRET<sup>2</sup> between *Rluc* and GFP<sup>2</sup>, the use of coelenterazine h leads to a distinct emission spectrum that promotes BRET<sup>1</sup> between *Rluc* and a variant of GFP, the yellow fluorescent protein (YFP)<sup>14-16</sup>. We divided a culture of cells coexpressing *Rluc*- $\beta$ -arrestin, GFP<sup>2</sup>-Ubi and  $V_2R$ -YFP into two samples. In one sample we monitored the  $\beta$ -arrestin ubiquitination by assessing the BRET<sup>2</sup> between

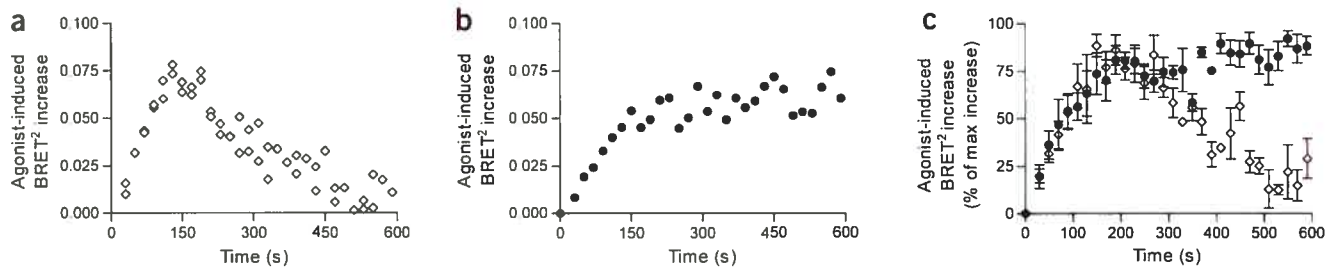
*Rluc*- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi, and in the second sample we measured BRET<sup>1</sup> between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and  $V_2R$ -YFP to evaluate the recruitment of  $\beta$ -arrestin to the receptor (Fig. 4). Stimulation with AVP resulted in an increase in both BRET<sup>2</sup> and BRET<sup>1</sup> signals, reflecting concomitant ubiquitination (Fig. 4a) and recruitment of  $\beta$ -arrestin (Fig. 4b). Each of the BRET signals detected was specific to the interaction monitored, as no substantial transfer of energy occurred between *Rluc* and GFP<sup>2</sup> in the presence of coelenterazine h or between *Rluc* and YFP in the presence of DeepBlueC coelenterazine.

#### Real time monitoring of distinct ubiquitination kinetics

As described above, one can distinguish two GPCR classes based on their profile of interaction with  $\beta$ -arrestin. Because the ubiquitination state of  $\beta$ -arrestin seems intimately linked to its interaction profile with receptors<sup>10</sup>, we followed the kinetics of agonist-promoted  $\beta$ -arrestin ubiquitination in real time in cells coexpressing  $\beta_2AR$  and  $V_2R$ . Both ISO and AVP induced rapid and similar increases in the BRET-detected ubiquitination of  $\beta$ -arrestin that reached a peak at 2 minutes after activation (Fig. 5). However, although it remained stable for at least 10 min after  $V_2R$  activation (Fig. 5b,c), the BRET signal returned progressively toward basal values after activation of the  $\beta_2AR$  (Fig. 5a,c). This reduction in BRET signal most likely reflects a deubiquitination process and not a degradation of  $\beta$ -arrestin. As BRET is a ratiometric measurement (GFP<sup>2</sup> emission divided by *Rluc* emission), degradation of



**Figure 4** | Concomitant detection of  $\beta$ -arrestin ubiquitination and its recruitment to the activated receptor. (a,b) Cells cotransfected with *Rluc*- $\beta$ -arrestin,  $V_2R$ -YFP and GFP<sup>2</sup>-Ubi were stimulated with  $1 \mu M$  AVP or vehicle alone for 10 min. DeepBlueC coelenterazine (BRET<sup>2</sup>, a) or coelenterazine h (BRET<sup>1</sup>, b) were then added in the continuous presence of the agonist and BRET measurements collected 20 s after the addition of the luciferase substrate to monitor *Rluc*- $\beta$ -arrestin ubiquitination or its recruitment to  $V_2R$ -YFP, respectively. Bar graphs shown represent the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. The lack of cross-talk between BRET<sup>1</sup> and BRET<sup>2</sup> in the same samples was verified by measuring the BRET signal between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi in the presence of coelenterazine h for BRET<sup>2</sup> and between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and  $V_2R$ -YFP in the presence of DeepBlueC for BRET<sup>1</sup>. Virtually no cross-talk signal was observed (right side of each panel). Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's *t*-test. \**P* < 0.05.



**Figure 5** | Real-time assessment of receptor stimulated  $\beta$ -arrestin ubiquitination. Cells cotransfected with *Rluc*- $\beta$ -arrestin, Myc-tagged  $V_2R$ , HA-tagged  $\beta_2AR$  and GFP<sup>2</sup>-Ubi (GFP<sup>2</sup>-Ubi to *Rluc*- $\beta$ -arrestin ratio of  $0.1 \pm 0.005$ ) constructs, were incubated in the presence of DeepBlueC coelenterazine immediately before stimulation with  $10^{-5}$  M ISO ( $\diamond$ ; a,c) or  $10^{-6}$  M AVP ( $\bullet$ ; b,c). BRET<sup>2</sup> measurements were then collected immediately every 10 s in the continued presence of the agonists for 10 min. (a,b) The real-time agonist-promoted increases in BRET are represented as the difference in the absolute BRET values obtained in the presence and in the absence of ISO or AVP. (c) Compilation of three independent experiments carried out as in a and b. The data shown represent the mean  $\pm$  s.e.m. and are expressed in percentage of the maximal BRET<sup>2</sup> signal obtained for each curve.

*Rluc*- $\beta$ -arrestin should induce a decrease in luminescence and lead to an equivalent reduction in the transfer of energy to the acceptor without affecting the signal. These results, therefore, confirm that in living cells, the nature of the activated receptor determines the dynamics of  $\beta$ -arrestin ubiquitination.

## DISCUSSION

The aim of this study was to adapt an energy transfer assay to the detection of protein ubiquitination in living cells. Using  $\beta$ -arrestin as a model, we demonstrated that BRET can specifically detect both basal and dynamically regulated ubiquitination processes. As compared to western blot analysis, the use of BRET presents several advantages: (i) because the BRET assay is carried out in living cells, it avoids the possible signal alterations that could result from cell lysis, protein solubilization or any purification steps before western blot analysis; (ii) the ability to follow the evolution of the BRET signal in real time allows one to capture the dynamic nature of the ubiquitination process; (iii) one can monitor changes in ubiquitination levels resulting from specific treatments in one population of cells using BRET, whereas western blot experiments require distinct cellular pools; and (iv) because of the ratiometric nature of the BRET technique, a reduction in signal truly represents a decrease in ubiquitination and does not result from the degradation of the ubiquitinated protein target.

As the BRET method is a proximity-based assay that was previously used to detect noncovalent protein-protein interactions, it was important to validate that BRET detected between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi truly reflected the covalent attachment of the ubiquitin moiety. This was achieved by comparing the BRET signals obtained between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and either GFP<sup>2</sup>-Ubi, GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> or the GFP<sup>2</sup> moiety alone. The BRET signal obtained between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi increased hyperbolically with increasing concentration of GFP<sup>2</sup>-Ubi before reaching a plateau once the covalent attachment of ubiquitin to *Rluc*- $\beta$ -arrestin attained the maximal steady state. In contrast, the smaller, linear BRET signal obtained between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> or GFP<sup>2</sup> most likely resulted from bystander BRET<sup>12</sup>. Because it cannot be incorporated into proteins, the concentration of free GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> available for random collision should be equivalent to that reached when the GFP<sup>2</sup> moiety alone is expressed, with both being much higher than that attained with GFP<sup>2</sup>-Ubi for equivalent GFP<sup>2</sup> constructs. It follows that the

bystander BRET component of the hyperbolic signal observed between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi should then be much smaller than that observed with GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> or GFP<sup>2</sup>. The lower signal detected between the *Rluc* moiety alone and GFP<sup>2</sup>-Ubi compared to that monitored between *Rluc*- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> or GFP<sup>2</sup> confirms this prediction. This makes GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> a stringent control that allows one to distinguish between protein-protein interactions that are due to random collision and those due to covalent ubiquitination of a specific substrate.

Both BRET and immunoprecipitation approaches indicated that  $\beta$ -arrestin undergoes basal ubiquitination to a significant extent. These results are somewhat different from those of a published report<sup>7,10</sup> in which ubiquitination of  $\beta$ -arrestin was observed almost exclusively as a result of receptor activation. The specific reasons for this difference are not known, but it probably results from differences in the experimental conditions used, such as receptor expression level or the overexpression of exogenous ubiquitin protein.

An important aspect of the BRET-based method is its ability to detect dynamic changes in the ubiquitination state of a protein and to monitor changes over time. The ubiquitination BRET assay allowed us to monitor distinct kinetics of  $\beta$ -arrestin ubiquitination resulting from the activation of different GPCRs. Activation of the  $\beta_2AR$  induced a fleeting  $\beta$ -arrestin ubiquitination, whereas a long-lasting ubiquitination of the regulatory protein was observed after activation of the  $V_2R$ . This is consistent with a previous study examining the ubiquitination status of  $\beta$ -arrestin at 1 and 15 min after receptor stimulation<sup>10</sup>. However, because the activated receptor recruits  $\beta$ -arrestin, the increase in ubiquitination BRET signal (Fig. 2a) could result from the ubiquitination of the receptor itself. This was not the case, as no BRET modulation occurred between  $\beta_2AR$ -*Rluc* or  $V_2R$ -*Rluc* and GFP<sup>2</sup>-Ubi after brief agonist stimulation (Supplementary Fig. 2 online). The data show that the ubiquitination BRET assay can faithfully reflect rapid and differential changes in the ubiquitination state of a specific substrate after specific stimuli.

The GFP<sup>2</sup>-Ubi construct used for the BRET experiments was designed to lack the two major sites involved in polyubiquitination in mammals (Lys48 and Lys63) to prevent the formation of GFP chains that could interfere with the energy transfer process. Despite the constraint that such a construct could impose on the system, ubiquitination of  $\beta$ -arrestin, which is believed to be

polyubiquitinated<sup>7,10</sup>, could be readily observed. This is not surprising given that the process of polyubiquitination permits the attachment of the GFP<sup>2</sup>-Ubi through its terminal glycine either to  $\beta$ -arrestin targeted lysine(s) or to growing chains of ubiquitin. As the use of the GFP<sup>2</sup>-Ubi construct, lacking the polyubiquitination sites, could interfere with the properties of ubiquitinated proteins, we compared the ubiquitination BRET signal obtained with this construct to the signal obtained in the presence of a wild-type GFP<sup>2</sup>-Ubi protein (GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>WT</sub>). Although a specific hyperbolic BRET signal was detected between Rluc- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>WT</sub>, it was lower than the one obtained with GFP<sup>2</sup>-Ubi (Supplementary Fig. 1 online). Despite the lower absolute signal, similar BRET modulations were observed with both constructs after agonist stimulation (Supplementary Fig. 1 online). This indicates that GFP<sup>2</sup>-Ubi expression, *per se*, does not influence the nature of the results obtained but facilitates the detection of BRET signal changes. The fact that GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>WT</sub> could also be used in the ubiquitination BRET assay makes the method more broadly applicable.

Besides its usefulness in directly monitoring protein ubiquitination, the BRET assay offers the possibility of concomitant detection of additional protein interactions involving the ubiquitinated protein. Taking advantage of two spectrally distinct coelenterazines, we demonstrated the feasibility of such dual detection by monitoring both ubiquitination of  $\beta$ -arrestin and its recruitment to the V<sub>2</sub>R in the same cells.

In addition to shedding new light on the dynamics of  $\beta$ -arrestin ubiquitination in living cells, our study represents proof of the principle that resonance energy transfer approaches allow the monitoring of ubiquitin attachment in real time. BRET and possibly fluorescence resonance energy transfer (FRET) could be used to study the ubiquitination of various proteins whose activity and fate are regulated by this post-translational modification. Studies of the growing number of ubiquitin-like proteins that regulate diverse cellular functions through their covalent attachment to specific protein substrates could also benefit from advances in ubiquitination BRET assays.

## METHODS

**Plasmids.** To produce a wild type GFP<sup>2</sup>-Ubi construct (GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>WT</sub>), we amplified the gene encoding human ubiquitin from a pQE32-Ubi plasmid and subcloned it into pGFP<sup>2</sup>-C1 (Perkin Elmer BioSignal). We then mutated by PCR lysines 48 and 63 in the ubiquitin moiety of the GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>WT</sub> construct into alanines (GFP<sup>2</sup>-Ubi). Finally, we constructed the GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub><sup>17,18</sup> by mutating by PCR the two C-terminal glycines 75 and 76 into alanines. We previously described pcDNA3.1-RLuc- $\beta$ -arrestin, pcDNA3.1-hemagglutinin (HA)-tagged  $\beta_2$ AR, pcDNA3.1-Myc-tagged V<sub>2</sub>R and pRK5-V<sub>2</sub>R-YFP<sup>13,19–21</sup>. pCMV-Myc-tagged  $\beta$ -arrestin was a kind gift from S. Marullo's laboratory.

**Cell culture and transfection.** HEK293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine (Wisent) and cultured at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. We transfected the cells 24 h after seeding using the calcium phosphate precipitation method<sup>22</sup>.

**BRET measurement.** Transfected cells were washed twice with PBS, detached in PBS with EDTA and resuspended in PBS with

0.1% glucose. We determined the cell number by measuring protein concentration using the Dc protein assay kit (Bio-Rad). We obtained BRET measurements using two different sets of energy transfer partners. Energy transfer known as BRET<sup>2</sup>, between Rluc and GFP<sup>2</sup>, was determined after the addition of the Rluc substrate, DeepBlueC coelenterazine<sup>14</sup> (Perkin Elmer), whereas BRET<sup>1</sup>, between Rluc and YFP, was assessed in the presence of another Rluc substrate, coelenterazine h<sup>15,16</sup>.

**BRET<sup>2</sup> monitoring of  $\beta$ -arrestin ubiquitination.** We distributed cells coexpressing Myc-tagged V<sub>2</sub>R, HA-tagged  $\beta_2$ AR, Rluc- $\beta$ -arrestin and GFP<sup>2</sup>-Ubi constructs in white 96-well Microplates (Corning) at a density of 100,000 cells per well. We collected BRET<sup>2</sup> measurements 20 s after the addition of the luciferase substrate, DeepBlueC coelenterazine, at a final concentration of 5  $\mu$ M. Readings were obtained using a modified TopCount NXT instrument (Packard Bioscience) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370–450 and 500–530 nm ranges. The BRET<sup>2</sup> signal corresponds to the ratio of the light emitted by the GFP<sup>2</sup> (500–530 nm) over the light emitted by the Rluc (370–450 nm). We corrected the values by subtracting the background ratio value detected when the Rluc constructs were expressed alone. For titration experiments, the BRET signal was plotted as a function of the total fluorescence signal over the total luminescence signal (see below), a ratio used as an index of the concentration of GFP<sup>2</sup>-Ubi (or GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub>) expressed.

**BRET<sup>1</sup> monitoring of  $\beta$ -arrestin recruitment to the V<sub>2</sub>R receptor.** After dividing the cells coexpressing Rluc- $\beta$ -arrestin, GFP<sup>2</sup>-Ubi and V<sub>2</sub>R-YFP into two samples, we initiated BRET<sup>1</sup> between Rluc- $\beta$ -arrestin and V<sub>2</sub>R-YFP by the addition of 5  $\mu$ M coelenterazine h (the recruitment of  $\beta$ -arrestin to the receptor). We collected the readings at the appropriate emission wavelengths after the addition of 1  $\mu$ M AVP using a Mithras LB 940 instrument (Berthold Technologies). We analyzed results as described above by calculating the ratio of the light emitted by the YFP (510–550 nm) to the light emitted by the Rluc (460–500 nm). We corrected the values by subtracting the background ratio value detected when the Rluc constructs were expressed alone.

**Total fluorescence and luminescence measurements.** We dispersed cells in white 96 well plates with clear bottoms (Costar) at a density of 100,000 cells per well<sup>12</sup>. We measured total fluorescence of cells in a Fluorocount (Packard Bioscience) using an excitation filter at 400 or 485 nM and an emission filter at 510 or 530 nM in the case of GFP<sup>2</sup> or YFP, respectively. We then incubated cells for 10 min with coelenterazine h to measure the total luminescence using a LumiCount instrument (Packard Bioscience). In the case of fluorescence, we subtracted the background value detected in untransfected cells to give a specific fluorescence value. In the case of luminescence, where the background was negligible, we used absolute values.

**Immunoblotting and immunoprecipitation.** We solubilized cells expressing pcDNA3, GFP<sup>2</sup>-Ubi<sub>AA</sub> or GFP<sup>2</sup>-Ubi in lysis buffer A containing 50 mM HEPES (pH7.5), 0.5% Nonidet P-40, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 5 mM N-ethyl maleimide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml

aprotinin and 100  $\mu$ M benzamidine. After separation of protein on SDS-PAGE and transfer to nitrocellulose, we revealed the immunoreactive bands using an antibody to GFP (Clontech), a horseradish peroxidase-conjugated antibody (Amersham) and the Western Lightning chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer). For immunoprecipitation experiments, we used cells expressing or not expressing pCMV-Myc-tagged  $\beta$ -arrestin 2 and pGFP<sup>2</sup>-Ubi and solubilized them in buffer A for 30 min with rocking at 4 °C. We then incubated soluble extracts with an antibody to Myc (9E10) and protein G-agarose beads overnight at 4 °C. Bound extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. We performed western blot analysis with an antibody to GFP, as described above, to reveal basal  $\beta$ -arrestin ubiquitination, and used A14 antibody to Myc (Santa Cruz) to detect the presence of Myc-tagged  $\beta$ -arrestin after its immunoprecipitation.

Note: Supplementary information is available on the Nature Methods website.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to A. Vallée-Bélisle and S. Michnick for providing the plasmid pQE32-Ubi and to S. Marullo for providing the pCMV-Myc-tagged  $\beta$ -arrestin 2 plasmid. This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research (M.B.) and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (M.A.). J.P. holds a fellowship from the European Molecular Biology Organization, M.A. holds a scholarship from the Fond de Recherche en Santé du Québec and M.B. is a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

#### COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 16 August; accepted 20 October 2004

Published online at <http://www.nature.com/naturemethods/>

- Ciechanover, A., Orian, A. & Schwartz, A.L. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J. Cell Biochem. Suppl.* **34**, 40–51 (2000).
- Passmore, L.A. & Barford, D. Getting into position: The catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* **379** (Part 3), 513–525 (2004).
- Hochstrasser, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405–439 (1996).
- Schnell, J.D. & Hicke, L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 35857–35860 (2003).
- Eidne, K.A., Kroeger, K.M. & Hanyaloglu, A.C. Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 415–421 (2002).
- Wojcikiewicz, R.J. Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 35–41 (2004).
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A. & Lefkowitz, R.J. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**, 1307–1313 (2001).
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S. & Caron, M.G. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **274**, 32248–32257 (1999).
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G. & Barak, L.S. Differential affinities of visual arrestin, beta-arrestin 1, and beta-arrestin 2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 17201–17210 (2000).
- Shenoy, S.K. & Lefkowitz, R.J. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 14498–14506 (2003).
- Patrick, G.N., Bingol, B., Weld, H.A. & Schuman, E.M. Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr. Biol.* **13**, 2073–2081 (2003).
- Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. & Bouvier, M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **277**, 44925–44931 (2002).
- Lavoie, C. *et al.* Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J. Biol. Chem.* **277**, 35402–35410 (2002).
- Jensen, A.A., Hansen, J.L., Sheikh, S.P. & Brauner-Osborne, H. Probing intermolecular protein-protein interactions in the calcium-sensing receptor homodimer using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Eur. J. Biochem.* **269**, 5076–5087 (2002).
- Angers, S. *et al.* Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3684–3689 (2000).
- Xu, Y., Piston, D.W. & Johnson, C.H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 151–156 (1999).
- Haas, A.L., Murphy, K.E. & Bright, P.M. The inactivation of ubiquitin accounts for the inability to demonstrate ATP, ubiquitin-dependent proteolysis in liver extracts. *J. Biol. Chem.* **260**, 4694–4703 (1985).
- Wilkinson, K.D. & Audhya, T.K. Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires ubiquitin with the COOH-terminal sequence Arg-Gly-Gly. *J. Biol. Chem.* **256**, 9235–9241 (1981).
- Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S. & Bouvier, M. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* **22**, 3816–3824 (2003).
- Morello, J.P. *et al.* Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest.* **105**, 887–895 (2000).
- Terrillon, S. *et al.* Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and hetero-dimers during biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* **17**, 677–691 (2003).
- Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y. & Maniatis, T. Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell* **27**, 279–288 (1981).

**Article 6****Probing the ER site of action of the pharmacological chaperone SR121463 reveals a role for DRiP upstream of calnexin in the folding of the V2 vasopressin receptor.**

Virginie Bernier, **Pascale G Charest**, Stéphanie M Pontier, Daniel Bichet et Michel Bouvier. *En révision dans Molecular Biology of the Cell.*

Ma contribution à ces travaux est significative (~20%) et consiste en une participation à l'élaboration de l'approche expérimentale, à l'exécution des expériences ainsi qu'à l'analyse des résultats.



## ABSTRACT

Conformational diseases often result from modest mutations in proteins that are recognized by the endoplasmic reticulum (ER) quality control system as misfolded. These proteins interact for longer periods of time with ER molecular chaperones, are ubiquitinated and degraded by the proteasome and thus cannot reach their site of action. Small molecules, termed pharmacological chaperones, can rescue their export from the ER presumably by interfering with the quality control system. We used an ER-retained mutant (W164S) of the V2 vasopressin receptor (V2R), responsible for nephrogenic diabetes insipidus, to determine at which step of the quality control system the pharmacological chaperones exert their action. The pharmacological chaperone SR121463-promoted rescue of W164SV2R was accompanied by a more efficient maturation and reduced ubiquitination. SR121463 treatment also decreased the interaction time between W164SV2R and the molecular chaperone, calnexin, indicating that the pharmacological chaperone acts either before or while calnexin is bound to the receptor. In contrast, the pharmacological chaperone appears to act downstream of the ER-resident protein, DRiP78, which may be a molecular chaperone acting early in the quality control system rather than an ER export protein as suggested. Taken together, our results suggest that pharmacological chaperones stabilize native or near-native conformations that promote ER-escape.

## INTRODUCTION

Numerous quality control mechanisms have evolved to protect living organisms against aberrant cellular activity. One of these systems assures that only completely and correctly folded proteins are allowed to reach their site of action. It involves the participation of numerous accessory proteins known as molecular chaperones that, in addition to assist protein folding, sense various “folding markers” (Smith *et al.*, 1998) to determine if the protein has reached its native conformation. In the cases of secreted or transmembrane glycoproteins, specialized proteins involved in the export from the endoplasmic reticulum (ER) (Tan *et al.*, 2004) then allow the processing of the folded protein through the secretory pathway. If the native conformation is not attained within the time allowed by the quality control system, the protein will be retained in the ER, retrotranslocated to the cytosol and polyubiquitinated before being degraded by the 26S proteasome (Tsai *et al.*, 2002).

Studies carried out in the last decade have linked defects in this quality control system to the etiology of a growing list of congenital and acquired conformational diseases (Carrell and Lomas, 1997;Kopito and Ron, 2000). In parallel, efforts to overcome these defects have led to the development of various interventions, including the use of small molecules that can successfully rescue proteins from the degradation pathway (Morello *et al.*, 2000a;Perlmutter, 2002;Conn *et al.*, 2002;Cohen and Kelly, 2003;Bernier *et al.*, 2004a;Bernier *et al.*, 2004b). However the precise mechanism of action by which these molecules exert their action remains poorly understood.

For ER-retained mutant forms of the V2 vasopressin receptors (V2R), leading to nephrogenic diabetes insipidus (NDI), treatment with small lipophilic vasopressin antagonists



such as SR121463, VPA-985 and SR49059 have been shown to rescue their cell surface expression and function (Morello *et al.*, 2000b;Wuller *et al.*, 2004;Bernier *et al.*, 2004c). Although the available data strongly suggest that these compounds act as pharmacological chaperone by binding to the receptor in the ER and stabilizing a conformation that is recognized as competent for ER export, the precise site of action within the quality control system has not been identified.

The molecular chaperone calnexin has been shown to interact with many G protein-coupled receptors (GPCRs) (Rozell *et al.*, 1998;Morello *et al.*, 2001;Siffroi-Fernandez *et al.*, 2002;Lu *et al.*, 2003;Butz *et al.*, 2003) including the V2R (Morello *et al.*, 2001) suggesting a role for this lectin in the folding of this important class of receptors. Consistent with such a role, the interaction time between calnexin and the V2R was found to be significantly longer for a NDI ER-retained mutant form than for the wild-type (WT) receptor (Morello *et al.*, 2001). Such delayed release from calnexin makes its interaction with mutant receptors a marker of choice to probe at which step within the quality control system (ie: before or after calnexin release) the pharmacological chaperones act.

Another ER-resident protein that has been suggested to act at a crucial step in the ER-export of GPCRs is the Dopamine Receptor interacting Protein (DRiP78) which over-expression was found to promote the ER-retention of the D1 dopamine receptor (D1R) and M2 muscarinic receptor (M2R) (Bermak *et al.*, 2001). The authors suggested that DRiP78 acted by binding to a newly identified ER-export motif (FxxxFxxxF) located in the carboxyl tail of the receptors. Subsequently, over-expression of DRiP78 was reported to increase rather than decrease the export to the cell surface of another GPCR, the angiotensin type 1A receptor (AT<sub>1A</sub>R), (Leclerc *et*

*al.*, 2002) thus confirming the importance of this protein in GPCR biogenesis but questioning its exact role. The action of DRiP78 as a modulator of ER-export is further challenged by the suggestion that mutations of residue close or within the proposed DRiP78 binding domain lead to misfolding and not ER-export defect (Krause *et al.*, 2000).

In the present study, we have used a NDI ER-retained mutant form of the V2R (W164SV2R) to determine at which step the pharmacological chaperone, SR121463, intervene within the quality control system and to further explore the role of DRiP78 in this process. Our findings indicate that SR121463 acts before the mutant receptor is released from calnexin and strongly suggest that DRiP78 is a molecular chaperone that acts early in the receptor folding process rather than as an ER-export protein.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, glutamine, fungizone, and phosphate-buffered saline (PBS) were all from Wisent Inc.. Cell culture plates and dishes were obtained from Corning. Bovine serum albumine (BSA) arginine-8 vasopressin (AVP), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) were purchased from Sigma Chemical Co. SR121463 was a generous gift from Sanofi-Synthelabo Research. Bradford reagent was acquired from Bio-Rad Laboratories. [3H] adenine, [35S]cysteine/methionine and En<sup>3</sup>Hance autoradiography enhancer were from NEN Life Science Products. Oregon green conjugated anti-mouse antibodies were purchased from Molecular Probes. Rabbit anti-calnexin and rabbit anti-ubiquitin antibodies were acquired from Stressgen. Rabbit anti-GFP was obtained from Clontech. Anti-myc agarose was from Santa Cruz Biotechnologies. Mouse anti-myc antibodies (9E10 clone) was produced by our core facility as ascite fluids. Biomax films were from Eastman Kodak Co. Scientific Imaging Systems. The DeepBlueC coelenterazine and white Optiplate were from Perkin Elmer Life-Sciences.

### DNA construct

The myc-WT V2R (Morello *et al.*, 2000b), WT-*Renilla*-luciferase V2R (WT-*Rluc* V2R) (Bernier *et al.*, 2004c), WT-GFP10 (Charest and Bouvier, 2003) (where GFP10 is a variant form of the GFP containing the following mutations: F64L, Y100F, S108T, M141L, S147P, S202F, I219V and H231L), GFP2-Ubiquitin (Perroy *et al.*, 2004) (where GFP2 is a variant form of the GFP containing the mutation F64L, Y100F, S108T, M141L, I219V and H231L), GABA<sub>B</sub>R2-GFP10 (Perroy *et al.*, 2003) and myc-W164SV2R (Bichet *et al.*, 2002) were already available in the

laboratory and their construction described before. For BRET experiments, the W164SV2R coding sequence was sub-cloned in frame, 5' of the *Rluc* or GFP10 coding sequence within the pcDNA3.1-V2R-*Rluc* or pcDNA3.1-V2R-GFP10, respectively, by substituting the wild-type receptor sequence for that of the W164SV2R using the the *Pst*I and *Hind*III restriction sites. DRiP78 was amplified by PCR from a cDNA library from human brain (graciously provided by Dr. Stephen Michnick, Université de Montréal) using oligonucleotides allowing the insertion of *Nhe*I and *Hind*III restriction sites, 5' and 3' of the DRiP78 coding sequence respectively. Using these restriction sites, DRiP78 was then cloned directly in frame upstream of the GFP2 coding sequence in the pGFP2(N1) vector (Perkin Elmer) leaving a 14 amino acids spacer between the two proteins to generate the DRiP78-GFP2. DRiP78-*Rluc* was obtained by sub-cloning the DRiP78 insert in frame with the *hRluc* coding sequence within the *phRluc*(N1) vector (Perkin Elmer) using the *Nde*I and *Hind*III restriction sites leaving a spacer of 14 amino acids between the two proteins. All DNA constructs were confirmed by direct sequencing.

### **Cell culture and transfections**

HEK293T cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine. Mammalian expression plasmids were transiently transfected in HEK293T cells using the calcium phosphate precipitation procedure (Sambrook *J et al.*, 1989). Cells were allowed to express the foreign DNA for 48 hours before performing the experiments.

### **Fluorescence microscopy**

Immunofluorescence studies were carried out as previously described (Morello *et al.*, 2000b). Briefly, for cell surface immunofluorescence, HEK293T cells transiently expressing the myc-

WTV2R or myc-W164SV2R were washed and incubated with antibodies (1:250) directed against the myc-tag present at the N-terminus of receptors for 1 hour at 4°C. The cells were then washed, fixed with 3% PFA in PBS for 15 min at 4°C and permeabilized with PBS/ 0.5% BSA/ 0.2% Triton X-100 for 10 min at room temperature. In the case of permeabilized cells, immunofluorescence was carried out in , cells treated with PBS/ 0.5% BSA/ 0.2% Triton X-100 for 15 min prior addition of the first antibody. Immunoreactivity of the receptor was revealed using secondary Oregon green conjugated anti-mouse antibodies (1:500), the cover slips were mounted on glass microscope slides and the image were acquired on a Nikon-eclipse TE2000-U (Nikon) microscope with a 60X objective or a Leica HM IRBE laser-scanning confocal microscope with a 100X objective.

### **cAMP accumulation**

HEK 293T cells transiently expressing myc-WTV2R or myc-W164SV2R in the presence or absence of different quantities of DRiP78-GFP were metabolically labelled with [<sup>3</sup>H]adenine (2μCi/well) in 6 well plates for 16 hours at 37°C. They were then washed twice with PBS, stimulated with 10 μM AVP for 20 minutes at 37°C and the reaction stopped at 4°C with 5% trichloro acetic acid. The transformation of [<sup>3</sup>H]ATP into [<sup>3</sup>H]cAMP was assessed by separating the nucleotides using ions exchange chromatography as previously described (Wong *et al.*, 1991).

### **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)**

HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were washed and incubated with antibodies (1:500) directed against the myc-epitope for 1 hour at 4°C. Cells were then washed, fixed with 3% PFA in PBS for 15 min at 4°C and incubated with horseradish peroxidase

conjugated anti-mouse antibody (1:1000) for 30 minutes. The substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride was added according to the manufacturer's instructions for 7 minutes. The reaction was stopped with 200  $\mu$ l of 3 N HCl, and extinction was measured at 492 nm.

### **Metabolic labelling**

HEK293T cells transiently expressing myc-WTV2R or myc-W164SV2R were starved for 30 minutes in methionine/cysteine-free DMEM, labelled for 30 minutes with 450  $\mu$ Ci/100mm petri dishes of [<sup>35</sup>S]-Translabel. Cells were solubilized in 0,5% digitonin for 30 minutes. Immunoprecipitation was then carried out on the solubilized fraction using anti-calnexin or anti-myc antibodies and sepharose-conjugated protein G. Following denaturation of the immunoprecipitate in 1% SDS, the receptors were immunoprecipitated using agarose-coupled anti-myc antibodies. Immunopurified receptors were finally resolved on 10% SDS-PAGE and the gel treated with En<sup>3</sup>Hance autoradiography enhancer before being exposed to Biomax film at – 80°C.

### **Immunoprecipitation and Western blot**

Cells were lysed by sonication and membranes centrifuged at 36 000 g for 20 minutes. The crude membrane preparation was then solubilized in 0.5% *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (Roche Biochemicals) for 1 hour and centrifuged 1h at 145 000 g to get rid of insoluble material. Immunopurified receptors, using an anti-myc antibody and sepharose-coupled protein G, were subsequently resolved on 10% SDS-PAGE and transfer on a nitrocellulose membrane. Immunoblotting of DRiP78-GFP and GFP-Ubiquitin were performed using rabbit anti-GFP antibody while the calnexin was performed using rabbit anti-calnexin antibody. Immune complexes were then visualized by chemiluminescence detection using anti-rabbit horseradish

peroxidase-conjugated IgG. Immunoblotting of myc-V2R was performed using mouse anti-myc horseradish peroxidase-conjugated IgG.

### **Bioluminescence resonance energy transfer assay**

HEK293T cells transiently transfected with a constant amount of DNA constructs encoding the various *Rluc*-tagged proteins along with increasing quantities of vectors encoding the GFP-tagged were washed with PBS/ 0.1% glucose, detached with PBS/ 5mM EDTA and resuspended in PBS/ 0.1% glucose. Cells were then distributed in 96-well microplates (white Optiplate) at a density of ~100 000 cells/well. DeepBlueC coelenterazine was added at a final concentration of 5  $\mu$ M and readings immediately collected using a modified Top-count apparatus (BRETCount, Packard) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370-450 nm and 500-530 nm windows using filters (Chroma) with the appropriate band pass. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the fluorescence emitted by the protein-GFP10 (500-530 nm) over the light emitted by the protein-*Rluc* (370-450 nm) following the addition DeepBlueC coelenterazine. The values were corrected by subtracting the background signal detected when the protein-*Rluc* was transfected alone. Total luminescence (protein-*Rluc*) and fluorescence (protein-GFP) was measured in each sample using a lumicount and fluorocount (Perkin Elmer Life Sciences). The BRET signal obtained was plotted against the ratio of *Rluc* luminescence/GFP fluorescence.

### **Statistical analysis**

Statistical significance of the difference was determined using paired Student's t-test analysis.

## RESULTS

### Functional rescue of W164SV2R by an SR121463 treatment

As indicated in the introduction, non-peptidic antagonists have been proposed to rescue the cell surface expression and function of many NDI ER-retained V2R mutants by binding the mutant proteins in the ER and promoting a conformation that is compatible with ER export and plasma membrane targeting (Morello *et al.*, 2000b;Wuller *et al.*, 2004;Bernier *et al.*, 2004c). To further test this hypothesis and explore where, in the quality control system, this pharmacological chaperoning takes place, we studied the effects of the V2R antagonist, SR121463, on the processing of the ER-retained W164SV2R mutant.

The concept that pharmacological chaperones act by promoting a conformation that is similar or identical to that of the native WT receptor conformation infers that the mutant receptor is retained because it adopts a conformation that is recognized as a misfolded product. To confirm that W164SV2R is indeed retained in the ER because it fails to reach its native state, we took advantage of the fact that decreasing cell growth temperature (from 37°C to ~30°C) slows the folding and quality control processes thus generally helping protein folding and allowing a greater proportion of mutant proteins to reach a near-native state (Denning *et al.*, 1992). To assess the effect of a lower temperature growth on W164SV2R cell surface expression, HEK293T cells transiently expressing N-terminally myc-tagged W164SV2R were grown at either 37°C or 30°C for 16 hours. Cell surface receptor expression was assessed by immunofluorescence microscopy using an anti-myc antibody. As shown in figure 1, almost no receptor could be detected at the surface of cells grown at 37°C consistent with the ER-retention profile of this mutant. In contrast, substantial surface immunoreactivity was observed in cells



grown at 30°C indicating that decreasing the temperature increased the proportion of W164SV2R that could reach the cell surface thus confirming the conformational nature of the mutation.

The pharmacological chaperoning action of SR121463 was then assessed in cells grown at 37°C. As shown in figure 2, treatment with SR121463 for 16 hours restored cell surface expression of myc-W164SV2R as assessed by immunofluorescence microscopy and ELISA. As previously shown for other NDI mutants (Morello *et al.*, 2000b;Wuller *et al.*, 2004;Bernier *et al.*, 2004c), the W164SV2R targeted to the plasma membrane following SR121463 treatment were functional. Indeed, whereas AVP was unable to promote cAMP production in control W164SV2R-expressing cells, a 46 fold AVP-promoted stimulation was observed in SR121463-treated cells (Figure 2C). Taken together, these results confirm that SR121463 acts as a pharmacological chaperone on the W164SV2R conformational mutant. This mutant was therefore used as a model to further explore the molecular mechanism underlying pharmacological chaperoning.

### **Effect of an SR121463 treatment on W164SV2R ubiquitination**

If, as previously proposed, pharmacological chaperones act in the ER by stabilizing near-native conformations, one would predict that the increased maturation and cell surface expression promoted by SR121463 should be accompanied by a reduction in the number of receptor being targeted for degradation through the ubiquitination-dependent pathway. To test this hypothesis, the effects of SR121463 were assessed in parallel on the maturation and ubiquitination of W164SV2R. To this aim, cells expressing myc-W164SV2R and a GFP-tagged ubiquitin (GFP-Ubi) were treated or not with SR121463 for 16 hours, the receptors solubilized,

immunoprecipitated and resolved by SDS-PAGE. The maturation state of the receptor was then assessed by western blot analysis using an anti-myc antibody whereas the extent of ubiquitination was probed on the same membrane using an anti-GFP antibody. In untreated cells, four predominant immunoreactive species corresponding to an deglycosylated degradation intermediate (~38kDa) (Petaja-Repo *et al.*, 2001), the core glycosylated precursor form (~40kDa) (Petaja-Repo *et al.*, 2001), and higher molecular weight species (~70 kDa and ~92 kDa) were detected (Figure 3A). Consistent with the deficient ER processing of W164SV2R, almost no immunoreactivity could be seen at the expected mobility for the mature receptor form (~48kDa). In contrast, an immunoreactive band corresponding to the mature receptor form could be readily detected following SR121463 treatment confirming that the pharmacological chaperone favoured the processing of the core glycosylated precursor to the fully glycosylated mature form of the W164SV2R. The specific glycosylation state of each of the species was confirmed by endoglycosidase H and PNGase F treatments (data not shown). Laser scanning of the blots revealed that the proportion of mature W164SV2R form increased from less than 5% in control conditions to 42% following SR121463 treatment (Figure 3A, lower panel). As shown in figure 3B, the poor processing of W164SV2R in control conditions was accompanied by a significant basal level of receptor polyubiquitination. Indeed, a strong GFP-ubiquitin immunoreactive signal was detected in the receptor immunoprecipitate that appeared as a smear that extends to the top of the gel; a pattern highly characteristic of protein polyubiquitination. Treatment with SR121463 for 16 hours led to an important decrease in the polyubiquitination immunoreactive signal. When controlled for the total amount of receptor immunoprecipitated, the ubiquitination signal was found to be reduced by 52% (Figure 3B, lower panel) indicating that the increased receptor maturation is accompanied by a decrease in the proportion of receptor being targeted to the polyubiquitination-dependent degradation pathway. Similar results were obtained when the

ubiquitination was assessed using a polyclonal anti-ubiquitin antibody to reveal the blots or after sequentially immunoprecipitating the ubiquitinated proteins and then the receptor confirming that the signal resulted from the ubiquitination of the receptor itself (data not shown).

Two distinct mechanisms can be invoked to explain the SR121463-promoted reduction on W164SV2R ubiquitination. 1) Binding of the pharmacological chaperone stabilizes folding intermediates, allowing longer time for the receptor to reach its native conformation thus resulting in less receptor being targeted to the polyubiquitination/degradation pathway. 2) Binding of the pharmacological chaperone favours the folding of the receptor either by inducing the proper folding or by stabilizing native or near-native conformations thus actively leading to the ER-escape and maturation of a greater proportion of the receptor. These two hypothetical mechanisms of action would have opposite effects on the interaction between the folding receptor and specific molecular chaperones. Indeed, stabilization of folding intermediates should result in a longer interaction with molecular chaperones that assist folding while stabilization of native or near-native conformation should decrease such interactions. As indicated in the introduction, one of the molecular chaperones that have been previously proposed to assist folding of the V2R is calnexin (Morello *et al.*, 2001).

### **Effect of an SR121463 treatment on the interaction between calnexin and W164SV2R**

To assess the effect of SR121463 treatment on the interaction between W164SV2R and the molecular chaperone calnexin, the amount of calnexin associated to the receptor was first assessed by Western blot analysis following the immunoprecipitation of myc-W164SV2R transiently expressed in HEK293T cells. As previously observed in figure 3A, 16 hour treatment

with SR121463 led to a dramatic increase in the amount of fully glycosylated mature W164SV2R monomers (Figure 4A). This increase in maturation efficacy was accompanied by a significant reduction of the calnexin co-immunoprecipitated with the receptor as assed by the probing of the same membranes with an anti-calnexin antibody (Figure 4B). When controlled for the amount of receptor immunoprecipitated, the amount of calnexin associated with the receptor was found to be reduced by 55 % following SR121463 treatment (Figure 4B, lower panel). This effect of SR121463 on the interaction with calnexin is consistent with a model whereby the pharmacological chaperone stabilizes native or near-native conformations leading to an accelerated release of the mutant receptor from calnexin.

To directly test the hypothesis that SR121463 treatments changes the kinetic of interaction between the mutant receptor and calnexin, the association time between W164SV2R and the molecular chaperone was directly assessed in pulse-chase labelling experiments. For this purpose, cells expressing W164SV2R were treated or not with SR121463 for 16 hours before being labelled for 30 minutes in a methionine/cysteine-free medium containing [<sup>35</sup>S]methionine/cysteine. A chase of up to 90 minutes was then initiated in the continued presence or absence of SR121463 and the maturation of the receptor as well as its association with calnexin assessed by sequential immunoprecipitation. As shown in figure 5A, only the precursor (~40kDa) and deglycosylated degradation intermediate (~38kDa) could be readily detected in untreated cells following receptor immunoprecipitation. No increase in the mature receptor form could be detected during the chase under control conditions despite the time-dependent decrease in the radio-labelled precursor form confirming that almost all synthesized W164SV2R are targeted for degradation. In contrast, appreciable maturation could be seen during the chase period, following SR121463 treatment, as indicated by the apparition of the

~48kDa mature form of the receptor. Using the same samples, the evolution of the calnexin-associated receptors was assessed by first immunoprecipitating calnexin and then the receptor present in the calnexin immunoprecipitate. As expected, only the precursor form and the deglycosylated degradation intermediate were co-immunoprecipitated with calnexin whether the cells were treated or not with SR121463 (Figure 5B). The amount of radio-labelled receptor associated with calnexin decreased during the chase period reflecting the release of receptor from calnexin either to enter the secretory pathway or to be targeted for degradation. Although such dissociation occurred both in SR121463-treated and untreated cells, the treatment with the pharmacological chaperone dramatically increased the rate of dissociation. Indeed, while more than 50% of the receptor initially (before initiating the chase) co-immunoprecipitated with calnexin were still associated with the molecular chaperone after 90 minutes of chase under basal conditions, almost no receptor could be detected at the same time when the cells were pre-treated with SR121463 (Figure 5B). The quicker release from calnexin promoted by the SR121463 indicates that the pharmacological chaperone acts before or while calnexin is bound to the receptor most likely by stabilizing a native or near-native conformation.

Although the effect of the pharmacological chaperone treatment on the ubiquitination and calnexin interaction kinetics are consistent with the notion that the SR121463 acts by binding and stabilizing specific conformation(s) of the receptor in the ER, these data do not rule out a possible role for SR121463-promoted signalling at the cell surface. Indeed, SR121463 has previously been shown to act as an inverse agonist inhibiting the spontaneous receptor-stimulated adenylyl cyclase activity and weakly activating the mitogen-activated protein kinase (Azzi *et al.*, 2003). To test whether the signalling activity of SR121463 could play a role in its pharmacological chaperoning action, the effects of a 16 hour SR121463 treatment were assessed in the presence of

a 100 fold excess of the peptide antagonist, H3192, that cannot cross the membrane but should occupy all surface receptor and either block or mimic the possible signalling effect of SR121463 at the plasma membrane. The concomitant treatment with H3192 did not mimic nor block the effect of SR121463 on the ubiquitination state or on the interaction with calnexin (data not shown), confirming that SR121463 acted intracellularly.

### **Dimerization of V2R**

Since GPCR homo and heterodimerization have been suggested to occur early in the biosynthetic pathway most likely in the ER (Terrillon and Bouvier, 2004) and to possibly play a role in quality control (Salahpour *et al.*, 2004; Kaykas *et al.*, 2004) and receptor trafficking (Marshall *et al.*, 1999; Hague *et al.*, 2004a; Hague *et al.*, 2004b), we next examined whether a mutation such as W164S, which leads to the ER-retention of the receptor, could affect the propensity of the receptor to dimerize and whether pharmacological chaperone could influence such dimerization. To address these questions, we took advantage of a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) approach that allows to probe the proximity between two proteins by measuring the transfer of energy between a luminescent donor (*Rluc*) and a fluorescent acceptor (GFP) attached to the proteins of interest (Xu *et al.*, 1999) and was successfully used to study GPCR dimerization in living cells (Angers *et al.*, 2000; Kroeger *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2002; Ramsay *et al.*, 2002; Terrillon *et al.*, 2003). The dimerization of WTV2R and W164SV2R was therefore monitored by measuring the transfer of energy between WT- and W164S- V2R-*Rluc* and V2R-GFP10 fusion proteins. The two hybrid proteins were transiently co-transfected in HEK293T cells and the energy transfer between the two partners determined following the addition of coelenterazine DeepBlueC, the substrate for *Rluc*. The

propensity of the receptor to dimerize was specifically assessed in BRET titration experiments where the amount of the energy donor (receptor-Rluc fusion) is maintained constant while the amount of energy acceptor (receptor-GFP10 fusion) is gradually increased. The BRET signal is then expressed as a function of the ratio of total GFP10 fluorescence/ total Rluc luminescence. As previously reported, such analysis allows to distinguish specific from non-specific interactions and to compare the relative propensity of receptors to assemble into oligomeric complexes (Mercier *et al.*, 2002; Ramsay *et al.*, 2002). As shown in figure 6, the BRET signal increased as a hyperbolic function of the GFP10/Rluc ratio for both the W164SV2R-Rluc/W164SV2R-GFP10 and WTV2R-Rluc/WTV2R-GFP10 pairs consistent with the formation of specific dimers for the two receptors. This contrasts with the weak and quasi-linear increase in the BRET signal observed between W164SV2R-Rluc and the unrelated GPCR GABA<sub>B</sub>R2-GFP10 used as specificity control. The positive BRET signal observed for the WT V2R confirms previous studies demonstrating that this receptor can readily form homodimers (Terrillon *et al.*, 2003). The very similar BRET curves observed for the WTV2R and W164SV2R dimers indicates that the mutation did not noticeably influenced the dimerization process suggesting that the oligomeric assembly occurs before the receptor reaches its completely folded native conformation. Consistent with this conclusion that dimerization occurs previous to ER-export most likely very early in the folding processes is the observation that treatment with the SR121463 did not affect the BRET titration curve observed for the W164SV2R-Rluc/W164SV2R-GFP10 pair (Figure 6) suggesting that the pharmacological chaperone action occurs downstream of the dimerization process.

## **Effect of an SR121463 treatment on the interaction between DRiP78 and W164SV2R**

The preceding results indicate that assessing the effect of the pharmacological chaperone on specific steps of the quality control system allows their relative positioning in the cascade of events leading from receptor initial folding to its export from the ER. As indicated in the introduction, a previous study has suggested that DRiP78, an ER-resident transmembrane protein, could act as ER export protein for GPCR (Bermak *et al.*, 2001). However, other data have indicated that the receptor region involved in DRiP78 binding is implicated in receptor folding rather than export (Krause *et al.*, 2000) thus raising questions concerning the exact role of this newly uncovered ER protein. In an effort to further our understanding of the role of DRiP78, we took advantage of the pharmacological chaperone action to locate DRiP78 within the quality control cascade. Indeed, if DRiP78 acts as a specialized ER-export protein downstream of the effect of SR121463 on calnexin, one would expect that its interaction with ER-retained mutant receptors would be affected by the pharmacological chaperone. To test this hypothesis, we investigated the interactions between DRiP78 and both WTV2R and W164SV2R in the presence and absence of SR121463.

First, the subcellular distribution of DRiP78, WTV2R and W164SV2R was assessed by confocal fluorescence microscopy. As shown in figure 7A, DRiP78-GFP colocalized almost perfectly with the W164SV2R in a perinuclear region and a reticulated network of permeabilized cells, consistent with the ER localization of the two proteins. This contrast with the lack of colocalization between DRiP78-GFP and the cell surface WTV2R in non-permeabilized cells (Figure 7B) confirming that DRiP78 cannot reach the plasma membrane and is most likely an ER-resident protein (Bermak *et al.*, 2001).



The potential interaction between DRiP78 and both WTV2R and W164SV2R was then assessed by co-immunoprecipitation. myc-W164SV2R or myc-WTV2R transiently expressed with DRiP78-GFP were immunoprecipitated using an anti-myc antibody and the extent of association with DRiP78-GFP assessed by Western blot analysis using an anti-GFP antibody. As shown in figure 7C, DRiP78 could be co-immunoprecipitated with both W164SV2R and WTV2R and the SR121463 treatment was without apparent effect on the extent of co-immunoprecipitation (data not shown). Although the co-immunoprecipitation data indicate that the SR121463 treatment does not effect the interaction of W164SV2R with DRiP78, this interaction was further investigated in living cells using BRET.

To monitor the interaction between the receptors and DRiP78, BRET titration curves were carried out as described above in cells transiently co-expressing DRiP78-Rluc and either WTV2R-GFP10 or W164SV2R-GFP10. As shown in figure 8A, hyperbolic and saturable BRET titration curves were obtained for both WTV2R-GFP10 and W164SV2R-GFP10 indicating specific interactions between DRiP78 and the V2Rs. Similarly to what was observed in the co-immunoprecipitation experiments, the 16 hour treatment with SR121463 was without effect on the BRET titration curve for either WTV2R or W164SV2R indicating that the pharmacological chaperone is without effect on the interaction between the receptors and DRiP78. These results indicate that DRiP78 acts before the pharmacological chaperone within the ER quality control cascade. Given the fact that the SR121463 treatment did decrease the extent and the time of interaction between W164SV2R and calnexin, these data strongly suggest that DRiP78 acts on the receptor before calnexin and thus probably not as an ER-export protein.

As indicated above, previous studies have suggested that DRiP78 overexpression can inhibit the cell surface expression of D1R and M2R (Bermak *et al.*, 2001). It could therefore be argued that the lack of effect of SR121463 treatment on the interaction between W164SV2R and DRiP78 could be due to an inhibition of the export of the receptor resulting from the overexpression of DRiP78-GFP10. To directly test this possibility, we again used BRET but this time taking advantage of the fact that the extent of the maximal BRET signal is determined by the proportion of the total *Rluc*-fusion protein that is available for the interaction. Indeed, the *Rluc*-fusion protein that is unavailable for the interaction (for example as a result of localization in a different subcellular compartment) contributes to a luminescence signal that cannot be transmitted to the GFP10-fusion protein thus yielding a lower maximal BRET signal (the BRET signal being calculated as the ratio of light emitted by the GFP10/ the total luminescence). Thus, the effect of the SR121463 on the exit of W164SV2R from the ER was assessed by monitoring the BRET between W164SV2R-*Rluc* and DRiP78-GFP10 (the inverse orientation of the one used to probe the interaction between the receptors and DRiP78 in the ER). As shown in figure 8B, the maximal BRET signal obtained between W164SV2R-*Rluc* and DRiP78-GFP10 was dramatically reduced by the pharmacological chaperone treatment indicating that an important proportion of the W164SV2R-*Rluc* was exported from the ER and thus could not interact anymore with the ER-resident DRiP78-GFP10. As expected, the SR121463 treatment had no effect on the maximal BRET signal observed between WTV2R-*Rluc* and DRiP78-GFP10 consistent with the fact that this receptor could already be exported out of the ER under basal conditions. Taken together, these results clearly indicate that overexpression of DRiP78-GFP10 did not inhibit the pharmacological chaperone action on the ER export of W164SV2R. Therefore, the lack of effect of SR121463 on the interaction between the mutant receptor and DRiP78, assessed in the ER, most-likely reflects an action of the pharmacological chaperone downstream of DRiP78.

The effect of DRiP78 on the receptor expression was then directly assessed. For this purpose, myc-W164SV2R or myc-WTV2R were co-expressed with different concentrations of DRiP78-GFP, the receptors immunoprecipitated and the myc-immunoreactivity revealed by Western-blot analysis. As shown in figure 9A, overexpression of DRiP78 had no effect on the amount of immunoreactive W164SV2R detected. Not only was the amount of precursor form not increased but the overexpression of DRiP78 did not promote the formation of mature receptors that remained undetectable. Not surprisingly, no vasopressin-stimulated cAMP accumulation could be detected in cells expressing W164SV2R whether DRiP78 was overexpressed or not consistent with the lack of mature receptor (Figure 9B). In contrast, overexpressing DRiP78 had a dose dependent effect on the amount of immunoreactive WTV2R immunoprecipitated (Figure 9C). Interestingly, both the precursor and mature forms of the receptors appeared to be increased proportionally indicating that DRiP78 stabilized folding intermediates rather than promoting the maturation of an increased proportion of the receptor. This increase in receptor expression was accompanied by a significant potentiation of the vasopressin-stimulated cAMP production observed in cells co-expressing myc-WTV2R and DRiP78-GFP (Figure 9D) confirming that more mature and functional receptors were expressed in these cells. These results suggest that overexpression of DRiP78 is not sufficient to correct the misfolding of a mutant V2R but can promote the processing of properly folded WT receptor.

## DISCUSSION

Previous studies have shown that pharmacologically selective receptor ligands can rescue cell surface expression and function of otherwise ER-retained mutant GPCRs (Reviewed in (Bernier *et al.*, 2004a)). Based on the observations that only lipophilic compounds permeating cell membranes have this effect (Morello *et al.*, 2000b;Petaja-Repo *et al.*, 2002;Janovick *et al.*, 2002;Bernier *et al.*, 2004c) and that treatment with these compounds promoted receptor maturation from core glycosylated precursor to fully glycosylated mature forms (Morello *et al.*, 2000b;Petaja-Repo *et al.*, 2002;Bernier *et al.*, 2004c), it was proposed that the ligands acted as pharmacological chaperones by binding to the receptors in the ER, somehow allowing them to escape the quality control system and reach their site of action. In the present study, the demonstration that SR121463 decreases the ubiquitination of the ER-retained W164SV2R mutant and modulates its interaction with the molecular chaperone calnexin unambiguously confirms the ER as the site of action of the pharmacological chaperone.

Although the pharmacological chaperones act in the ER, their selectivity of action indicate that they interact with the receptor through its classical binding pocket thus inferring that the receptor has to be at least partially folded before the pharmacological chaperone can act. This leaves two potential mechanisms of action. 1) The pharmacological chaperone binds and stabilizes folding intermediates that have acquired at least a primitive binding pocket, protecting them against aggregation or degradation thus allowing longer time for the receptor to reach the native conformation that can then escape the ER. This “kinetically based” mechanism of action is reminiscent of the one proposed to explain the effect of cell growth temperature on protein maturation efficacy (Denning *et al.*, 1992). 2) The pharmacological chaperone favours the folding

of the receptor either by inducing the proper folding or by stabilizing native or near-native conformations thus actively leading to the ER-escape. The observation that SR121463 treatment decreased the interaction time between the folding receptor and calnexin clearly favours the second mechanism since stabilization and protection of folding intermediates against degradation should have lead to an increased association time with calnexin. Our finding that calnexin can interact with V2R and that this interaction can be modulated by selective receptor ligands also confirms previous findings indicating that this molecular chaperone of the primary quality control system plays an important role in the folding of GPCR (Rozell *et al.*, 1998;Morello *et al.*, 2001;Siffroi-Fernandez *et al.*, 2002;Lu *et al.*, 2003;Butz *et al.*, 2003). Of particular interest, we found that calnexin could be co-immunoprecipitated with both the core-glycosylated precursor and deglycosylated degradation intermediate of the receptor. This is consistent with the dual role that calnexin plays in assisting the folding of the protein precursors on one hand and escorting the protein that cannot reach their native state to the degradation machinery on the other hand (Kamhi-Nesher *et al.*, 2001).

Given the important role that calnexin is believed to play in sensing and controlling protein folding in the ER, it may not be surprising to find that the pharmacological chaperone influences its interaction with ER-retained receptors. However, in addition to show that the pharmacological chaperones interact with the receptors and have their action before the receptor leaves calnexin, this finding provides a useful tool to position specific receptor folding events in relation to calnexin. The observation that W164SV2R and WTV2R had the same propensity to dimerize and that SR121463 had no influence on the dimerization clearly positions receptor dimer assembly before calnexin binding demonstrating as previously suggested that GPCR

dimerization occurs at an early step in the biosynthetic pathway (Terrillon *et al.*, 2003;Salahpour *et al.*, 2004) most likely before folding is completed.

The lack of effect of SR121463 on the interaction between W164SV2R and DRiP78 in the ER clearly indicates that DRiP78 is acting before the receptor leaves calnexin. Indeed, if DRiP78 acted downstream from calnexin, one would predict that the SR121463-promoted release of W164SV2R from calnexin would lead to an increased interaction between the mutant receptor and DRiP78. This observation contrasts with the proposition that DRiP78 could be an ER-export molecule for GPCRs (Bermak *et al.*, 2001) which by definition should act downstream of calnexin release. It may rather suggest that DRiP78 is a molecular chaperone; a proposition in line with the demonstration that a hydrophobic motif located close to the putative DRiP78 binding site of V2R serves as folding sensor and not ER-export signal (Krause *et al.*, 2000).

Two main groups of molecular chaperones involved in the process of folding of secreted and membrane proteins have been described (Molinari and Helenius, 2000). The first group, a pre-assembled complex including BiP (or GRP78), GRP94, CaBP1, PDI, cyclophilin B, ERp72, GRP170, UDP-glucosyltransferase and SDF2-L1, functions more by preventing aggregation of newly synthesized proteins by binding to hydrophobic patches and act while the protein is being translocated in the ER lumen (Meunier *et al.*, 2002). The second group of molecular chaperones, including calnexin and calreticulin, would have a more active role in assisting the folding of the neo-synthesized proteins (Molinari and Helenius, 2000). Since DRiP78 appears to bind close to a hydrophobic motif (Bermak *et al.*, 2001) and to exert its action before calnexin, it could be proposed that DRiP78 may belong to the first group of molecular chaperones interacting with BiP. Such an early action of DRiP78 with a group of molecular chaperones involved in protecting

the neo-nascent protein against aggregation and degradation rather than in the active folding or in ER export would be consistent with the observation that its overexpression can increase both the precursor and mature forms of the WT receptor without assisting the folding of the mutant receptor.

In conclusion, our data clearly indicate that the pharmacological chaperone SR121463 rescues cell surface expression and function of the ER-retained W164SV2R by stabilizing native or quasi-native receptor conformation thus favouring a rapid release from calnexin. Our data also suggest that the recently discovered ER-resident protein DRiP78 functions as a molecular chaperone acting upstream of calnexin rather than as an ER-export protein as previously suggested. Taken together, our results clearly demonstrate that pharmacological chaperones can restore the biological function of ER-retained mutants by interfering with specific steps of the quality control system of the ER thus opening the way for the development of new therapeutic strategies targeting the quality control system for the treatment of the growing list of conformational diseases.

## REFERENCES

Angers,S., Salahpour,A., Joly,E., Hilairet,S., Chelsky,D., Dennis,M., Bouvier,M. (2000). Detection of beta2-Adrenergic Receptor Dimerization in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97, 3684-3689.

Azzi,M., Charest,P.G., Angers,S., Rousseau,G., Kohout,T., Bouvier,M., Pineyro,G. (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 11406-11411.

Bermak,J.C., Li,M., Bullock,C., Zhou,Q.Y. (2001). Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat.Cell Biol.* 3, 492-498.

Bernier,V., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2004a). Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr.Opin.Pharmacol.* 4, 528-533.

Bernier,V., Lagace,M., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2004b). Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol.Metab* 15, 222-228.

Bernier,V., Lagace,M., Lonergan,M., Arthus,M.F., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2004c). Functional rescue of the constitutively internalized V2 Vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol.Endocrinol.* 18, 2074-2084.

Bichet, D. G., Bouvier, M., Brouard, R., Morello, J.-P., Bernier, V., Lonergan, M., and Arthus, M. F. Decrease in urine volume and increase in urine osmolality after SR49059 administration in five adult male patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J.Am.Soc.Nephrol.* abstract no SA-FC193 13:40A. 2002.  
Ref Type: Abstract

Butz,J.A., Niebauer,R.T., Robinson,A.S. (2003). Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast. *Biotechnol.Bioeng.* 84, 292-304.

Carrell,R.W., Lomas,D.A. (1997). Conformational disease. *Lancet* 350, 134-138.

Charest,P.G., Bouvier,M. (2003). Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol.Chem.* 278, 41541-41551.

Cohen,F.E., Kelly,J.W. (2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 426, 905-909.

Conn,P.M., Leanos-Miranda,A., Janovick,J.A. (2002). Protein Origami : Therapeutics Rescue of Misfolded Gene Products. *Molecular interventions* 2, 308-316.

Denning,G.M., Anderson,M.P., Amara,J.F., Marshall,J., Smith,A.E., Welsh,M.J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive [see comments]. *Nature* 358, 761-764.



Hague,C., Uberti,M.A., Chen,Z., Bush,C.F., Jones,S.V., Ressler,K.J., Hall,R.A., Minneman,K.P. (2004a). Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 13672-13676.

Hague,C., Uberti,M.A., Chen,Z., Hall,R.A., Minneman,K.P. (2004b). Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *J.Biol.Chem.* 279, 15541-15549.

Janovick,J.A., Maya-Nunez,G., Conn,P.M. (2002). Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87, 3255-3262.

Kamhi-Nesher,S., Shenkman,M., Tolchinsky,S., Fromm,S.V., Ehrlich,R., Lederkremer,G.Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol.Biol.Cell* 12, 1711-1723.

Kaykas,A., Yang-Snyder,J., Heroux,M., Shah,K.V., Bouvier,M., Moon,R.T. (2004). Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization. *Nat.Cell Biol.* 6, 52-58.

Kopito,R.R., Ron,D. (2000). Conformational disease. *Nat.Cell Biol.* 2, E207-E209.

Krause,G., Hermosilla,R., Oksche,A., Rutz,C., Rosenthal,W., Schulein,R. (2000). Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the C-terminal tail of the vasopressin V(2) receptor. *Mol.Pharmacol.* 57, 232-242.

Kroeger,K.M., Hanyaloglu,A.C., Seeber,R.M., Miles,L.E., Eidne,K.A. (2001). Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J.Biol.Chem.* 276, 12736-12743.

Leclerc,P.C., Auger-Messier,M., Lanctot,P.M., Escher,E., Leduc,R., Guillemette,G. (2002). A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology* 143, 4702-4710.

Lu,M., Echeverri,F., Moyer,B.D. (2003). Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic.* 4, 416-433.

Marshall,F.H., Jones,K.A., Kaupmann,K., Bettler,B. (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol.Sci.* 20, 396-399.

Mercier,J.F., Salahpour,A., Angers,S., Breit,A., Bouvier,M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol.Chem.* 277, 44925-44931.

Meunier,L., Usherwood,Y.K., Chung,K.T., Hendershot,L.M. (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol.Biol.Cell* 13, 4456-4469.

Molinari,M., Helenius,A. (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* 288, 331-333.

Morello,J.P., Petaja-Repo,U.E., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2000a). Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol.Sci.* 21, 466-469.

Morello,J.P., Salahpour,A., Laperriere,A., Bernier,V., Arthus,M.F., Lonergan,M., Petaja-Repo,U., Angers,S., Morin,D., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2000b). Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J.Clin.Invest* 105, 887-895.

Morello,J.P., Salahpour,A., Petaja-Repo,U.E., Laperriere,A., Lonergan,M., Arthus,M.F., Nabi,I.R., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2001). Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus. *Biochemistry* 40, 6766-6775.

Perlmutter,D.H. (2002). Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr.Res.* 52, 832-836.

Perroy,J., Adam,L., Qanbar,R., Chenier,S., Bouvier,M. (2003). Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* 22, 3816-3824.

Perroy, J., Pontier, S. M., Charest, P. G., Aubry, M., and Bouvier, M. Real time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nature Methods.* 2004.  
Ref Type: In Press

Petaja-Repo,U.E., Hogue,M., Bhalla,S., Laperriere,A., Morello,J.P., Bouvier,M. (2002). Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *EMBO J.* 21 , 1628-1637.

Petaja-Repo,U.E., Hogue,M., Laperriere,A., Bhalla,S., Walker,P., Bouvier,M. (2001). Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J.Biol.Chem.* 276, 4416-4423.

Ramsay,D., Kellett,E., McVey,M., Rees,S., Milligan,G. (2002). Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem.J.* 365, 429-440.

Rozell,T.G., Davis,D.P., Chai,Y., Segaloff,D.L. (1998). Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin. *Endocrinology* 139, 1588-1593.

Salahpour,A., Angers,S., Mercier,J.F., Lagace,M., Marullo,S., Bouvier,M. (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J.Biol.Chem.* 279, 33390-33397.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). In: *Molecular cloning a laboratory manual* Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Siffroi-Fernandez,S., Giraud,A., Lanet,J., Franc,J.L. (2002). Association of the thyrotropin receptor with calnexin, calreticulin and BiP. Effects on the maturation of the receptor. *Eur.J.Biochem.* 269, 4930-4937.

Smith,D.F., Whitesell,L., Katsanis,E. (1998). Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol.Rev.* 50, 493-514.

Tan,C.M., Brady,A.E., Nickols,H.H., Wang,Q., Limbird,L.E. (2004). Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 44, 559-609.

Terrillon,S., Bouvier,M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5, 30-34.

Terrillon,S., Durroux,T., Mouillac,B., Breit,A., Ayoub,M.A., Taulan,M., Jockers,R., Barberis,C., Bouvier,M. (2003). Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol.Endocrinol.* 17, 677-691.

Tsai,B., Ye,Y., Rapoport,T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3, 246-255.

Wong,Y.H., Federman,A., Pace,A.M., Zachary,I., Evans,T., Pouyssegur,J., Bourne,H.R. (1991). Mutant alpha subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature* 351, 63-65.

Wuller,S., Wiesner,B., Loffler,A., Furkert,J., Krause,G., Hermosilla,R., Schaefer,M., Schulein,R., Rosenthal,W., Oksche,A. (2004). Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J.Biol.Chem.* 279, 47254-47263.

Xu,Y., Piston,D.W., Johnson,C.H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 151-156.

## FOOTNOTES

<sup>1</sup> The abbreviations used are : AT<sub>1A</sub>R, angiotensine type 1A receptor; AVP, arginine-vasopressin; BRET, Bioluminescence Resonance Energy Transfer; D1R, D1 dopamine receptor; DRiP78, Dopamine receptor interacting protein; ER, endoplasmic reticulum; GFP, Green Fluorescent Protein; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK293T, Human Embryonic Kidney 293 cells; M2R, M2 muscarinic receptor; NDI, nephrogenic diabetes insipidus; *Rluc*, *Renilla* luciferase; V2R, V2 vasopressin receptor; WT, wild type

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Claudine Serradeil-Le Gal (Sanofi-Synthelabo Research) for the generous gift of the SR121463. We also thank Dr Monique Lagacé for insightful discussions and the critical reading of the manuscript as well as Louise Cournoyer for technical assistance.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1 : Cell surface expression of W164SV2R at different growth temperature.** HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were incubated at 37°C or 30°C. Surface receptors were detected with mouse anti-myc antibody under non-permeabilized condition. The immunoreactivity was revealed with an Oregon green-conjugated secondary antibody and visualized by fluorescence microscopy using a Nikon-eclipse TE2000-U microscope with a 60X oil immersion objective. The images shown are representative of many fields observed in two independent experiments.

**Figure 2 : Functional rescue of W164SV2R following an SR121463 treatment.** **A.** HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were incubated in the presence or absence of  $10^{-5}$ M SR121463 for 16 hours. Surface receptors were detected with mouse anti-myc antibody under non-permeabilized condition, the immunoreactivity revealed with an Oregon green-conjugated secondary antibody and visualized by fluorescence microscopy using a Nikon-eclipse TE2000-U microscope with a 60X oil immersion objective. The images shown are representative of many fields observed in five independent experiments. **B.** Surface receptors were detected using mouse anti-myc antibody under non-permeabilized condition followed by horseradish peroxidase conjugated anti-mouse antibody. After the addition of the substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride, for 7 minutes, the reaction was stopped with 200  $\mu$ l of 3 N HCl and the extinction was measured at 492 nm. The data represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments (\*  $p < 0.05$ ). **C.** AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in HEK293T cells transiently expressing the myc-W164SV2R. Cells were labelled with [ $^3$ H]adenine and

treated or not with  $10^{-5}$ M SR121463 for 16 hours. Cells were then washed extensively and incubated or not with  $10^{-5}$ M AVP for 20 minutes. Following cell lysis, [ $^3$ H]cAMP was purified by ion exchange chromatography. Data are expressed as [ $^3$ H]cAMP/([ $^3$ H]ATP+[ $^3$ H]cAMP) and represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (\*  $p < 0.05$ ).

**Figure 3 : Ubiquitination of W164SV2R following SR121463 treatment.** HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R and GFP-Ubiquitin were incubated in the presence or absence of  $10^{-5}$ M SR121463 for 16 hours. The receptors were solubilized, immunoprecipitated with a mouse anti-myc antibody, migrated in a denaturing gel and transferred on a nitrocellulose membrane. **A.** The membrane was first incubated with a Horseradish peroxidase-conjugated anti-myc and revealed by autoradiography. The deglycosylated degradation intermediate (D), precursor (P), mature (M) and higher molecular weight ( $\square$ ) species are indicated. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the M/(M+P) species determined. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments (\*  $p < 0.05$ ). **B.** The same membrane was then incubated with a rabbit anti-GFP antibody and revealed by autoradiography. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the ubiquitination/(M+P) species determined. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments (\*  $p < 0.01$ ).

**Figure 4 : Interaction between calnexin and W164SV2R following SR121463 treatment.** HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were incubated in the presence or absence of  $10^{-5}$ M SR121463 for 16 hours. The receptors were solubilized, immunoprecipitated

with a mouse anti-myc antibody, migrated in a denaturing gel and transfer on a nitrocellulose membrane. **A.** The membrane was first incubated with a Horseradish peroxidase-conjugated anti-myc and revealed by autoradiography. The deglycosylated degradation intermediate (D), precursor (P), mature (M) and higher molecular weight ( $\alpha$ ) species are indicated. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the M/(M+P) species determined. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments (\*  $p < 0.05$ ). **B.** The same membrane was then incubated with a rabbit anti-calnexin antibody and revealed by autoradiography. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the calnexin/(M+P) species determined. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments (\*  $p < 0.05$ ).

**Figure 5 : Time of interaction between calnexin and W164SV2R following SR121463 treatment.** HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were incubated in the absence or presence of  $10^{-5}$ M SR121463 for 16 hours. Labelling was carried out with  $450\mu\text{Ci/dishes}$  [ $^{35}\text{S}$ ] methionine/cysteine for 30 minutes, followed by a chase in the continued presence of SR121463 for the indicated times. Sequential immunoprecipitations were carried out with mouse anti-myc antibody and Protein G sepharose followed by agarose-conjugated anti-myc antibody (**A**) or with rabbit anti-calnexin antibody and Protein G sepharose followed by agarose-conjugated anti-myc antibody (**B**), resolved by SDS PAGE and revealed by autoradiography. The deglycosylated degradation intermediate (D), precursor (P) and mature (M) species are indicated. The panels shown are representative of 3 independent experiments. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the calnexin/(M+P) species determined.

**Figure 6 : Dimerization of V2R.** HEK293T cells were transiently co-transfected with W164S-Rluc or WT-Rluc V2R along with increasing amount of W164S-GFP10, WT-GFP10 or GABABR2-GFP10 and incubated in the absence or presence of  $10^{-5}$ M SR121463 for 16 hours. Cells were then washed and transferred to 96-well plates. The energy transfer was initiated by the addition of 5 $\mu$ M DeepBlueC to each well and BRET measured in a modified TopCount apparatus. The BRET values were plotted against the ratio of total GFP/Rluc expression level. Data were obtained from four independent experiments and analyzed by non-linear regression using Prism 3.0.

**Figure 7 : Subcellular localization of DRiP78 and its interaction with V2R.** HEK293T cells were transiently co-transfected with myc-W164S or myc-WT V2R and DRiP78-GFP2. **A.** Cells were then washed extensively, permeabilized and the receptors labelled with a mouse anti-myc antibody. Cells were then fixed and incubated with a Texas red-conjugated secondary antibody to visualize the receptors (red). Direct fluorescence of DRiP78-GFP was detected at 520nm upon excitation at 488nm (green). W164SV2R and DRiP78 images were acquired separately by fluorescence microscopy using a Leica HM IRBE laser-scanning confocal microscope with a 100X oil immersion objective. Colocalization between W164SV2R and DRiP78 was assessed by merging the two images (yellow). The images shown are representative of many fields observed in two independent experiments. **B.** Surface receptors were detected with mouse anti-myc antibody under non-permeabilized condition, the immunoreactivity revealed with an Texas red-conjugated secondary antibody to visualize the receptors (red). Colocalisation with DRiP78 was done as in A. The images shown are representative of many fields observed in two independent experiments. **C.** The receptors were solubilized, immunoprecipitated with a mouse anti-myc antibody, migrated in a denaturing gel and transfer on a nitrocellulose membrane. Subsequently,



the membrane was incubated with a rabbit anti-GFP antibody and revealed by autoradiography. The panels shown are representative of 4 independent experiments.

**Figure 8 : Interaction between DRiP78 and W164S or WT V2R following SR121463 treatment.** **A.** HEK293T cells were transiently co-transfected with DRiP78-Rluc along with increasing amount of W164S-GFP10 or WT-GFP10 V2R, and incubated in the absence or presence of  $10^{-5}$ M SR121463 for 16 hours. BRET experiments were done as in figure 6. Data were obtained from 7 independent experiments and analyzed by non-linear regression using Prism 3.0. **B.** HEK293T cells were transiently co-transfected with W164S-Rluc or WT-Rluc V2R along with increasing amount of DRiP78-GFP2, and incubated in the absence or presence of  $10^{-5}$ M SR121463 for 16 hours. BRET experiments were done as in figure 6. Data were obtained from 6 independent experiments and analyzed by non-linear regression using Prism 3.0.

**Figure 9 : Effect of overexpression of DRiP78 on V2R trafficking.** HEK293T cells transiently transfected with myc-W164S or myc-WT V2R along with different concentration of DRiP78-GFP2. **A. and C.** The receptors were solubilized, immunoprecipitated with a mouse anti-myc antibody, migrated in a denaturing gel and transfer on a nitrocellulose membrane. The membrane was then incubated with a mouse peroxidase-conjugated anti-myc antibody and revealed by autoradiography. The intensity of the bands was determined by densitometry. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments (\*  $p < 0.05$ ). **B. and D.** AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in HEK293T cells transiently expressing the myc-W164S or myc-WT V2R along with different concentration of DRiP78-GFP as in figure 2. Data are expressed as  $[\text{}^3\text{H}]\text{cAMP}/([\text{}^3\text{H}]\text{ATP}+[\text{}^3\text{H}]\text{cAMP})$  and represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments (\*  $p < 0.05$ ).

Figure 1

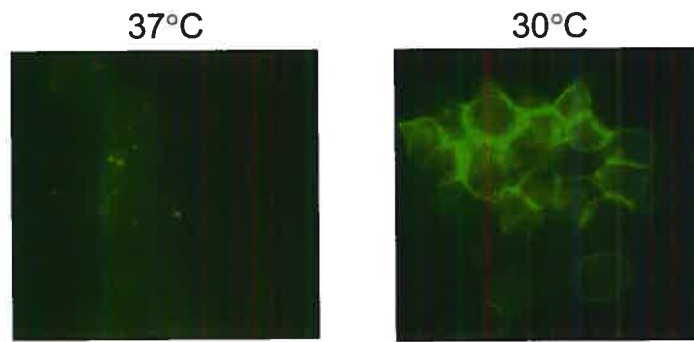


Figure 2

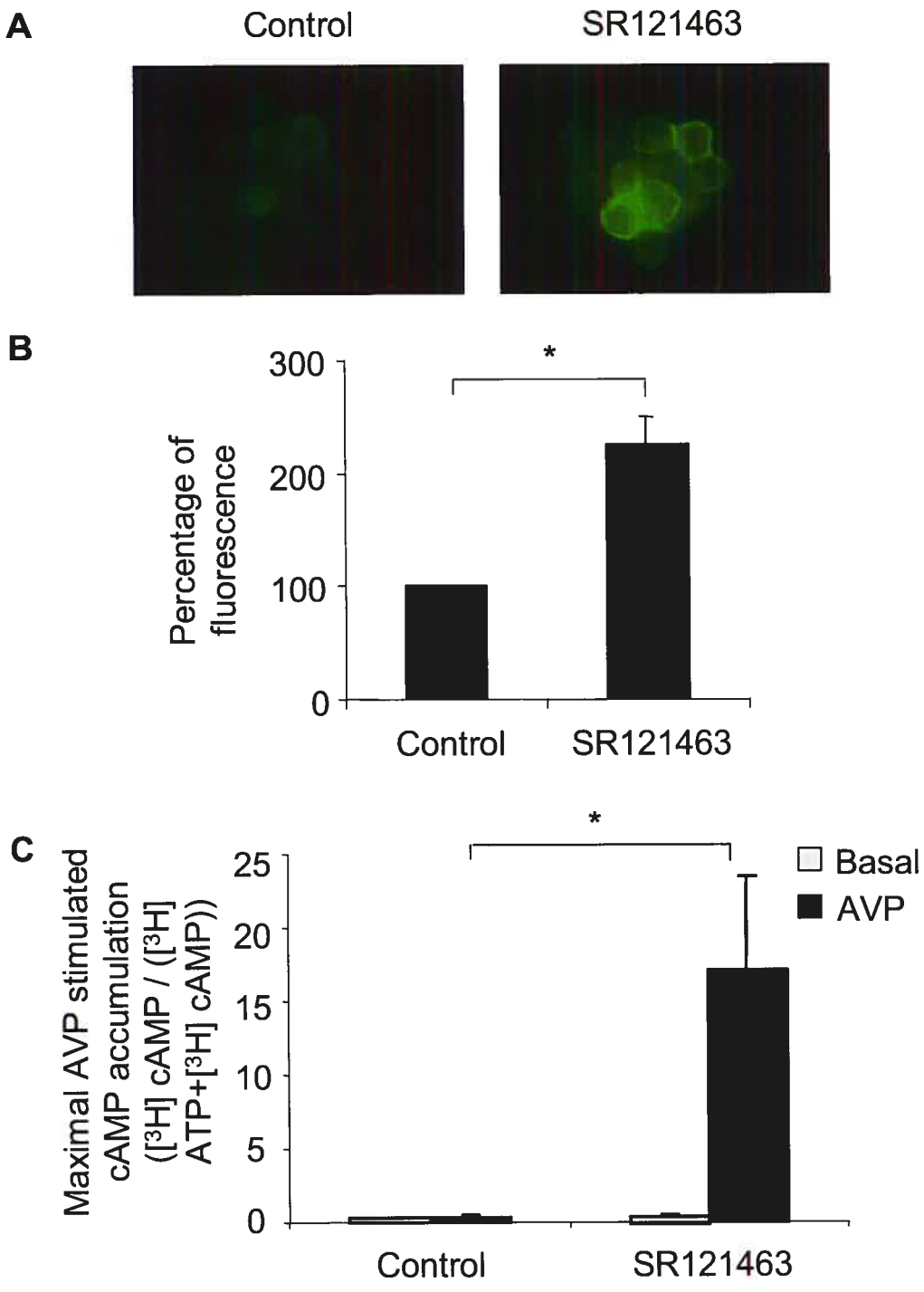


Figure 3

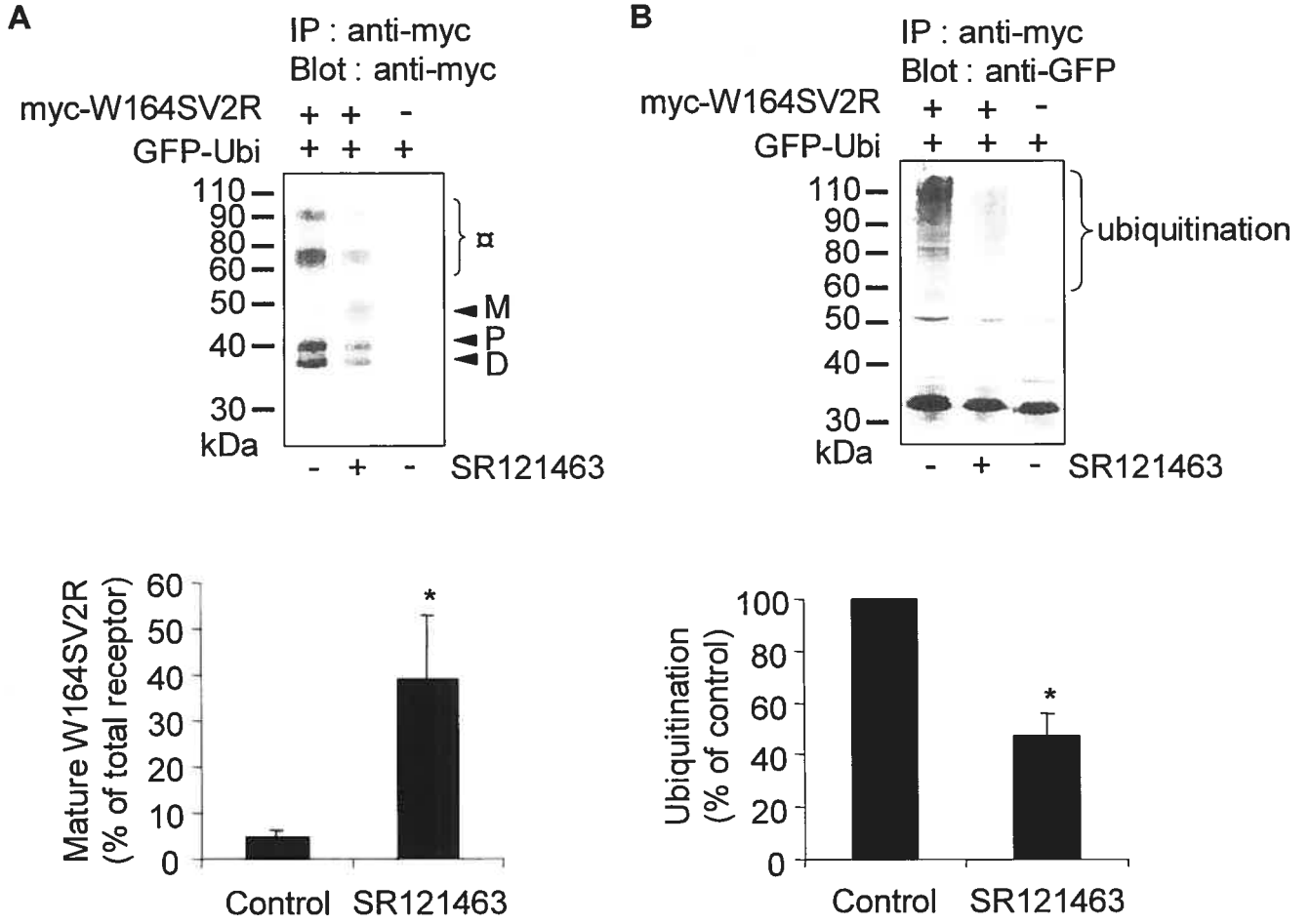


Figure 4

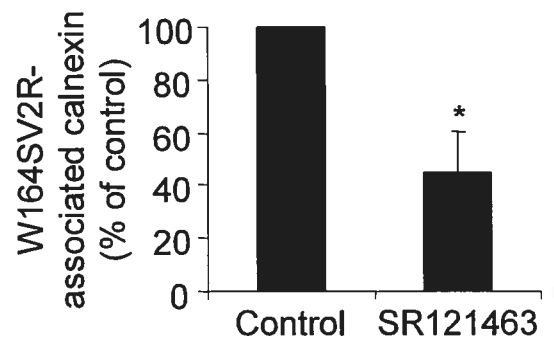
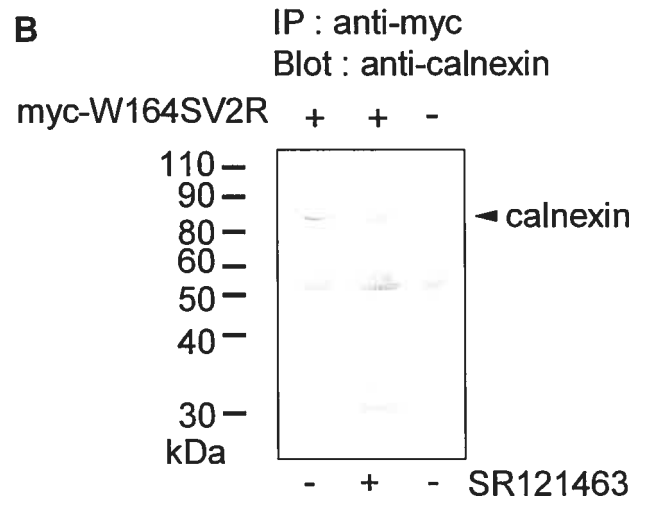
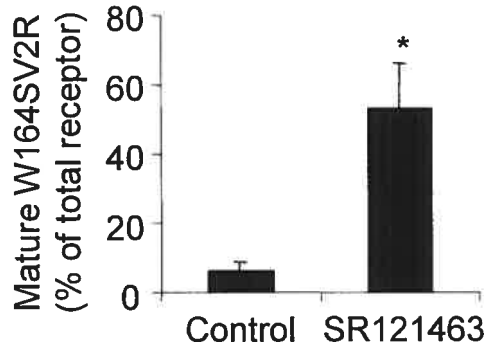
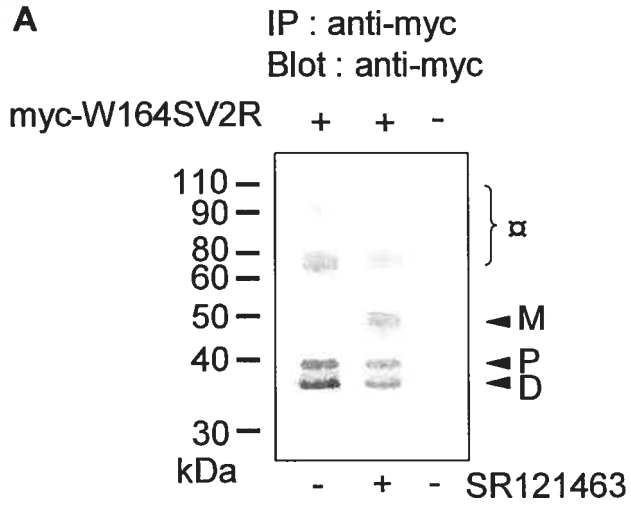


Figure 5

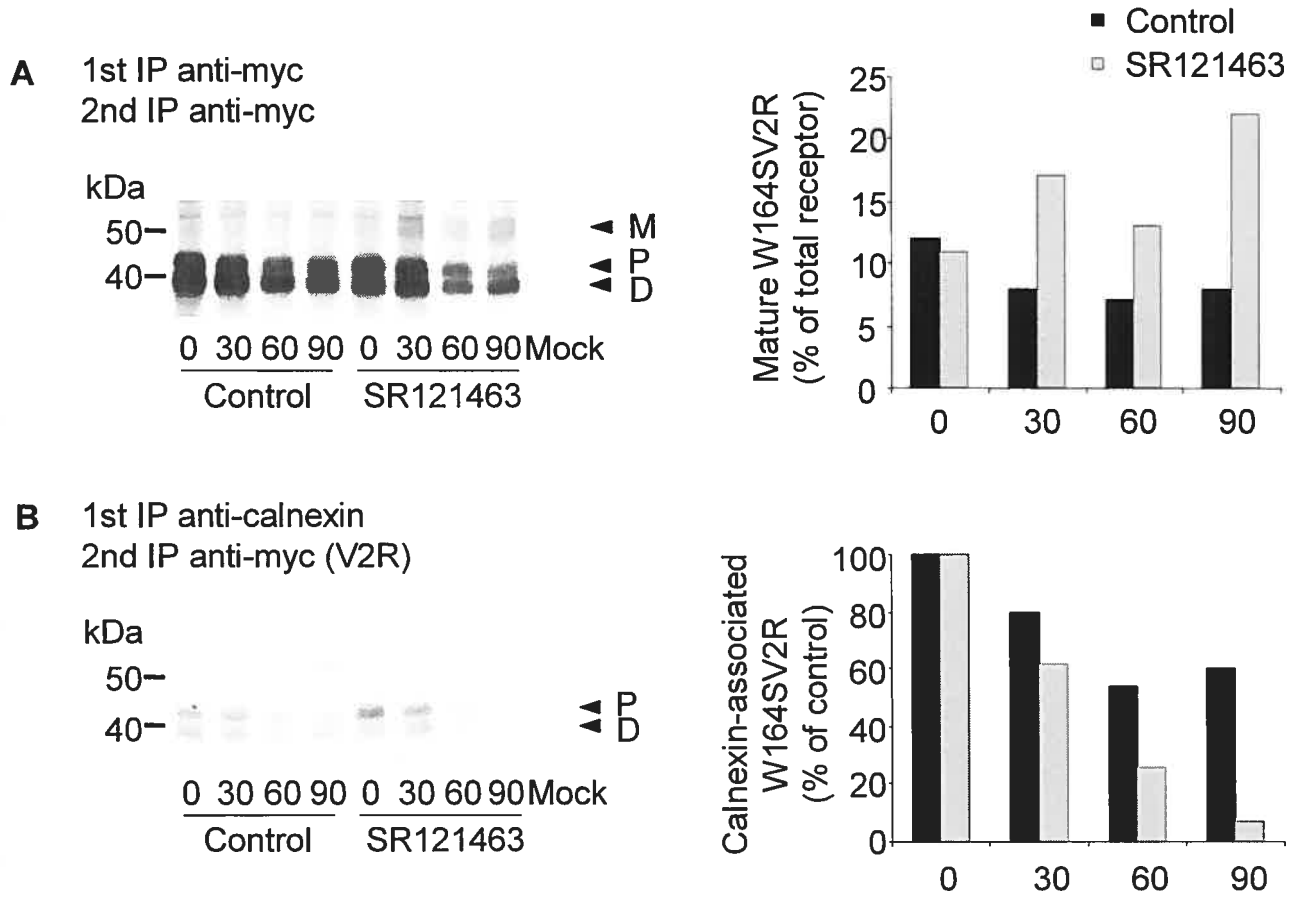
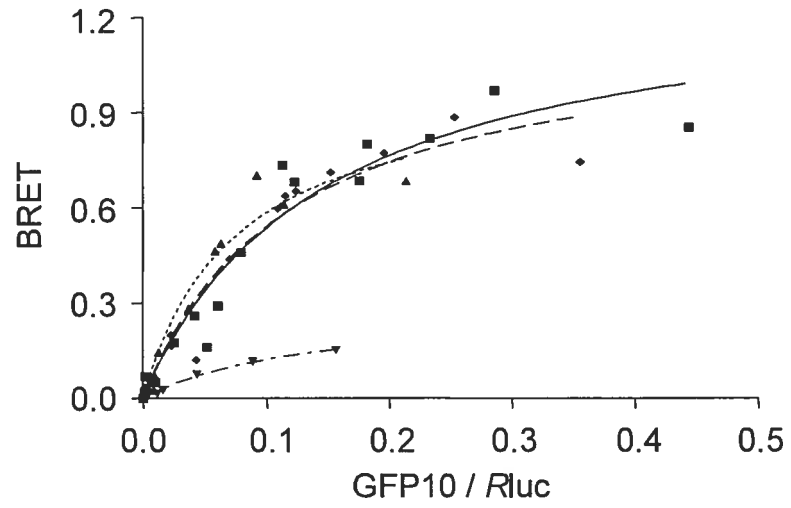


Figure 6



- W164S V2R-Rluc / W164S V2R-GFP10
- ◆ W164S V2R-Rluc / W164S V2R-GFP10 + SR121463
- ▲ WT V2R-Rluc / WT V2R-GFP10
- ▼ W164S V2R-Rluc / HA-GABAbR2-GFP10

Figure 7

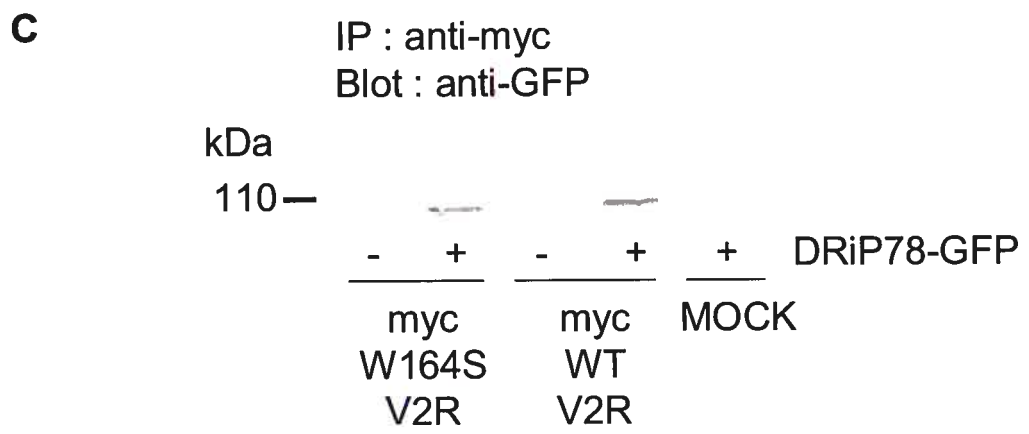
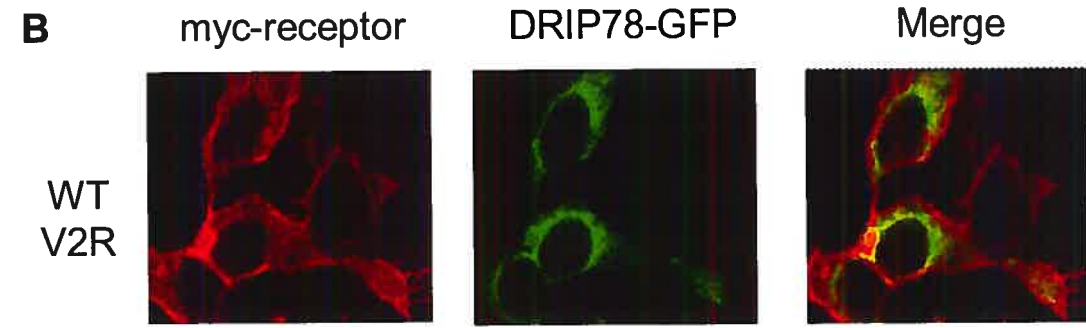
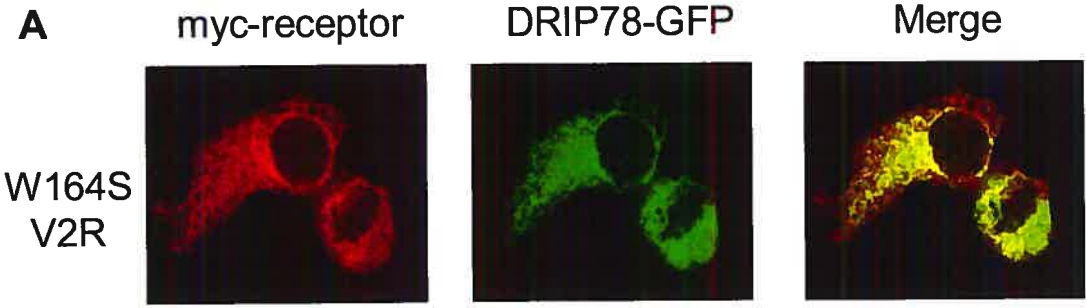




Figure 8

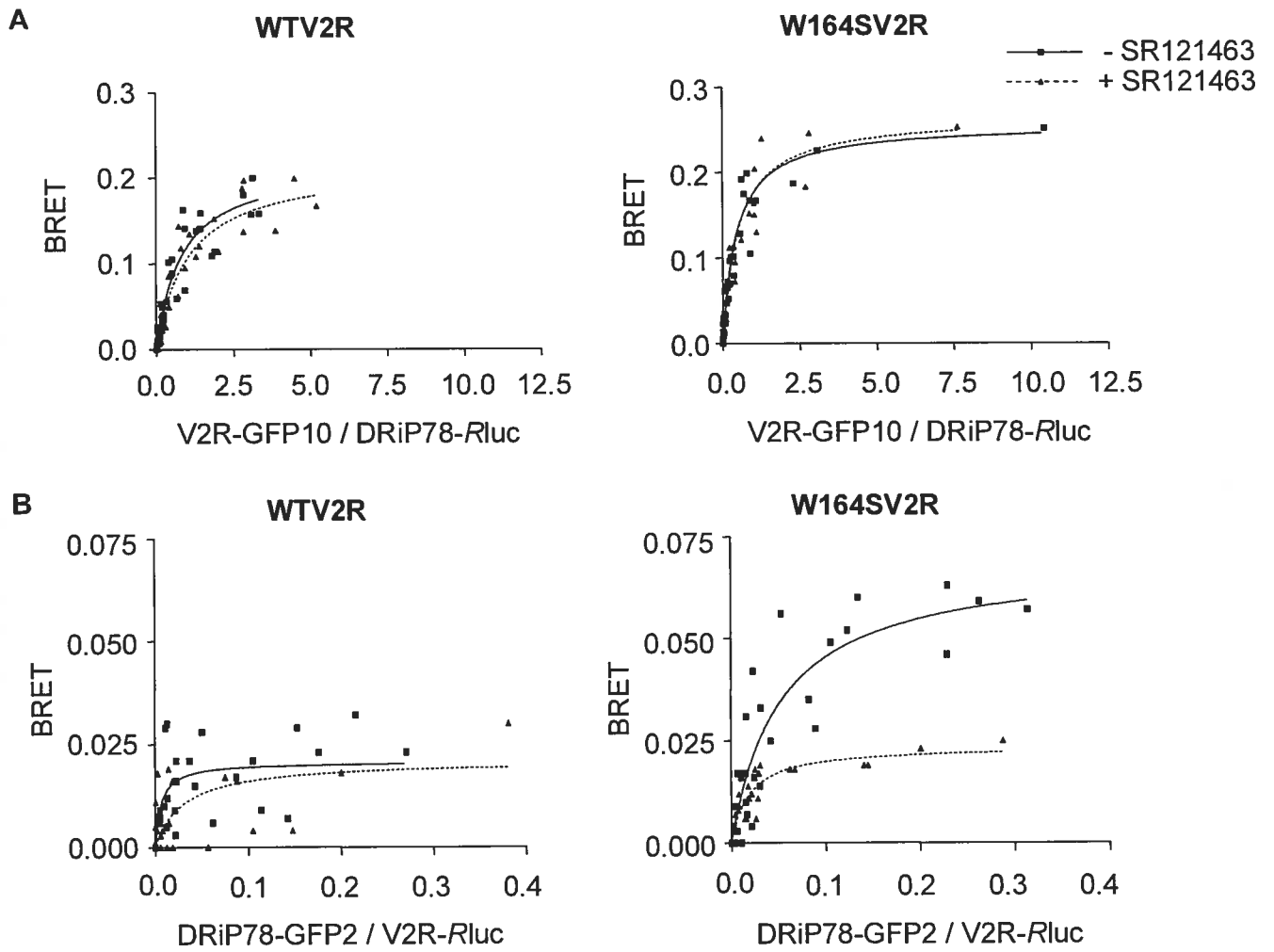


Figure 9

