

Université de Montréal

**Mécanismes de régulation du trafic et de l'activité
du récepteur GABA_B**

par
Nicolas Lahaie

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph D
en Biochimie

[Avril 2014]

© Nicolas Lahaie, 2014

Résumé

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central et est impliqué dans diverses pathologies incluant l'épilepsie, l'anxiété, la dépression et la dépendance aux drogues. Le GABA agit sur l'activité neuronale par l'activation de deux types de récepteurs; le canal chlorique pentamérique GABA_A et l'hétérodimère obligatoire de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) GABA_B. Chacun des récepteurs est responsable de phases distinctes de la réponse cellulaire au GABA. Lors d'une stimulation par le GABA, il est essentiel pour la cellule de pouvoir contrôler le niveau d'activité des récepteurs et au besoin, de limiter leur activation par des mécanismes de désensibilisation et de régulation négative. La désensibilisation nécessite le découplage du récepteur de ses effecteurs, ainsi que sa compartimentation hors de la membrane plasmique dans le but de diminuer la réponse cellulaire à l'agoniste. Les mécanismes de contrôle de l'activité de GABA_B semblent anormaux pour un RCPG et sont encore mal moléculairement caractérisés. L'objet de cette thèse est d'étudier la régulation du récepteur GABA_B et de sa signalisation par la caractérisation de nouvelles protéines d'interactions étant impliquées dans la désensibilisation, l'internalisation et la dégradation du récepteur.

Une première étude nous a permis d'identifier la protéine NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*) comme interagissant avec le récepteur hétérodimérique. Nous avons caractérisé le site d'interaction au niveau du domaine *coiled-coil* de chacune des deux sous-unités de GABA_B et constaté la dépendance de cette interaction au statut de l'activité ATPasique de NSF. Nous avons observé que cette interaction pouvait être dissociée par l'activation de GABA_B, induisant la phosphorylation du récepteur par la protéine kinase C (PKC) parallèlement à la désensibilisation du récepteur. L'activation de PKC par le récepteur est dépendante de l'interaction NSF-GABA_B, ce qui suggère une boucle de rétroaction entre NSF et PKC. Nous proposons donc un modèle où, à l'état basal, le récepteur interagit avec NSF, lui permettant d'activer PKC en réponse à la stimulation par un agoniste, et où cette activation permet à PKC de phosphoryler le récepteur, induisant sa dissociation de NSF et sa désensibilisation.

Nous avons par la suite étudié la dégradation et l'ubiquitination constitutive de GABA_B et la régulation de celles-ci par PKC et l'enzyme de déubiquitination USP14 (*ubiquitin-specific protease 14*). Au niveau basal, le récepteur est ubiquitiné, et présente une internalisation et une dégradation rapide. L'activation de PKC augmente l'ubiquitination à la surface cellulaire et l'internalisation, et accélère la dégradation du récepteur. USP14 est en mesure de déubiquitiner le récepteur suite à l'internalisation, mais accélère aussi la dégradation par un mécanisme indépendant de son activité enzymatique. Nos résultats suggèrent un mécanisme où l'ubiquitination promeut l'internalisation et où USP14 cible le récepteur ubiquitiné vers un processus de dégradation lysosomale.

La troisième étude porte sur la régulation de la densité de récepteurs à la membrane plasmique par la protéine Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*). Nous avons déterminé que Grb2 interagit avec GABA_{B1} au niveau de la séquence PEST (riche en proline, glutamate, sérine et thréonine) du domaine carboxyl-terminal, et que cette interaction module l'expression à la surface du récepteur hétérodimérique en diminuant l'internalisation constitutive par un mécanisme encore inconnu. Cette inhibition de l'internalisation pourrait provenir d'une compétition pour le site de liaison de Grb2 à GABA_{B1}, ce site étant dans une région interagissant avec plusieurs protéines impliquées dans le trafic du récepteur, tels le complexe COPI et la sous-unité γ 2S du récepteur GABA_A (1, 2).

En proposant de nouveaux mécanismes moléculaires contrôlant l'activité et l'expression à la membrane du récepteur GABA_B par les protéines NSF, PKC, USP14 et Grb2, les études présentées dans cette thèse permettent de mieux comprendre les processus d'internalisation et de dégradation, ainsi que du contrôle de l'activité de GABA_B par la désensibilisation, ouvrant la porte à une meilleure compréhension de la signalisation GABAergique.

Mots-clés : récepteur couplé à la protéine G (RCPG), acide γ -aminobutyrique (GABA), récepteur métabotropique du GABA (GABA_B), désensibilisation, ubiquitination, growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), ubiquitin-specific protease 14 (USP14), N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF), protéine kinase C (PKC)

Abstract

γ -aminobutyric acid (GABA) is the principal inhibitory neurotransmitter of the central nervous system and is involved in diverse pathologies such as epilepsy, anxiety, depression and drug addiction. GABAergic modulation of neuronal activity involves two different subsets of receptors: the GABA_A receptor chloride channel and the heterodimer of G protein coupled receptors (GPCR) GABA_B. Each of these receptors is responsible for mediating distinct parts of the GABA-induced signaling. Upon stimulation, it is vital for the cell to control the signaling input and prevent overstimulation, using mechanisms such as functional desensitization and down-regulation to achieve this. The processes controlling GABA_B receptor activity are atypical for a GPCR and have yet to be fully characterized. The aim of this thesis is to elucidate the mechanisms controlling GABA_B activity by discovering novel proteins interactions mediating receptor desensitization, internalization and ubiquitination.

In the first study, we identified the N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) as a GABA_B interacting protein and characterized its interaction site as the *coiled-coil* structure on both GABA_B sub-units. We also showed that this interaction is sensitive to the ATPase state of NSF and that agonist treatment of GABA_B led to dissociation of NSF from the receptor in a protein kinase C (PKC) dependent manner. Interestingly, GABA-induced PKC activation was dependent on the NSF-GABA_B interaction, suggesting a feedback mechanism for PKC. Both PKC and NSF were involved in mediating receptor desensitization, suggesting a novel role of NSF in receptor signaling regulation. In the proposed model, NSF interacts with GABA_B at the basal state, and upon agonist stimulation, PKC is activated and can phosphorylate the receptor, promoting NSF dissociation and GABA_B desensitization.

We then studied constitutive GABA_B ubiquitination and degradation and its regulation by PKC and the deubiquitinating enzyme USP14 (Ubiquitin-specific protease 14). GABA_B shows a high constitutive ubiquitination and internalization level. Activation of PKC promotes both phenomena and accelerates the rate of lysosomal receptor degradation. In contrast, USP14 promotes post-endocytic deubiquitination of the receptor, but also accelerates receptor degradation in a catalytically-independent manner. Our results suggest a mechanism

where PKC-induced cell surface ubiquitination promotes GABA_B endocytosis and USP14 interaction promotes endosomal sorting toward lysosomal degradation.

In the third study, we identified the growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) as a protein interacting with the PEST (proline, glutamate, serine, threonine rich) sequence of GABA_{B1} through a SH3-domain interaction and forming a ternary complex with the functional GABA_B heterodimer. We showed that Grb2 can regulate cell surface density of GABA_B by decreasing constitutive endocytosis, suggesting that this interaction can compete for binding of the PEST sequence with proteins such as the GABA_A γ 2S sub-unit or the COPI complex (1, 2), promoting higher cell surface stability.

In proposing novel molecular mechanisms controlling GABA_B signaling and cell surface expression through NSF, PKC, USP14 and Grb2, this thesis highlights the complex regulation of GABA_B activity by its functional desensitization, ubiquitination, endocytosis and degradation.

Keywords : G protein coupled receptor (GPCR), γ -aminobutyric acid (GABA), metabotropic GABA receptor (GABA_B), desensitization, ubiquitination, growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), ubiquitin-specific protease 14 (USP14), N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF), protein kinase C (PKC)

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	2
Généralités.....	2
Modèle classique de la signalisation des RCPG.....	3
Classification.....	7
Structure et mécanisme moléculaire d'activation.....	10
Classification des ligands et modèle d'activation des RCPG.....	13
Oligomérisation des RCPG.....	17
Contrôle cellulaire de la signalisation.....	23
Mécanisme classique de désensibilisation.....	27
Nouveaux paradigmes du contrôle de la signalisation.....	30
L'ubiquitination.....	33
La fusion membranaire et la protéine NSF.....	41
Modèle d'étude : le récepteur GABA _B	45
La signalisation GABAergique.....	45
Liaison du ligand et mécanisme d'activation.....	52
Modulation de la signalisation et interactome.....	59
Endocytose et triage endosomal.....	62
Autres protéines d'interaction et rôles possibles.....	63
Objectifs de la thèse.....	68
Résultats.....	70
Article 1.....	71

Article 2	133
Article 3	169
Discussion.....	201
Discussion générale	201
La désensibilisation de GABA _B : implication de NSF et PKC.....	201
USP14 comme protéine d'interaction de GABA _B : déubiquitination et dégradation.....	211
Grb2 et le trafic membranaire du récepteur GABA _B	218
Intégration.....	225
Conclusion	229
Bibliographie.....	231
Annexe 1 : Résultats supplémentaires NSF/GABA _B	i

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des différents ligands du récepteur GABA_B.....51

Tableau 2 : Protéines d'interactions des sous-unités du récepteur GABA_B.....65

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des différentes voies de signalisation modulées par les différents isoformes de la protéine $G\alpha$ ainsi que par le dimère $\beta\gamma$	5
Figure 2 : Schéma des différentes classes de RCPG dans le modèle de Pin et Bockaert.....	9
Figure 3 : Modèle ternaire modifié et modèle ternaire cubique de l'état d'activation des RCPG.....	15
Figure 4 : Illustration du modèle probabiliste de l'état d'activation des RCPG.....	16
Figure 5 : Représentation schématique des différents effets potentiels de la dimérisation sur le cycle de vie des RCPG.....	19
Figure 6 : Modèle de la glycosylation des protéines du réticulum endoplasmique et de la régulation du repliement par l'interaction de l'oligosaccharide à la calnexine.....	26
Figure 7 : Modèle classique de la désensibilisation des RCPG.....	29
Figure 8 : Voies de signalisation dépendantes de la β -arrestine.....	32
Figure 9 : Cycle de l'ubiquitination.....	35
Figure 10 : Les différentes chaînes d'ubiquitines.....	36
Figure 11 : Schéma de l'utilisation du BRET pour mesurer l'ubiquitination.....	38
Figure 12 : Rôle de NSF dans la régulation de l'expression du récepteur AMPA à la membrane synaptique.....	44
Figure 13 : Visualisation d'un potentiel d'action.....	46
Figure 14 : Mécanisme de transmission du potentiel d'action au sein de l'axone.....	47
Figure 15 : Schéma du récepteur $GABA_A$	47
Figure 16 : Liaison du GABA au domaine extracellulaire de $GABA_{B1}$	53
Figure 17: Modèle d'activation du récepteur $GABA_B$	54
Figure 18 : Signalisation présynaptique et postsynaptique du récepteur $GABA_B$	55
Figure 19 : Mécanisme de transactivation du récepteur IGF-1R par $GABA_B$	56

Figure 20 : Différents mécanismes de régulation du trafic du récepteur GABA _B	58
Figure 21 : Mécanisme d'action proposée pour le désassemblage du domaine <i>coiled-coil</i> de GABA _B par NSF et α/β -SNAP.....	202
Figure 22 : Représentation schématique du <i>coiled-coil</i> entre GABA _{B1} et GABA _{B2}	205
Figure 23 : Modèle proposé de la régulation de l'internalisation et de la dégradation du récepteur GABA _B par l'ubiquitination et la déubiquitinase USP14.....	217

Sigles et abréviations

AA	Acide aminé
A	Alanine
C	Cystéine
D	Aspartate
E	Glutamate
F	Phénylalanine
G	Glycine
H	Histidine
I	Isoleucine
K	Lysine
L	Leucine
M	Méthionine
N	Asparagine
P	Proline
Q	Glutamine
R	Arginine
S	Sérine
T	Thréonine
V	Valine
Y	Tyrosine
W	Tryptophane
AAA	ATPase associée à différentes activités cellulaires
ABP	Protéine liant l'AMPA
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIP4	Protéine d'interaction de l'atropine 4
Akt	Protéine Kinase B
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate
AMPA	Récepteur de l'AMPA
AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATF4	Facteur de transcription activateur de type 4
ATFx	Facteur de transcription activateur de type x
β2AR	Récepteur β-adrénérgique de type 2
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Enzyme hydrolysant l'ATP
ATPγS	Adénosine 5'-(γ-thio) triphosphate

BRET	Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence
Ca ²⁺	Ion calcique
CaM	Calmoduline
CaMKII	Kinase dépendante du Ca ²⁺ /Calmoduline de type II
CaSR	Récepteur sensible au calcium
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois
CHOP	Protéine homologue au facteur de transcription C/EBP
Cl ⁻	Ion chlorique
coIP	Co-Immunoprécipitation
COS-7	Cellules d'origine CV-1 portant le gène SV40 de type 7
CREB2	Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc de type II (ATF4)
CTX	Toxine du Cholera
CXCR4	Récepteur des chimiokines CXC de type 4
D1R, D2R, D3R	Récepteur de la dopamine de types 1, 2 ou 3
DAG	Diacylglycérol
DUB	Enzyme de déubiquitination
e1, e2, e3	Boucles extracellulaires d'un RCPG
EDTA	Acide tétra-acétique éthylène diamine
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme
EGFR	Récepteur de l'EGF
ERAD	Dégradation associée au RE
ERK1/2	Kinases régulées par des signaux extracellulaires 1 et 2
ESCRT	Complexe endosomal de triage requis pour le transport
FAK1	<i>Focal Adhesion Kinase 1</i>
FRET	Transfert d'énergie de fluorescence par résonance
G (protéine)	Protéine à activité GTPase
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GABA _A	Récepteur du GABA de type A (ionotropique)
GABA _B	Récepteur du GABA de type B (métabotropique)
GABA _{B1}	Sous-unité 1 de GABA _B
GABA _{B2}	Sous-unité 2 de GABA _B
GAP	Protéine activatrice de la GTPase
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange du GDP/GTP
GFP	Protéine fluorescente verte
GIRK	Canaux potassiques rectifiants entrants sensibles aux protéines G
Glu	Glutamate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
Grb2	Protéine associée au récepteur de facteur de croissance 2
GRK	Kinase des RCPG
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Enzyme hydrolysant le GTP
HEK293	Cellules embryonnaires de rein humain 293
IGF-1	Facteur de croissance semblable à l'insuline de type 1
IGF-1R	Récepteur de l'IGF-1
IP	Immunoprécipitation

IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate
K ⁺	Ion potassique
KCTD	Protéine contenant un domaine de tétramérisation similaire aux canaux potassiques
K _D	Constante de dissociation
Kir3	Canaux potassiques rectifiants entrants
Luc	Luciférase de la <i>Rénilla</i>
M2	Récepteur muscarinique de type M2
MAPKinase	Protéine kinase activée par les mitogènes
MEK-1	MAPKinase/ERK Kinase 1
Mg ²⁺	Ion magnésium
Marlin-1	Protéine contenant de multiples hélices alpha et liant l'ARN 1
mGlu	Récepteur métabotrope du glutamate
mM	Millimolaire
MPDZ	Protéine contenant de multiples domaines PDZ (Mupp-1)
MVB	Corps multivésiculaires
Na ²⁺	Ion sodique
NAM	Modulateur allostérique négatif
NHERF	Facteur de régulation de l'échange Na ⁺ -H ⁺
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMDAR	Récepteur du NMDA
NO	Oxyde d'azote
NOS	Enzyme de synthèse du NO
NSF	Facteur sensible au N-éthylmaléimide
PAM	Modulateur allostérique positif
PAR1	Récepteur activé par une protéase de type 1
PCA	Essai de complémentation protéique
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR	Récepteur du PDGF
PDZ	Domaine semblable à PSD-95/Discs-large/ZO-1
PICK1	Protéine interagissant avec la PKC 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante du DAG
PLC	Phospholipase de type C
PP2A	Phosphatase de type 2A
PSD	Protéine de densité synaptique
PTP1B	Protéine Tyrosine Phosphatase 1B
PTX	Toxine Pertussique
RAMP	Protéine modifiant l'activité du récepteur
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G hétérotrimériques
RE	Réticulum endoplasmique

RET	Transfert d'énergie de résonance
RGS	Régulateur de la signalisation des protéines G
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SH2	Domaine d'homologie à Src de type 2
SH3	Domaine d'homologie à Src de type 3
SNAP	Protéine soluble de liaison à NSF
SNAP-25	Protéine soluble de liaison à NSF de 25 kDa
SNARE	Récepteur à SNAP
Sos	<i>Son of Sevenless</i>
TM	Domaine transmembranaire
μM	Micromolaire
USP	Protéase spécifique à l'ubiquitine
V1a	Récepteur de la vasopressine de type 1a
V2R	Récepteur de la vasopressine de type 2
VAMP	Protéine membranaire d'attachement des vésicules
VFT	Domaine de type «Venus Flytrap»
WT	Type sauvage
YFP	Protéine fluorescente jaune

Remerciements

J'aimerais prendre l'occasion de brièvement remercier les personnes qui m'ont aidé durant mon parcours.

En premier lieu, je dois évidemment remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel Bouvier. Michel a une passion pour la science qui est sans fin, et il sait bien transmettre cette passion aux autres. J'ai beaucoup appris à ses côtés, non seulement d'un point de vue scientifique, mais aussi d'un point de vue humain. Michel nous laisse une grande liberté académique, ce qui nous permet de tester des hypothèses un peu «*out there*», d'ajuster notre parcours comme on le veut et de profiter au maximum de notre passage à l'université. Cela dit, il est toujours là pour nous remettre sur le droit chemin quand on en a besoin, ou quand nos hypothèses un peu plus farfelues n'ont pas abouti. On aimerait te voir plus souvent, et ça en dit long sur tes qualités scientifiques et humaines, car les moments à interagir avec toi sont les plus formateurs de notre passage dans ton labo.

Deuxièmement, je voudrais remercier la Dre Stéphanie Pontier. Stéphanie était ma superviseuse de stage lors de mon entrée au laboratoire, et j'ai rarement rencontré une personne aussi ouverte d'esprit d'un point de vue scientifique, qui recherche autant d'information, même dans des domaines éloignés du sien, dans le but de relier des concepts pas nécessairement rapprochés. J'ai énormément appris à travailler avec elle, et j'espère qu'elle aura la chance un jour d'avoir sa propre équipe, car je suis convaincue qu'elle sait ce qu'elle fait et qu'elle tente de répondre à de grandes questions.

J'aimerais remercier la Dre Monique Lagacé, qui est toujours présente quand on a besoin d'elle, et qui finit toujours par nous convaincre que les choses ne sont pas si mal. Sans elle, c'est difficile de concevoir comment le laboratoire pourrait fonctionner. Et sans elle, le BRET serait un concept théorique, parce qu'il n'y aurait jamais une machine qui marcherait.

J'aimerais remercier Stéphanie Bilodeau, qui a eu la malchance d'être ma stagiaire pendant un été. Je n'ai certainement pas été un modèle parfait, mais j'espère que tu as eu la chance d'apprendre en travaillant avec moi (et comme tu fais ton doc, j'imagine que je ne t'ai pas découragé, ce qui est déjà ça).

J'aimerais aussi remercier la Dre Joëlle Pelletier et les gars du labo à l'époque où j'y ai effectué un stage. Ce fut ma première expérience en recherche, et ça m'a donné le goût de continuer par la suite (peut-être qu'ils ne méritent pas des remerciements, mais on gardera ça pour une autre fois). J'ai eu la chance de rester ami avec eux même à ce jour, et je les estime énormément.

J'aimerais remercier l'ensemble des gens que j'ai côtoyés au sein du laboratoire de Michel : (il n'y a pas d'ordre, ça serait beaucoup trop difficile à établir) Douce, Elaheh, Étienne, Martin, Wayne, Justine, Alex, Sylvain, Éric, Emma, Julie Q., Brigitte, Elena, Arhama, Bianca, Anne-Marie, Billy, Jean-Philippe, Madeleine, Ségolène, Geneviève, Virginie, Sonia, Pascale, Driss, Morad, Hiroyuki, Christian, Fadi, Yann, Céline, Riad, Julie P., Andreas, Josée-France, Koji, Sandra, Patricia, Joris, Luis, Thomas, Julie D., Damien, Julie A., Alexandre M., Hélène, Mireille, André, Nicole, Marc, Sara. (J'espère ne pas avoir oublié de monde.) Ce fut un plaisir immense de travailler avec vous pendant toutes ces années. On a été une bonne gang pendant un bon bout de temps, et il y a des jours où c'était plus ça que la science qui me donnait le goût de rentrer. Je suis content de compter plusieurs d'entre vous comme amis, même si l'on est un peu éparpillé dans le monde. Je sais très bien que plusieurs d'entre vous ont un avenir très prometteur.

J'aimerais remercier l'ensemble des gens que j'ai pu côtoyer au niveau universitaire pendant mes études, que ça soit des gens du département, du labo d'enseignement, de l'IRIC, des gens dans les associations étudiantes, des membres de comités/assemblées et même les étudiants à qui j'ai enseigné. J'ai toujours cru que l'université n'était pas seulement une expérience académique, mais un endroit où l'on se développe en tant que personne. Je pense pouvoir dire que j'ai appris plus à l'extérieur du laboratoire qu'à l'intérieur, et c'est grâce aux centaines de personnes que j'ai pu rencontrer. Mon intérêt para-académique m'a certainement ralenti dans mon parcours, mais je suis convaincu que ça en valait franchement la peine.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents d'avoir été toujours là pour me soutenir, même si j'ai toujours refusé de m'appuyer. Parfois, le simple fait de savoir que vous êtes là, c'est tout ce qui compte.

Introduction

Le corps humain est composé de milliards de cellules, possédant des fonctions variées, qui, regroupées en organes, doivent agir de concert pour assurer l'homéostasie et ajuster le corps à son environnement. Le processus qui permet aux cellules de communiquer les unes avec les autres est nommé signalisation cellulaire. Ce terme global peut représenter une panoplie de mécanismes moléculaires et cellulaires, car plusieurs cellules de natures différentes doivent communiquer entre elles, parfois sur de courtes distances, parfois sur l'entièreté ou presque du corps. À cette fin, les cellules émettent une multitude de molécules de signalisation, tels des hormones, neurotransmetteurs, etc. Ces molécules de signalisation sont de tailles variables, pouvant être aussi petites que des ions et aussi larges que des protéines. Ces molécules peuvent avoir une action autocrine, donc sur le tissu émetteur, ou paracrine, sur un tissu distinct, mais rapproché. Lorsque l'action de la molécule se fait à distance, par exemple via la circulation sanguine, on parle plutôt d'un effet endocrine. Les molécules de signalisation peuvent être divisées en deux grandes classes, soit les molécules qui pénètrent les membranes cellulaires et celles qui ne les pénètrent pas. Les molécules pouvant traverser la membrane ont généralement des cibles à l'intérieur de la cellule visée, souvent des récepteurs nucléaires, tandis que les molécules ne pouvant pas traverser la membrane doivent agir directement à la surface de la cellule cible. Les cellules possèdent donc des récepteurs, qui sont des protéines permettant la liaison de la molécule de signalisation et qui sont ensuite en mesure de traduire le signal en réponse cellulaire. On peut retrouver des récepteurs dans la très grande majorité des organelles d'une cellule. Les récepteurs membranaires sont responsables de la réception d'un signal de l'extérieur de la cellule pour ensuite le transmettre vers l'intérieur.

La signalisation intracellulaire est un processus complexe qui implique une panoplie de protéines et enzymes variées. Juste au niveau des récepteurs membranaires, il existe plusieurs grandes familles qui ont des activités spécifiques différentes. Une première famille, les récepteurs-canaux ioniques, ont comme action, lors de la liaison de leur ligand, l'ouverture d'un pore dans la membrane permettant l'entrée ou la sortie d'ions, tels le Ca^{2+} , le K^+ , le Na^+ ou le Cl^- . Le flux ionique de part et d'autre de la membrane produit une différence de

potentiel qui peut se propager au sein de la cellule, devenant elle-même un signal. De plus, certains ions, tel le Ca^{2+} , peuvent aussi agir comme seconds messagers, induisant une réponse indépendante de leur effet sur le potentiel membranaire. Une deuxième famille de récepteurs transmembranaires est couplée à une activité kinase qui peut provenir directement du récepteur (par exemple l'EGFR, IGF-1R, etc.) ou par recrutement de protéines kinases associées (JAK, TNFR, ...). Ces récepteurs, parfois associés à la prolifération cellulaire, constituent le point de départ de voies de signalisation par des cycles de phosphorylation/déphosphorylation. Finalement, une des plus grandes familles de récepteurs membranaires est celle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs, composés de sept domaines transmembranaires, sont ainsi nommés par leur capacité à activer une protéine associée, la protéine G hétérotrimérique, surnommée ainsi par sa capacité à lier et hydrolyser le GTP. Ces récepteurs ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque, et leur action passe plutôt par la modulation de leurs partenaires d'interactions. Cette thèse portera majoritairement sur les RCPG et la régulation de leur signalisation, et plus particulièrement sur la régulation moléculaire du récepteur GABA_B , mon modèle d'étude. Je vais premièrement introduire les RCPG, leur signalisation et leur régulation, pour ensuite m'attarder sur le récepteur GABA_B et ses particularités.

Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Généralités

Dans le but de bien mettre en situation le récepteur GABA_B et ses mécanismes de régulation, il est important d'introduire les principales caractéristiques des RCPG et les mécanismes classiques les régulant, ainsi que les nouveaux paradigmes de leur signalisation et régulation.

Composée de plus de 800 gènes (3), la famille des RCPG représente non seulement la plus grande famille de récepteurs membranaires, mais également une des plus grandes familles du génome humain. La principale caractéristique commune des RCPG est leur topologie membranaire, possédant tous 7 hélices α transmembranaires; leur extrémité amino-terminale étant extracellulaire et leur extrémité carboxyl-terminale étant intracellulaire. Ils possèdent

donc 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires. Ils ont généralement tous la capacité d'activer une protéine G hétérotrimérique, induisant ainsi leur voie de signalisation dite classique. La diversité des ligands des RCPG est surprenante, allant des photons et d'ions jusqu'à de grands polypeptides en passant par des acides aminés, des peptides, des nucléotides et des lipides (4). L'intérêt clinique pour cette famille est important, car on retrouve environ 30% des médicaments sur le marché qui sont dirigés vers des RCPG (5), et ce malgré que seulement 4% des RCPG soient ciblés à ce jour (6). Il est donc primordial d'étudier les mécanismes de régulation de la signalisation liée aux RCPG et de mieux élucider le fonctionnement des drogues les visant dans le but de cibler de façon plus spécifique certains de ces mécanismes, permettant de gagner en sélectivité.

D'un point de vue phylogénétique, les RCPG semblent avoir une origine lointaine, pouvant dater d'aussi loin que 1,2 milliard d'années, car on en retrouve un petit nombre chez certains eucaryotes unicellulaires (7), ainsi que chez des plantes (8). On en retrouve aussi un nombre plus large chez les insectes (9). L'étude des génomes complets séquencés montre une duplication majeure du nombre de gènes de RCPG avant la scission entre les nématodes et les chordés, datant d'environ 350 à 650 millions d'années (10). Ils semblent que les différentes sous-familles de RCPG précèdent elles aussi cette scission, les 5 familles phylogénétiques établies dans le modèle GRAFS (glutamate, rhodopsine, adhésion, frizzled et sécrétine) étant présentes chez les insectes (3). Il faut toutefois noter que malgré l'origine commune des récepteurs et des ligands similaires, l'identité de séquence entre les récepteurs d'espèces aussi distantes que les mammifères et les insectes est faible (11).

Modèle classique de la signalisation des RCPG

Historiquement, les RCPG ont été reliés à la découverte de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) comme messenger cellulaire (12). Ce fut en 1980 que la première protéine G fut purifiée (13). La purification démontra que les protéines G sont composées de trois sous-unités : α , β et γ . Il fut rapidement démontré que la sous-unité α est responsable de la liaison des nucléotides guanyliques et que les sous-unités β et γ sont retrouvées sous la forme d'un dimère constitutif. Sous la forme inactive, la sous-unité α lie un GDP, et celui-ci est déplacé et remplacé par un GTP par l'activité de transfert GDP-GTP

(GEF) du récepteur activé. Dans le modèle classique, la liaison du GTP induit la dissociation de la sous-unité α du dimère $\beta\gamma$, permettant à chacun d'interagir et d'activer leurs effecteurs associés. La sous-unité α possède une faible activité GTPasique, ce qui lui permet d'hydrolyser le GTP et le convertir en GDP, ce qui permet sa réassociation avec le dimère $\beta\gamma$ et un retour à la forme inactive.

La famille des protéines G hétérotrimériques est composée d'un grand nombre de sous-unités. On retrouve 16 différentes sous-unités α , 5 sous-unités β et 14 sous-unités γ (14). On classe généralement les protéines G par leurs sous-unités α , celles-ci étant divisées en 4 familles selon leurs effecteurs : $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$.

Chacune des composantes (α et le dimère $\beta\gamma$) est en mesure d'agir comme transmetteur du signal, les deux possédant des effecteurs différents. Je vais m'attarder aux principales voies de signalisation en détaillant les cascades signalétiques découlant de l'activation des protéines $G\alpha$ et du dimère $\beta\gamma$.

Voies de signalisation des sous-unités α

Première famille de protéines G décrite, la famille des $G\alpha_s$ fut identifiée par sa capacité à promouvoir la production d'AMPc, d'où son nom de stimulatrice (13). Composée de quatre membres, incluant la protéine $G\alpha$ olfactive ($G\alpha_{olf}$) fortement exprimée dans les neurones olfactifs et le cerveau en général, la principale caractéristique de cette famille est sa capacité à interagir avec l'adénylate cyclase (AC) et de promouvoir la conversion de l'ATP en AMPc. L'augmentation d'AMPc permettra l'activation de différentes cibles cellulaires, la plus importante étant la PKA, qui est une des kinases cellulaires les plus importantes, ayant plusieurs cibles touchant au métabolisme cellulaire (15). Les protéines $G\alpha_s$ sont aussi la cible de la toxine du Cholera (CTX). La CTX ADP-ribosyle la sous-unité α_s sur un résidu important pour l'activité catalytique, inhibant ainsi l'activité GTPasique, ce qui mène à une protéine G constitutivement active et une très forte augmentation du niveau d'AMPc à court terme, entraînant une surstimulation de la cellule. À long terme, le traitement avec la CTX mène plutôt à une régulation négative de l'expression de $G\alpha_s$, ce qui inhibe l'activité rattachée. La CTX provient de la bactérie *Vibrio Cholerae* et induit des vomissements et de fortes diarrhées chez un individu affecté.

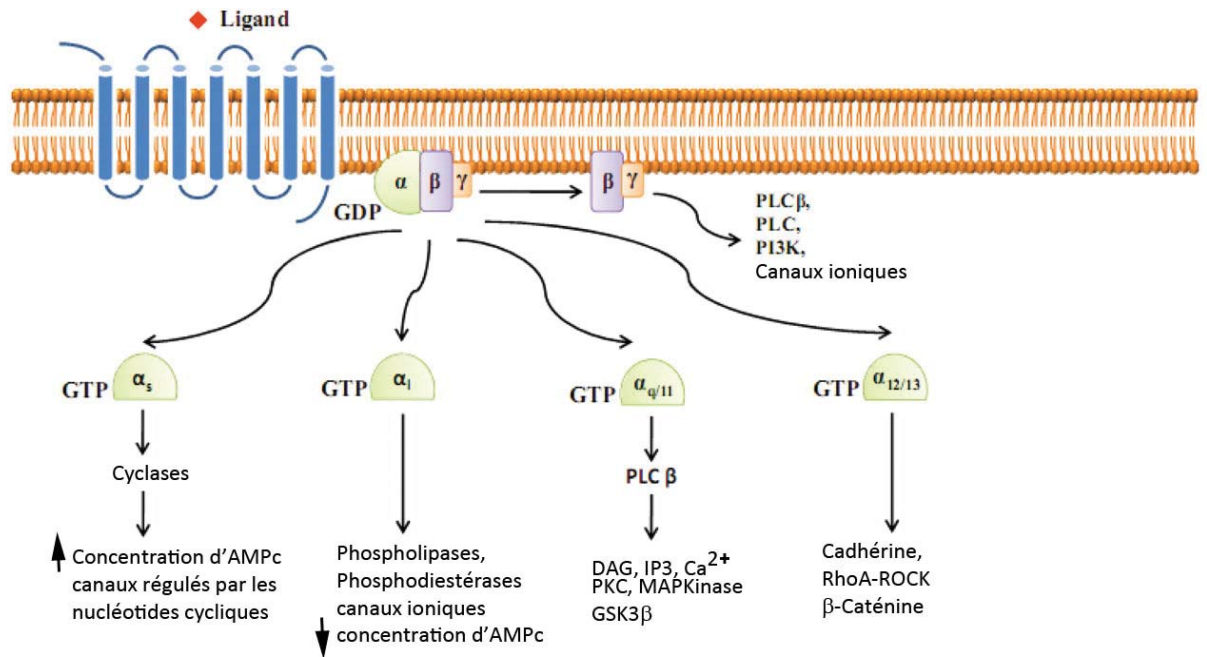


Figure 1 : Schéma des différentes voies de signalisation modulées par les différents isoformes de la protéine Gα ainsi que par le dimère βγ. Adaptée de (16)

Les protéines Gα_i forment la deuxième famille découverte, car sa première activité décrite fut d'inhiber la production d'AMPc, ce qui lui donna le nom d'inhibitrice (17, 18). La famille Gα_i contient 8 membres, incluant les deux protéines Gα_{o1/2} généralement associées à une expression neuronale, les trois Gα_{i1/2/3}, la protéine Gα_z, ainsi que les Gα_{t1/2} associées au système visuel et finalement la protéine Gα_{gust} impliquée dans la transmission du goût (14). La sous-unité Gα_i est en mesure d'inhiber l'AC en s'y liant directement (19). Une bonne partie de la signalisation provenant de la protéine Gα_i provient aussi du dimère βγ associé, et cette signalisation sera traitée ultérieurement. Dans le cas de Gα_{gust}, elle possède un mode de signalisation distinct. Son activité passe plutôt l'activation d'une phosphodiesterase (PDE) de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), diminuant ainsi la concentration de ce dernier (20). Les protéines Gα_i sont sensibles à la toxine Pertussique (PTX), mais inversement à l'activité de la CTX sur Gα_s, la PTX mène à une inhibition de l'échange GDP-GTP, gardant la protéine G_i sous une forme inactive (21). La PTX provient de la bactérie *Bordetella Pertussis*, et provoque la coqueluche.

L'activité de la famille $G\alpha_q$ est distincte des deux premières familles décrites, et n'influence pas le niveau d'AMPc. Composée de 5 membres ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ et $G\alpha_{16}$), cette famille est impliquée dans l'augmentation du niveau de calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (14). Leur activité provient de l'activation par liaison directe de la sous-unité α_q sur la phospholipase $C\beta$ (PLC β), ce qui provoque le clivage des phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG) (22). Ces deux molécules agissent comme seconds messagers, le premier liant son récepteur (IP3R) sur la membrane du réticulum endoplasmique et induisant la relâche de calcium des réservoirs intracellulaires (23), tandis que le DAG se lie à la protéine kinase C (PKC). La liaison du DAG, souvent amplifié par la liaison de Ca^{2+} sur la PKC, active la kinase, qui phosphoryle ensuite une panoplie de cibles cellulaires (24). Il faut noter qu'il existe plusieurs isoformes de la PKC, certaines n'étant pas sensibles au Ca^{2+} , entraînant une variabilité dans la signalisation dépendante de PKC.

La dernière famille de sous-unité α est la famille $G\alpha_{12}$, composé de deux membres ($G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$). Leurs principales activités cellulaires est de moduler le cytosquelette d'actine, entre autres par la formation de fibres de stress (25). Elles sont en mesure d'activer les petites GTPases de la famille Rho par l'activation de Rho-GEF, facteur d'échange GDP-GTP de Rho (26). Elles ont récemment été impliquées dans plusieurs pathologies liées au cancer, telles les métastases cancéreuses et la leucémie (27).

Voies de signalisation du dimère $\beta\gamma$

Lors de l'activation de la protéine G par le récepteur, l'échange du GDP pour un GTP au sein de la sous-unité α induit un changement conformationnel important au sein du trimère. Le modèle classique d'activation proposait même une dissociation complète de la sous-unité α du dimère $\beta\gamma$. Dans ce modèle, les deux sous-unités libérées pouvaient donc interagir avec leurs effecteurs de façons indépendantes (28). Les évidences plus récentes suggèrent plutôt un réarrangement conformationnel de la protéine G hétérotrimérique, permettant de libérer les sites d'interactions aux effecteurs sans dissociation physique (29). Cependant, il y a encore certaines études qui laissent planer un doute sur une potentielle dissociation, ce qui pourrait suggérer des mécanismes distincts selon les sous-unités de la protéine G ou le récepteur les activant (30).

La signalisation du dimère $\beta\gamma$ provient des 7 domaines WD40 de la sous-unité β (14). Ces domaines d'interactions protéines-protéines permettent d'interagir avec une multitude d'effecteurs. Les principales voies de signalisation dépendantes du dimère $\beta\gamma$ sont l'activation de la PLC β , l'activation des canaux potassiques GIRK, l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendant de type N, P/Q et R et l'activation des voies PI3-Kinase (31). De plus, le dimère $\beta\gamma$ est en mesure de moduler positivement ou négativement l'activité de l'AC selon le type d'AC et selon le co-stimulus qui est présent.

Classification

Composée de plus de 800 membres, la famille des RCPG peut être divisée en plusieurs classes. Deux modèles de classifications différents sont utilisés pour classer les RCPG en sous-familles. Un premier modèle, proposé par Bockaert et Pin (32) repose sur l'analyse des acides aminés et le mode de liaison du ligand au récepteur, et comporte 3 grandes classes. Le deuxième modèle, surnommé GRAFS pour l'acronyme des 5 familles proposées, repose quant à lui sur une analyse phylogénétique des récepteurs chez l'humain (33). La classification permet de faciliter l'étude des mécanismes de signalisation des récepteurs, car on remarque généralement un grand nombre de similarités dans les récepteurs d'une même classe.

Modèle de Bockaert et Pin

Classe 1

Les récepteurs de la classe 1 possèdent deux séquences d'acides aminés conservées qui aident à les identifier, soient premièrement un motif NSxxNPxxY dans le TMVII et ensuite une séquence D(E)-R-Y(F) (dite DRY) à la limite du TMIII et de la deuxième boucle intracellulaire. Le motif DRY est impliqué dans la stabilisation du récepteur, l'interaction à la protéine G et l'activation de cette dernière (34). De plus, les récepteurs de la classe 1 possèdent généralement une huitième hélice alpha, qui est située dans la queue carboxyl-terminale, souvent flanquée d'une cystéine qui a le potentiel d'être palmytoylée (35). La classe 1 est elle-même divisée en 3 sous-groupes, selon le mode de liaison du ligand. La sous-classe 1(a) est la plus vaste, représentant généralement tous les récepteurs ayant des petits ligands, incluant les RCPG les plus étudiés, tels la rhodopsine et le β 2AR. Les récepteurs de cette sous-classe ont comme similarité d'avoir une petite région amino-terminale

extracellulaire et de lier leurs ligands par l'entremise d'une cavité située entre les 7 domaines transmembranaires. La sous-classe 1(b) est composée de RCPG dont les ligands sont généralement des peptides, par exemple les récepteurs de chimiokines. Dans ce cas, le récepteur utilise non seulement les domaines transmembranaires, mais aussi les boucles extracellulaires ainsi qu'une partie de son domaine amino-terminal comme points d'interaction avec le ligand (36). La sous-classe 1(c) est quant à elle composée des récepteurs aux hormones glycoprotéiques de relâche, telles la TSH et la LH. La liaison au ligand s'effectue par un large domaine amino-terminal ainsi que par les boucles extracellulaires, mais n'implique pas de cavité intra-TM (37).

Classe 2

La classe 2 possède une morphologie similaire à la classe 1(c) caractérisée par un large domaine amino-terminal, mais ne possède pas d'homologie de séquence avec les récepteurs d'hormones glycoprotéiques. Dans ce cas, les ligands sont généralement des polypeptides de faible à moyen poids moléculaire, par exemple la calcitonine et la sécrétine. Encore une fois, la liaison du ligand implique surtout le large domaine amino-terminal du récepteur avec une contribution des boucles extracellulaires. Ils se différencient de la classe 1(c) par l'absence de la huitième hélice alpha ainsi que des motifs DRY et NSxxNPxxY.

Classe 3

Les récepteurs composant la classe 3 possèdent de très larges domaines extracellulaires formant un domaine de type *Venus flytrap* (VFT) où se situe la liaison de leurs ligands (38). Ces domaines sont nommés VFT dû à leur ressemblance à la dionée attrape-mouche (*Venus Flytrap* en anglais). Dans cette analogie, le ligand du récepteur se lie au récepteur dans un mécanisme ressemblant à la capture d'une mouche par la dionée. Les ligands physiologiques des RCPG de classe 3 sont de petites molécules, tels le glutamate et le GABA. Il est aussi à noter que l'entièreté des membres de cette famille fonctionne sous forme dimérique (39). Notre récepteur d'intérêt, GABA_B, se situe dans cette classe.

Classes supplémentaires

Deux classes supplémentaires de récepteurs sont décrites dans la classification de Pin et Bockaert, représentant une faible minorité des RCPG. La classe 4 est composée des récepteurs de phéromones associées à la protéine G_i tandis que la classe 5 est composée des récepteurs Frizzled et Smoothened, généralement associés au développement embryonnaire. Dans les deux cas, leur faible homologie de séquence avec les trois classes majeures explique leur classification distincte.

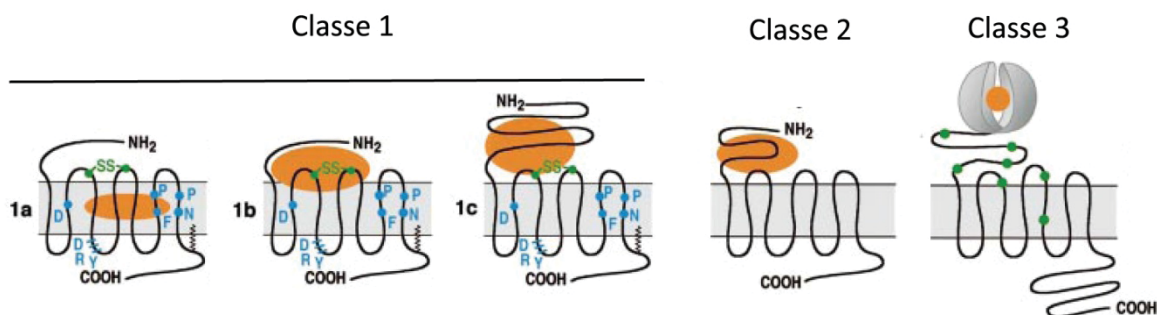


Figure 2 : Schéma des différentes classes de RCPG selon le modèle de Pin et Bockaert. On peut voir en orange le site de liaison des agonistes des récepteurs. Ajusté de (32)

Modèle GRAFS

Dans le modèle de classification GRAFS, les RCPG sont classés dans 5 familles distinctes (3) : Glutamate (G), Rhodopsine (R), Adhésion (A), Frizzled (F) et Sécétine (S). La classification des récepteurs est effectuée par analyse phylogénétique, les récepteurs étant classés par leur niveau de relation. La famille la plus nombreuse est celle des récepteurs similaires à la rhodopsine (souvent appelée *rhodopsin-like*). De façon générale, on peut associer les mêmes caractéristiques à cette classe que celles retrouvées pour la famille 1(a) du modèle précédent. On retrouve plus de divergence dans le modèle en ce qui a trait aux autres classes. Les membres de ces quatre autres classes possèdent tous des queues amino-terminales plutôt longues comparées à la famille de la rhodopsine. La classe glutamate est composée essentiellement des mêmes RCPG que la classe 3 du modèle de Pin et Bockaert. Je vais surtout m'intéresser à cette classe, dont fait partie le récepteur GABA_B, et à la famille rhodopsine, car elle est la plus étudiée en matière de mécanismes moléculaires sous-tendant la signalisation.

Structure et mécanisme moléculaire d'activation

L'étude de la fonctionnalité des RCPG a pris un tournant majeur dans la dernière décennie avec la rapide avancée des méthodes permettant d'obtenir des structures tridimensionnelles. Dans cette section, je vais brièvement traiter des découvertes faites à ce niveau et leur impact au niveau de notre compréhension du mécanisme d'activation des récepteurs.

Il fallut attendre de nombreuses années et de multiples vaines tentatives avant d'obtenir la structure tridimensionnelle d'un RCPG. Il n'est jamais aisé de cristalliser des protéines membranaires, et la présence de 7 TM dans le cas des RCPG a considérablement ralenti les efforts en ce sens. Cependant, au début des années 2000, la structure cristallographique de la rhodopsine bovine fut obtenue (40). Ce récepteur est facilement isolé en grande quantité directement des cellules de la rétine de bœuf, permettant de facilement travailler avec un récepteur purifié. L'obtention de cette structure ouvrit la porte, et 7 ans plus tard, la structure du β 2AR fut obtenue par le groupe de Kobilka (41). Depuis 2007, plus de 60 nouvelles structures représentant 17 nouveaux récepteurs ont été caractérisées. Certaines des structures plus récentes incluent la co-cristallisation du β 2AR et de la protéine $G\alpha_s$ associée, permettant d'approfondir les connaissances sur le mécanisme moléculaire d'activation. Il est intéressant de constater que certains mécanismes identifiés au niveau de la rhodopsine dans la structure originale de celui-ci, par exemple le lien ionique entre le motif DRY et le TMVI, semblent fortement conservés dans la majorité des structures répertoriées, suggérant un mécanisme d'activation fortement conservé.

Certains artifices techniques furent nécessaires à l'obtention de toutes ces nouvelles structures. Bien souvent, il fallut introduire des mutations dans certaines régions 'instables' du récepteur, incluant même dans plusieurs cas l'insertion d'une protéine complète (lysozyme T4) dans la 3^e boucle intracellulaire (42). Certains autres laboratoires ont utilisé des petits anticorps (*nanobodies*) pour cibler certaines régions du récepteur, permettant là encore une stabilisation du complexe (43). Finalement, l'utilisation de ligands (antagonistes ou agonistes inverses) a elle aussi permis d'augmenter la stabilité du récepteur, et ainsi, favoriser la création de cristaux créant un patron de diffraction propre (44). Ces manipulations des récepteurs induisent un certain biais dans la structure obtenue, et il sera important d'en tenir compte lors

de l'analyse, tout en comparant les différentes structures obtenues par différentes méthodes, permettant possiblement de détecter les artefacts induits par cette stabilisation artificielle.

L'ensemble de ces nouvelles structures permet une avancée rapide dans la compréhension des mécanismes moléculaires des évènements précoces de la signalisation des RCPG, particulièrement la reconnaissance du ligand, les changements induits par la liaison de celui-ci, la transmission du changement conformationnel au sein du récepteur et l'activation de la protéine G associée.

Une première constatation commune à l'ensemble des structures obtenues est que le repliement des TM est fortement conservé (45). On peut remarquer certaines différences au sein du repliement des boucles extracellulaires, pouvant exercer une différence quant à l'accès du site de liaison selon le récepteur. Par exemple, pour le β 2AR, la boucle e2 forme une hélice compacte, qui, couplée aux très petites boucles e1 et e3, dirige les ligands solubles du milieu extracellulaire vers la cavité de liaison (41). En comparaison, la boucle e2 du récepteur S1P₁ agit de concert avec la boucle e1 et la queue amino-terminale pour bloquer l'accès à la poche de liaison. Le S1P étant un lipide, il est suggéré qu'il accède à son site de liaison par diffusion à travers la membrane (46). Ce contrôle à l'accès du site de liaison explique l'importance des boucles extracellulaires dans la sélectivité et la cinétique de liaison (47). Selon les récepteurs observés, on peut noter des différences marquantes dans la façon dont les ligands interagissent ainsi que dans les régions impliquées dans la liaison. On peut remarquer, entre autres des récepteurs dont les ligands vont se lier dans un plan parallèle à la membrane, tels le β 2AR (34), et d'autres récepteurs dont les ligands vont plutôt avoir un plan perpendiculaire à la membrane, tel le récepteur à adénosine A_{2A} (48). Finalement, on constate des différences importantes dans la grosseur des cavités de liaison, allant de petites cavités comme celle du récepteur à la dopamine D₃ (49) à de larges cavités pouvant accueillir un peptide, dans le cas de CXCR4 (50). Considérant le niveau d'homologie de séquence retrouvé dans la région des TM, région importante pour la liaison du ligand, il semblerait donc que les propriétés spécifiques de liaison ne dépendent pas seulement de la séquence des acides aminés présents dans les cavités de liaison, mais aussi de la structure tridimensionnelle adoptée par le récepteur dans son ensemble.

La majorité des récepteurs cristallisés avec un ligand l'ont été avec un antagoniste ou un agoniste inverse, bien qu'une dizaine de structures avec des agonistes aient aussi été

publiées à ce jour (45). L'agoniste inverse étant un ligand permettant de favoriser la conformation inactive du récepteur, il lui confère une stabilité plus grande. Peu de différences majeures ont cependant été observées entre les couples récepteur-antagoniste en comparaison avec les couples récepteur-agoniste. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces observations qui peuvent paraître inattendues, considérant l'effet important des agonistes sur l'activation des récepteurs. On peut premièrement penser que le processus de cristallisation en lui-même peut favoriser l'obtention d'une structure inactive qui serait potentiellement plus stable. Un récepteur actif serait plus instable, et pourrait présenter plusieurs structures différentes représentant ses différents états d'activation, ce qui créerait des cristaux hétérogènes peu propices à la diffraction (51), et pourrait même inhiber la formation de cristaux. Une deuxième raison pouvant expliquer l'absence de différences majeures est de nature plus biologique; la majorité des récepteurs ont été cristallisés en absence de leur protéine G associée. Il est connu depuis environ 30 ans que la présence de la protéine G module les propriétés de liaison d'un agoniste à son récepteur (52), et il est donc possible que l'état activé du récepteur nécessite aussi la présence de la protéine G associée pour pouvoir être détectée. Récemment, le groupe de Kobilka a publié une structure du β 2AR co-cristallisé avec un agoniste et la protéine *Gas* (53). On remarque d'importants réarrangements entre cette structure et une structure d'un récepteur lié à un antagoniste ou à un agoniste en absence de protéine G, particulièrement un mouvement du TMVI vers l'extérieur ainsi que le mouvement d'une sérine dans le TMV qui se rapproche de l'agoniste, qui peuvent expliquer l'état de haute affinité pour l'agoniste conférée par la protéine G.

Pour ce qui est de l'activation de la protéine G en réponse au ligand, la liaison de l'agoniste au β 2AR provoque des changements au sein des TMV, TMVI et TMVII, et peut dans certains cas permettre la reconfiguration de la séquence NPxxY du TMVII (54, 55). Le mouvement de la tyrosine serait particulièrement important, car elle permettrait de barrer le TMVI dans une conformation ouverte. L'ouverture du TMVI permet à l'hélice aminoterminal de la protéine $G\alpha$ de s'insérer dans cette poche nouvellement créée, ce qui induit un mouvement du domaine α -hélicale de la sous-unité α de la protéine G, ouvrant l'accès à la pochette de liaison du nucléotide. Cette ouverture permet la sortie du GDP et l'entrée d'un GTP induit par le ratio cellulaire GTP : GDP favorisant le premier (56).

Il n'existe toujours pas de structure complète d'un récepteur de la famille 3, dont fait partie le récepteur GABA_B. La structure du domaine extracellulaire du récepteur métabotrope au glutamate de type 1 (mGluR1) a cependant été obtenue par cristallisation (38), et d'autres domaines extracellulaires des récepteurs de la famille 3 ont été modélisés à partir de cette structure, incluant ceux des deux sous-unités du récepteur GABA_B (57). Dans le cas du mGluR1 la liaison de l'agoniste au VFT permet un réarrangement des lobes du domaine, qui se rapproche des motifs riches en cystéine, proximaux à la membrane, permettant la création d'un nouveau pont disulfure entre les deux domaines (58, 59). Cette nouvelle proximité ferait en sorte que le VFT «s'assoit» sur les TM, induisant ainsi un changement conformationnel de ces derniers (60). Les changements induits au sein des TM sont encore peu étudiés dans un contexte de récepteur complet et fonctionnel, ce qui complique l'analyse.

Classification des ligands et modèle d'activation des RCPG

Pour bien comprendre les mécanismes de régulation des RCPG, il est important de définir quelles sont les différentes classes de ligands ayant une activité. Les ligands des RCPG sont généralement divisés en 3 grandes classes, selon leur action sur la signalisation. Afin de mieux comprendre cette classification, il faut toutefois brièvement expliquer l'évolution du modèle d'activation des RCPG en lien avec le ligand et la protéine G.

Historiquement, il était considéré que le récepteur oscille entre un état relaxé (R) inactif et un état excité (R*) actif. Dans un tel modèle, la liaison du ligand favorise la conformation R*, formant donc un complexe L-R*. La découverte des protéines G et leurs effets sur l'affinité des ligands amènera à la formulation du modèle ternaire présenté par De Léan en 1980 (61).

Utilisant le modèle ternaire comme base théorique, il est observé que le récepteur semble être divisé en deux populations distinctes, une possédant une haute affinité pour son agoniste et une ayant une faible affinité. La présence de GTP ou d'analogues non hydrolysables de celui-ci semble favoriser la population de basse affinité. Ces observations indiquent que le ligand est en mesure de lier autant un récepteur relaxé qu'un récepteur excité, pouvant donc former des complexes LR ou LR*. L'autre facteur entrant en compte est la

protéine G. Dans le modèle ternaire étendu (Figure 2a) (62), la protéine G ne peut lier que le récepteur excité, peu importe la présence de ligand, formant donc des complexes R*G ou LR*G. Toutes ces formes existent en équilibre entre elles, et il est possible à partir des constantes d'équilibres de déterminer des valeurs d'efficacité pour les ligands.

Dans le modèle ternaire cubique (63), on ajoute la possibilité que le récepteur relaxé puisse aussi se lier à la protéine G, ajoutant ainsi des complexes RG et LRG au modèle, comme on peut le voir à la figure 2b.

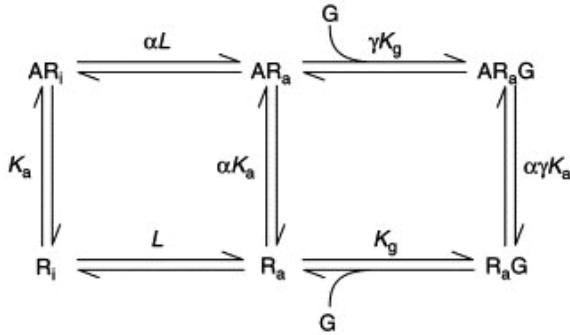
C'est à partir de ces modèles que les classifications de ligands ont été déterminées. Un ligand favorisant la forme active du complexe est classifié comme un agoniste. La très grande majorité des ligands naturels des RCPG agissent comme des agonistes. Un ligand favorisant au contraire la forme inactive du récepteur est classifié comme un agoniste inverse (64). Dans plusieurs cas, ces ligands vont diminuer l'activité basale du récepteur. Une troisième classe de ligand est appelée antagoniste. Ces ligands sont en mesure de lier les formes actives et inactives avec autant d'affinité, et ne favorisent aucune des deux formes. Ils n'ont donc aucun effet sur les constantes d'équilibres retrouvées auparavant. Leurs rôles biologiques sont plutôt de bloquer la liaison d'un agoniste ou d'un agoniste inverse, conservant ainsi un niveau de signalisation basal.

Dans le cas des agonistes et agonistes inverses, les ligands peuvent induire une réponse totale ou une réponse partielle. On va donc parler d'agoniste complet pour une molécule à effet maximal et d'agoniste partiel pour un ligand qui induit une réponse plus faible. On considère généralement l'agoniste naturel comme un agoniste complet, mais il est observé que pour certains récepteurs, des ligands synthétiques activent le récepteur de façon plus forte. Dans ce cas, on parle généralement de «super agoniste» pour ces ligands.

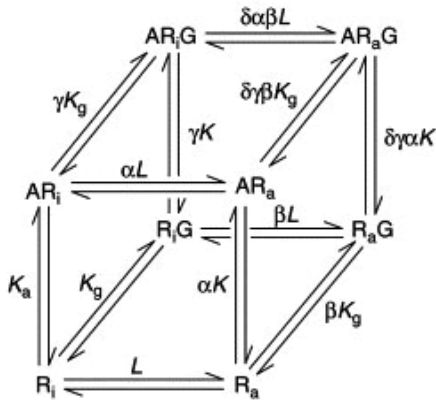
Une quatrième classe de ligand a été récemment découverte; il s'agit de modulateurs allostériques (65). Ces molécules ne lient pas le récepteur dans sa pochette de liaison 'naturelle', dite orthostérique. Ils vont plutôt lier une région distincte et modifier la structure du récepteur, modifiant les propriétés de liaison et d'activation du ligand orthostérique. Il existe des modulateurs allostériques qui régulent négativement le ligand orthostérique (NAM) et d'autres qui régulent positivement (PAM). Il existe aussi quelques exemples de ligands allostériques qui possèdent une activité agoniste ou agoniste inverse intrinsèque. On parlera

alors d'agonistes allostériques. Il est aussi possible qu'une molécule possède des propriétés d'agonistes allostériques couplées à des propriétés de modulateurs allostériques (65).

(a) Modèle ternaire modifié



(b) Modèle ternaire cubique



TRENDS in Pharmacological Sciences

Figure 3 : Modèle ternaire modifié (a) et modèle ternaire cubique (b) de l'état d'activation des RCPG. Adapté de (66)

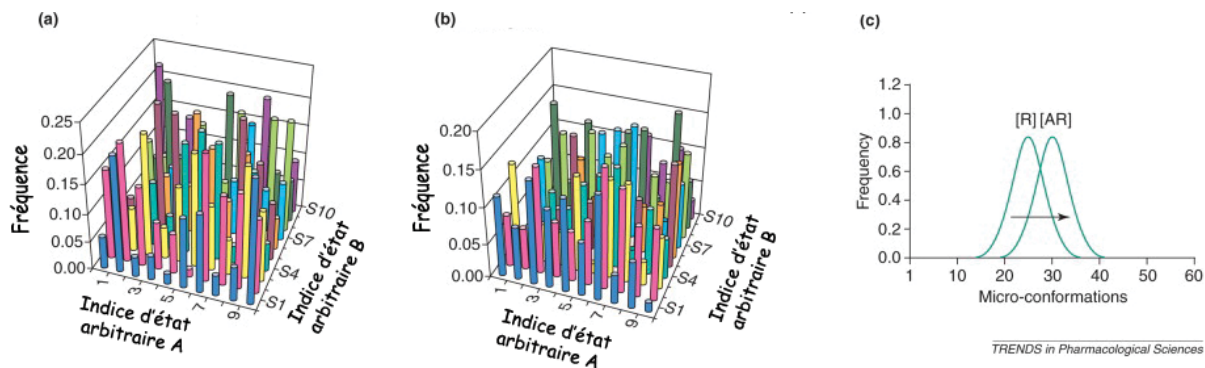


Figure 4 : Illustration du modèle probabiliste de l'état d'activation des RCPG. A) présente l'état basal du récepteur et b) l'état en présence d'un ligand. Ces deux histogrammes présentent la fréquence relative des récepteurs mesurés par leur état théorique dans deux voies d'activation distinctes. C) présente une courbe de population et la différence dans la fréquence selon les deux états. Adapté de (66)

Pluridimensionnalité des ligands

Le modèle ternaire cubique décrit une situation où le récepteur possède un seul état excité et où les ligands modulent l'oscillation entre cet état et l'état inactif. Depuis une dizaine d'années, plusieurs études ont montré les limites de ce modèle, en suggérant que certains ligands semblaient affecter différentes voies de signalisation d'une manière totalement distincte. Par exemple, le propranolol, ligand du $\beta 2AR$, est un agoniste inverse dans la voie de l'AMPC, mais un agoniste dans la voie des MAP Kinases (67). Plusieurs autres ligands des récepteurs βAR démontrent une variabilité similaire selon la voie de signalisation étudiée (68). Ce phénomène est maintenant observé pour une multitude de RCPG (69). Cela suggère que le récepteur n'existe pas sous une seule forme activée, mais bien plusieurs. Les récents modèles proposés utilisent une approche probabilistique, où le récepteur inactif existe sous une multitude d'états, et l'addition d'un ligand va modifier cette distribution d'états, en créant une nouvelle distribution tout aussi complexe (66). On peut voir un exemple de visualisation de ces distributions dans la figure 3. Dans ce modèle, chaque ligand peut posséder une efficacité distincte pour chacune des voies de signalisation modulée par le récepteur. On parle alors de pluridimensionnalité, car en situant chacune de ces efficacités sur un graphique multidimensionnelle, chaque ligand posséderait une coordonnée unique.

Deux principales hypothèses peuvent expliquer la riche texture pluridimensionnelle retrouvée. La première suggère que le ligand en lui-même encode une activité qui lui permet, lors de sa liaison au récepteur, d'induire une gamme de conformations qui lui sont uniques, et que ces conformations permettraient d'activer par remodelage dynamique et/ou recrutement les effecteurs du récepteur selon un ratio unique au ligand. Une deuxième hypothèse suggère plutôt que le récepteur est préassocié en différents complexes protéiques, et que chaque complexe pourrait stabiliser une gamme de formes actives spécifiques. Les ligands auraient alors une affinité distincte pour chacun des complexes déjà formés, résultant dans une efficacité d'activation différente. Les difficultés expérimentales à vérifier ces deux hypothèses ne permettent pas pour l'instant de favoriser une ou l'autre, et il faut considérer que ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs.

Peu d'exemples de pluridimensionnalité ont été observés à ce jour dans les récepteurs de la classe 3, dont fait partie GABA_B. Il est possible que le mode distinct de liaison au ligand, n'impliquant pas directement de cavités intra-TM, réduise le nombre potentiel de conformations actives possibles. Toutefois, il faut considérer que les récepteurs de classe 3 ont été clonés plus récemment, et possèdent souvent une gamme de ligands plus faibles que les récepteurs de classe 1, ce qui peut limiter la recherche de molécules présentant des propriétés pluridimensionnelles. Il est néanmoins important de considérer le concept dans l'étude de la fonctionnalité du récepteur GABA_B, car il s'agit d'une avenue thérapeutique prometteuse dans le but de diminuer les effets secondaires rattachés à l'activation de voies de signalisation néfastes par une drogue.

Oligomérisation des RCPG

Le récepteur GABA_B fut le premier RCPG à être caractérisé comme un hétérodimère obligatoire, et il est donc important d'introduire ce qu'est l'oligomérisation et les différentes propriétés qu'elle confère aux RCPG.

Évidences de la dimérisation

Il fut longtemps considéré que les RCPG agissent sous forme monomérique, un seul récepteur étant en mesure de lier son agoniste et d'activer la protéine G associée. Pourtant,

des évidences de coopérativité de liaison suggéraient une complexité difficilement explicable par un récepteur monomérique (70–77). Dans les années 1990, ce dogme fut remis en question par des évidences biochimiques. Lorsque séparés par électrophorèse dénaturante de type SDS-PAGE, des bandes de poids moléculaire équivalant au double du poids du récepteur monomérique sont observées, suggérant la présence de RCPG sous forme de dimères. Le traitement avec un peptide exogène, dérivé du TMVI du β 2AR, mène à la perte des bandes «dimériques» de ce récepteur, suggérant l'existence de la dimérisation et un des sites possibles d'interaction à l'intérieur du dimère (78). Ensuite, la découverte du récepteur hétérodimérique obligatoire GABA_B en 1998 poussa l'hypothèse de la dimérisation des RCPG à l'avant-scène (79–82). Dans ce cas, la sous-unité GABA_{B1} est retenue dans le réticulum endoplasmique lorsqu'exprimée seule, et nécessite la co-expression de GABA_{B2} pour former un récepteur fonctionnel à la membrane. Quelques années plus tard, des études de microscopie à force atomique sur des membranes rétinales démontraient une organisation oligomérique de la rhodopsine (83). Simultanément, l'utilisation de nouvelles méthodes d'études des interactions protéines-protéines ouvrirent la porte à une étude plus systématique du phénomène de dimérisation. L'émergence des méthodes de transfert d'énergie de résonance, générée soit par bioluminescence (BRET) ou par fluorescence (FRET) a permis d'étudier la formation de dimères directement dans des cellules vivantes, et ce pour plusieurs récepteurs (84, 85). L'utilisation de ces méthodes généra un constat général : il est possible pour la très grande majorité des RCPG de former des homodimères (86) et dans plusieurs cas, des hétérodimères (87). Ces méthodes ont aussi permises de mettre de l'avant la présence de multiples domaines de dimérisation au sein des RCPG. Il est encore mal compris pourquoi il existe plusieurs domaines distincts de dimérisation au sein d'un seul RCPG. Ces différents domaines peuvent suggérer la possibilité de former des oligomères composés de plus que deux sous-unités. Il est aussi possible que selon le domaine précis de dimérisation, les propriétés des dimères soient différentes, permettant de créer une diversité plus grande au sein de la population de récepteurs dimériques.

Considérant la grande quantité de récepteurs ayant été démontrés comme existant sous forme de dimères, il est surprenant de constater la faible quantité de dimères observés dans les études de cristallisation des RCPG. Bien que certains exemples récents démontrent bien la dimérisation au sein des cristaux obtenus (88–90), la majorité des structures caractérisées à ce

jour ont plutôt montrés des RCPG monomériques. Il est possible que la méthode de production des RCPG ne favorise pas une biosynthèse optimale permettant la dimérisation, ou que les méthodes de stabilisation utilisées inhibent la formation de dimères. Il est aussi possible que la dimérisation soit un processus dynamique, et que les conditions de cristallisation favorisent une dynamique de dissociation.

Effets fonctionnels de la dimérisation

Tel que présenté à la figure 4, la dimérisation des RCPG peut produire plusieurs types d'effets fonctionnels. Un exemple probant du rôle de la dimérisation est retrouvé chez les récepteurs du goût. Il existe 3 récepteurs de classe 3 responsables de la perception du goût, T1R1, T1R2 et T1R3. Lorsqu'exprimés seuls, ces récepteurs ne sont pas fonctionnels. Lorsque T1R1 est exprimé avec T1R3, on obtient un récepteur aux goûts sucrés (91), tandis que l'expression de T1R2 avec T1R3 produit un récepteur au goût umami («goût savoureux», dérivé du japonais), associé au glutamate et aux acides aminés (92).

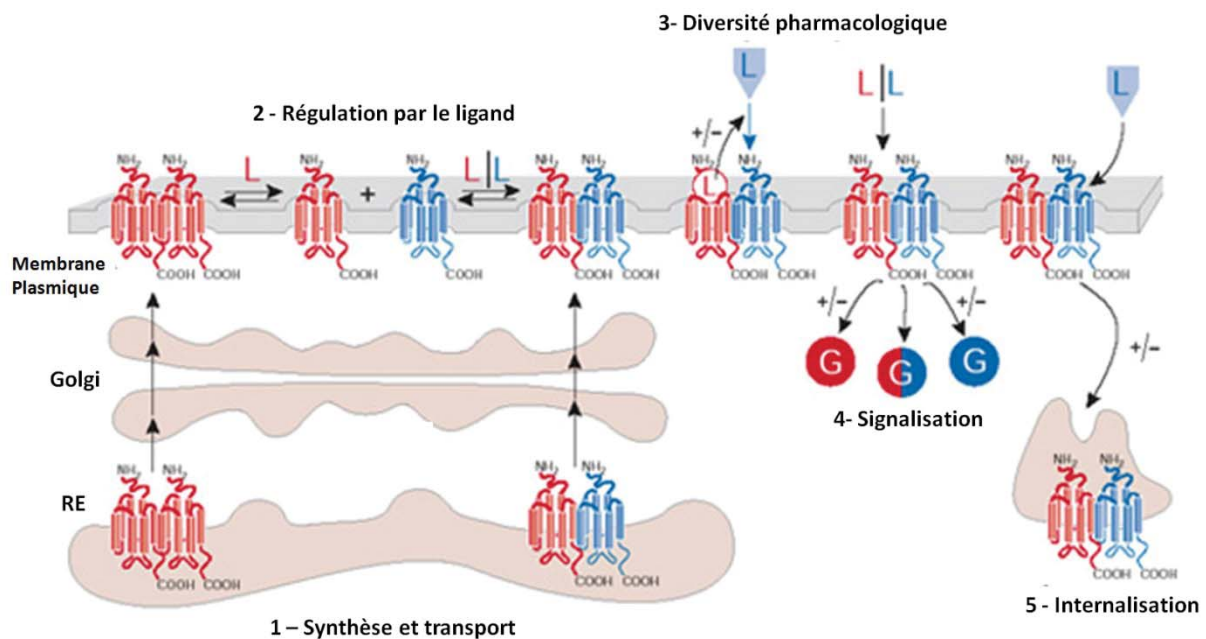


Figure 5 : Représentation schématique des différents effets potentiels de la dimérisation sur le cycle de vie des RCPG. Adapté de (93).

Plusieurs des études de dimérisation ont démontré l'existence constitutive des dimères, pouvant être mesurée dès la synthèse des récepteurs dans le RE (94–96). Il semble aussi y avoir des cas où les ligands des récepteurs sont en mesure de moduler la dimérisation. On note des exemples où un ligand peut promouvoir une plus grande association (97, 98) et des exemples où le ligand semble plutôt diminuer l'interaction (99, 100). Il faut toutefois user de prudence dans l'analyse de plusieurs de ces résultats, les techniques de RET et de coIP utilisées étant fortement sensibles à des changements conformationnels. En effet, le mouvement des deux récepteurs présents dans un dimère peut modifier la distance entre l'accepteur et le donneur d'énergie dans les expériences de RET, ce qui pourrait être faussement interprété comme une association ou une dissociation. Le changement conformationnel peut aussi modifier la sensibilité des complexes aux différents détergents utilisés dans les expériences de coIP, modulant ainsi leur association suite à la solubilisation des cellules.

Une vaste gamme de phénomènes peut être associée à la dimérisation. Il a été suggéré que la dimérisation puisse être nécessaire au transport du récepteur vers la membrane plasmique. Le récepteur $\alpha 1D$ adrénergique est retenu dans le RE lorsqu'exprimé seul et transporté à la membrane plasmique lorsqu'il dimérise avec le récepteur $\alpha 1B$ adrénergique (101). Il est plus difficile d'évaluer l'apport de la dimérisation au transport d'un homodimère, mais l'utilisation de récepteurs mutants semble en soutenir l'importance. En effet, l'utilisation de mutants du $\beta 2AR$ permet de retenir le récepteur de type sauvage à l'intérieur (102), ce qui est aussi le cas avec le récepteur $\alpha 1B AR$ (103). Finalement, un mutant du récepteur Frizzled 4 (Fz4) impliqué dans la dégénérescence rétinale autosomale-dominante est mal replié et trappe le récepteur de type sauvage dans le RE par dimérisation, expliquant la dominance génétique de l'allèle mutante (104).

La dimérisation peut affecter les propriétés de liaison du ligand des récepteurs impliqués. Il existe plusieurs exemples de coopérativité de liaison. On parle de coopérativité positive lorsque la liaison d'un ligand au premier récepteur favorise la liaison du ligand au deuxième récepteur. On peut retrouver des exemples de coopérativité positive de liaison chez le récepteur muscarinique M2 (105) et chez l'hétérodimère des récepteurs V1a de la vasopressine et de l'ocytocine (106). On parle de coopérativité négative lorsque la liaison d'un ligand au premier récepteur diminue ou bloque complètement la liaison du ligand au deuxième

récepteur. Ce type de coopérativité est beaucoup plus fréquente et a été détaillée dans plusieurs dimères de RCPG (107). Un troisième type de régulation des propriétés de liaison des ligands au récepteur est parfois observée. Sans parler de coopérativité de liaison en tant que tel, l'hétérodimérisation peut amener une synergie, où la présence des deux ligands crée une signalisation plus puissante que la somme de leurs effets indépendants (108).

Les évidences semblent suggérer que dans plusieurs cas, la formation d'un hétérodimère n'entraîne pas seulement l'addition de l'activité propre de chaque récepteur, mais bien la création d'une nouvelle unité de signalisation. Il y a de nombreux exemples où la coexpression de deux récepteurs provoque une activité que l'on ne peut associer aux sous-unités seules. Par exemple, l'activation du récepteur α_{2A} -adrénergique et l'activation du récepteur μ -opiacé mènent toutes les deux à une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2, mais lorsqu'exprimé ensemble, la coactivation mène plutôt à une diminution du signal (109). Les agonistes hallucinogènes activant le récepteur 5-HT_{2a} activent les voies de signalisation G_{i/o} et G_{q/11}, mais seulement lorsque le récepteur forme un hétérodimère avec le récepteur métabotrope de glutamate de type 2 (mGlu2) (110).

Un des exemples les plus probants des impacts de l'hétérodimérisation est au niveau de l'internalisation stimulée par des agonistes. De nombreux exemples démontrent une co-internalisation promue par un seul des ligands du dimère sans stimulation du deuxième partenaire (111). Les propriétés de triage endosomal d'un récepteur peuvent aussi être conférées à son partenaire de dimérisation. On note deux classes générales de RCPG en terme de propriétés post-endocytiques selon la durée de leur interaction avec la β -arrestine (112, 113). Une première classe (classe A) de RCPG, tel le β 2AR, se dissocie rapidement de la β -arrestine avant même l'internalisation, et montre une resensibilisation et un recyclage rapide. Une deuxième classe (classe B), par exemple le récepteur de vasopressine de type 2 (V2R), montre quant à elle une interaction prolongée avec la β -arrestine pouvant être détectée niveau des endosomes. Cette deuxième classe montre une resensibilisation plus lente et un faible recyclage à la membrane plasmique. La dimérisation des RCPG est en mesure de moduler les propriétés d'interaction avec la β -arrestine. Par exemple, la co-expression des récepteurs V1a et V2 de la vasopressine mène à la formation d'un hétérodimère où le récepteur V1a acquiert les propriétés de liaison à la β -arrestine et de recyclage du V2R (114).

Plusieurs questions quant à l'importance physiologique de la dimérisation observée dans les systèmes d'expression hétérologues sont soulevées. Effectivement, la surexpression protéique semble favoriser la formation de dimères qui ne sont pas mesurés à leur niveau d'expression physiologique. De plus, on peut souvent observer des interactions pour des récepteurs n'étant pas co-exprimés dans les mêmes cellules du corps. Il est donc important de valider les données de dimérisation par des observations physiologiques sur les effets de cette dimérisation. La présence d'effets fonctionnels est généralement un bon indicateur d'une dimérisation qui n'est pas artificiellement créée par l'étude même de l'interaction.

Oligomérisation des RCPG

Les premières études sur l'oligomérisation des RCPG se sont généralement tenues à mesurer la dimérisation, faute de moyens techniques permettant une mesure d'un nombre plus grand d'unités. En 2008, le groupe de Javitch, utilisant un mélange de BRET, de PCA et de réticulation, démontra que le récepteur D2 de la dopamine formait un oligomère de haut niveau, existant minimalement sous forme de trimères et tétramères (115). Simultanément, le groupe de Pin démontrait que le récepteur GABA_B, mon modèle d'étude, semblait lui aussi former des oligomères de haut niveau contenant minimalement deux sous-unités GABA_{B1} (116).

Les RCPG peuvent aussi oligomériser avec des protéines membranaires de familles distinctes. Par exemple, il a été démontré que les récepteurs D1 et D5 de la dopamine pouvaient respectivement oligomériser avec le récepteur au glutamate de type NMDA (117) et le récepteur GABA_A (118), tous deux des canaux ioniques régulés par des ligands. Le récepteur D2 de la dopamine peut quant à lui interagir directement et moduler la localisation à la membrane du transporteur de la dopamine DAT1 (119). Finalement, le transport à la membrane et la sélectivité de liaison de ligand du récepteur de la calcitonine et du récepteur CLR peuvent être modulés par l'interaction directe avec les protéines à un TM de la famille RAMP (*receptor activity modifying protein*) (120). Pour le récepteur CLR (*calcitonin like receptor*), la coexpression de RAMP1 ou de RAMP2/3 détermine la sélectivité envers le CGRP ou l'adrénomédulline, respectivement (121).

Mécanismes d'activation d'un oligomère de RCPG

En dernier lieu, l'oligomérisation mène à des questions fondamentales sur les mécanismes d'activation des RCPG. Comme on l'a vu plus haut, on peut constater des situations de synergie de signalisation et des situations de coopérativité de liaison des ligands. Quelques expériences récentes ont tenté de découvrir quelle est l'unité fonctionnelle minimale au sein d'un oligomère de récepteurs. Le premier cas étudié à cette fin est le récepteur GABA_B, car il est un hétérodimère obligatoire dans lequel la liaison du ligand se retrouve sur la sous-unité GABA_{B1}, qui est incapable d'activer la protéine G par elle-même. L'activité GEF du récepteur est plutôt située sur la sous-unité GABA_{B2}, ce qui nécessite donc une transactivation d'un protomère du récepteur vers l'autre (122). Les propriétés rattachées à ce mécanisme seront introduites plus en détail dans la section traitant directement de GABA_B plus loin dans l'introduction. Le même type de mécanisme a été élégamment démontré sur des homodimères du récepteur mGluR5 par coexpression de deux formes de protomères mutés. Le premier mutant n'avait plus l'habilité de lier l'agoniste, tandis que le deuxième mutant n'était pas en mesure d'activer la protéine G, ce qui rendait les deux protomères inactifs par eux-mêmes, mais leur coexpression permettait la formation d'un hétérodimère fonctionnel en réponse à l'agoniste (123). Des mécanismes de transcomplémentarité semblent aussi présents dans les oligomères du récepteur D2 (124).

Comme on peut le constater, l'oligomérisation des RCPG entraîne une panoplie d'effets fonctionnels majeurs. Le récepteur GABA_B étant un hétéro-oligomère fonctionnel, il est important de tenir compte de ces effets dans l'étude du récepteur et de ce mécanisme de régulation de son activité.

Contrôle cellulaire de la signalisation

Les travaux présentés dans cette thèse portent tous sur les mécanismes permettant à la cellule de contrôler la signalisation du récepteur GABA_B et cette section traitera des différents processus de contrôle classiquement associés aux RCPG ainsi que les découvertes récentes à ce sujet, permettant de faire un parallèle avec les mécanismes qui seront étudiés.

Il est important que la cellule soit en mesure de contrôler la durée et l'intensité du signal qu'elle reçoit. Une partie de cette régulation provient de la cellule émettrice, qui

contrôle la quantité de ligands relâchée. Il existe aussi souvent une machinerie extracellulaire en mesure de dégrader les ligands libres, ainsi que des transporteurs permettant la recapture des ligands de petits poids moléculaires, permettant de diminuer la durée du signal. Cela dit, une régulation importante du récepteur activé s'opère également au sein de la cellule cible. La cellule peut contrôler la réponse de deux façons générales, soit en modulant la concentration de récepteurs présents à la surface cellulaire et en modulant la capacité des récepteurs présents à transmettre le signal reçu. Le contrôle de la quantité de récepteurs peut s'opérer par une régulation de la biosynthèse des RCPG, ce qui sera premièrement présenté, ainsi que par le retrait des récepteurs de la membrane plasmique.

Lors de la stimulation d'un récepteur par un agoniste, celui-ci transmet un signal. Après un certain temps de stimulation, il existe des mécanismes cellulaires par lesquels la signalisation peut être arrêtée. On surnomme globalement ces mécanismes «désensibilisation». Il existe deux types de désensibilisation : homologue ou hétérologue. La désensibilisation homologue nécessite que le récepteur ciblé soit dans un état activé, tandis que la désensibilisation hétérologue implique que le récepteur peut être ciblé par l'activation de voies de signalisation indépendamment de sa propre activation (125). Ces différents mécanismes seront présentés par la suite.

Biosynthèse des RCPG et transport à la membrane plasmique

En tant que protéines membranaires, les RCPG sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique. Ils sont glycosylés de façon cotraductionnelle dans la lumière du RE et sont sujet à l'interaction avec plusieurs chaperonnes moléculaires les aidant à adopter leur conformation tridimensionnelle optimale et permettant leur export vers la membrane plasmique (126).

Les RCPG contiennent un peptide signal qui leur permet, lors de la traduction, d'être ciblés au translocon ancré dans la membrane du RE (127). Lorsque le peptide naissant est inséré dans le RE, l'oligosaccharide transférase reconnaît les séquences N-X-S/T et y conjugue un oligosaccharide composé de 14 sucres, tel qu'illustré dans la figure 5. Cet oligosaccharide contient différents sucres organisés en 3 branches, dont une contenant trois glucoses terminaux, tandis que les deux autres branches se terminent avec des mannoses. Peu après l'ajout de l'oligosaccharide, les deux glucoses terminaux sont clivés respectivement par

la glucosidase I et la glucosidase II (128). Cet oligosaccharide monoglycosylé à une fonction importante dès le RE, car il permet d'augmenter l'hydrophilicité de la protéine non structurée et d'interagir avec les protéines chaperonnes calnexine et/ou calréticuline (129). Ces deux chaperons ont un rôle similaire, qui est de couvrir les séquences hydrophobes du polypeptide naissant dans le but d'empêcher son agrégation, favorisant un repliement adéquat. Après un certain temps d'interaction, la calnexine relâche le peptide naissant et à cette étape, la glucosidase II clive le dernier glucose terminal, laissant un oligosaccharide composé de mannoses terminaux. Si la protéine ne s'est pas repliée de façon optimale, elle peut être reconnue par deux enzymes. La première, la glycoprotéine glucosyltransférase, ajoute un glucose sur l'oligosaccharide, ce qui permet au peptide naissant d'interagir de nouveau avec la calnexine pour compléter le repliement si possible (130). La deuxième enzyme, la α -mannosidase 1, clive un ou plusieurs des mannoses terminaux (131). Il semble que la quantité de mannoses clivés pourrait être indicateur du temps passé dans le RE dans l'effort de repliement. L'absence de mannoses mène la protéine mal repliée à être reconnue par les protéines EDEM (*endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein*), protéines à domaine lectine reconnaissant les mannoses (132). Ce complexe va cibler la protéine vers la dégradation par le système ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Lorsque la protéine est ciblée pour dégradation, elle est rétrotransloquée dans le cytoplasme et polyubiquitinée par des E3 ligases, incluant Fbs1 et Fbs2, qui reconnaissent les oligosaccharides riches en mannoses, ce qui la cible au protéasome 20S (133).

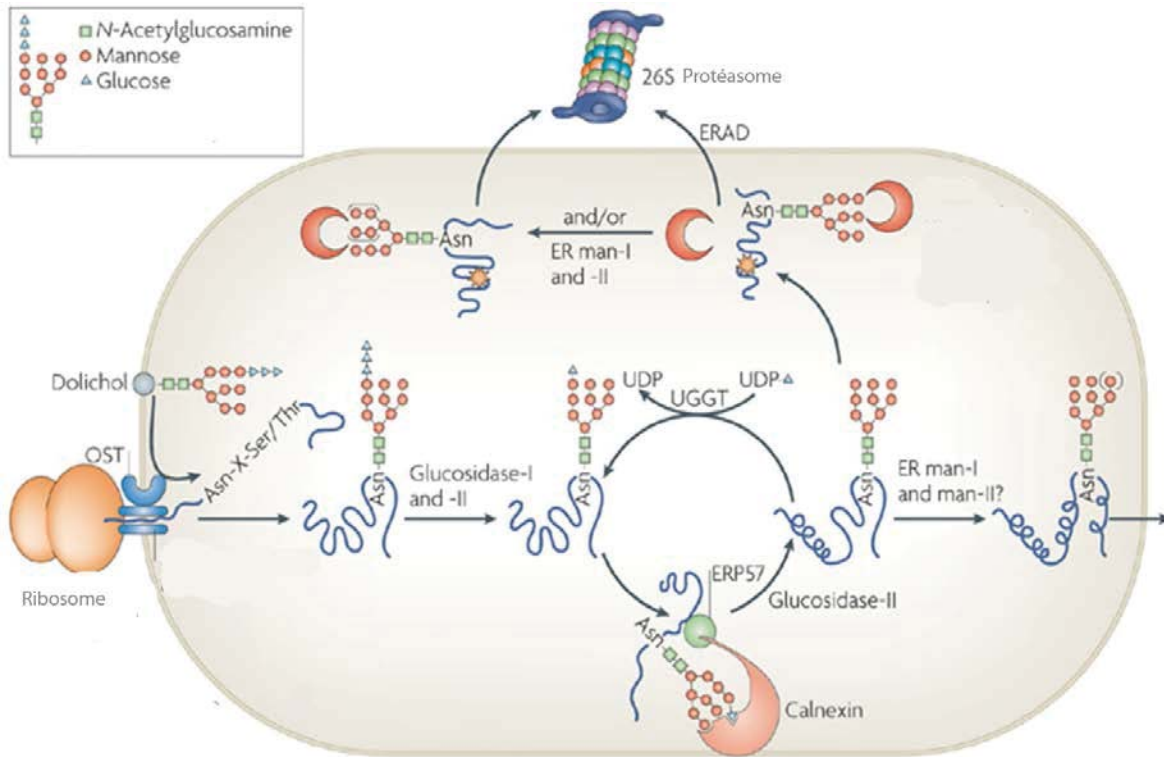


Figure 6 : Modèle de la glycosylation des protéines du réticulum endoplasmique et de la régulation du repliement par l'interaction de l'oligosaccharide à la calnexine. Adapté de (134).

Dans le cas de la protéine bien repliée, suite à son interaction avec les chaperons du RE, elle se retrouve à être ciblée pour l'export vers le système Golgi. Elle peut être reconnue par la protéine ERGIC-53, qui reconnaît les oligosaccharides mannosidés. ERGIC-53 va permettre le ciblage aux vésicules COPII, qui permettent le transport vers le réseau cis-Golgi (135). Une fois dans les citernes Golgi, les oligosaccharides vont continuer à être modifiés, cette fois-ci par addition de différents sucres, tels l'acide sialique, le N-acetylgalactosamine, le N-acetylglucosamine, le galactose et le fucose, pouvant varier d'une protéine ciblée à l'autre (136). Il semble même y avoir une diversité au sein de la population d'une protéine dans une cellule. La glycosylation semble modulée non seulement le repliement et le transport vésiculaire des RCPG, mais peut aussi influencer les propriétés de liaison au ligand (137).

Dans le cas précis des RCPG, il semble y avoir d'autres protéines du RE qui sont utiles à leur biosynthèse fonctionnelle. La protéine DRIP78 est associée au transport antérograde et à la formation de complexes fonctionnels entre le récepteur et le dimère $\beta\gamma$ (138, 139). La protéine CNIH4 est aussi impliquée dans le transport des récepteurs vers la membrane plasmique (140).

Les RCPG contiennent également plusieurs motifs au sein de leurs séquences influençant leur trafic vésiculaire. Des signaux de type diacidiques (D-x-E), des couples aromatiques (F-F, F-Y, Y-Y) ou des motifs dileucines (L-L ou I-L) sont retrouvés chez certains RCPG (126) et sont souvent impliqués dans l'interaction avec des protéines des complexes de transports vésiculaires. Les motifs D-x-E et aromatiques sont impliqués dans le transport du RE vers le Golgi au niveau de l'inclusion des RCPG au sein des vésicules (141, 142). Les motifs dileucines sont quant à eux impliqués dans le transport entre le réseau trans-Golgi et la membrane plasmique, ainsi que dans les processus d'internalisation (143). Tel qu'indiqué auparavant, il est aussi suggéré que la dimérisation des RCPG ait un rôle important dans le contrôle de leur export vers la membrane plasmique au niveau du RE (102).

Le transport vers la membrane plasmique peut donc être contrôlé par une combinaison des mécanismes touchant le repliement du récepteur, ainsi que par l'association avec des chaperonnes régulant le transport. Ces mécanismes sont tous deux importants dans l'étude du récepteur GABA_B, celui-ci étant sujet à ces régulations, qui seront traitées dans la section touchant au récepteur.

Mécanisme classique de désensibilisation

Le récepteur étant présent à la membrane et en mesure de transmettre le signal lors de son activation, la cellule possède des mécanismes permettant de contrôler la durée et la force de ce signal. En réponse à une stimulation soutenue par un agoniste, on observe une désensibilisation du récepteur. Tel qu'on peut le voir à la figure 6, la première étape de la désensibilisation est la phosphorylation du récepteur sur ses domaines intracellulaires. On distingue généralement la phosphorylation des RCPG par les différents types de kinases impliquées. La famille la plus importante de kinases des RCPG se nomme GRK (G protein coupled receptors kinases). Composés de 7 membres, dont 2 se retrouvent exclusivement dans le système visuel, les GRK sont recrutées au récepteur activé. Les GRK les plus caractérisés

sont GRK2 et GRK3, originellement connus comme les kinases du β 2AR, β ARK1 et β ARK2 (144, 145). Elles forment une sous-famille où les membres contiennent un domaine Pleckstrin-homology qui leur permet d'interagir avec les PIP_2 présents à la membrane plasmique, ainsi qu'un domaine de liaison au dimère $\beta\gamma$ de la protéine G (146). La famille GRK4 (GRK4, GRK5, GRK6) est elle aussi ciblée à la membrane plasmique, mais plutôt par palmytoylation (GRK4, GRK6) ou par un domaine polybasique qui permet l'interaction avec les phospholipides de la membrane plasmique (GRK5) (125). Les différents RCPG peuvent être régulés par une ou plusieurs des GRK selon le cas, et les deux familles semblent posséder des sites de phosphorylation distincts sur les récepteurs.

Un deuxième type de kinases est aussi typiquement impliqué dans la phosphorylation des récepteurs activés, il s'agit des kinases dépendantes des seconds messagers, typiquement PKA (147) et PKC (148). Les kinases des seconds messagers sont associées au phénomène de désensibilisation hétérologue, tandis que les GRK sont les plus importantes kinases impliquées dans la désensibilisation homologue.

La deuxième étape de la désensibilisation est le recrutement de la β -arrestine au récepteur activé et phosphorylé (149). Il existe 4 arrestines chez l'humain, deux étant impliquées dans le système visuel (Arrestin-1 présente dans les cônes et les bâtonnets, Arrestin-4 seulement présente dans les cônes), ainsi que deux β -arrestines (1 et 2, aussi appelées Arrestin-2 et Arrestin-3, respectivement) ubiquitaires. La β -arrestine a deux rôles classiques dans la désensibilisation; le premier est d'être recrutée au récepteur déjà phosphorylé, permettant l'arrêt de la signalisation par le désengagement de la protéine G du récepteur (150). Il fut par la suite découvert que la β -arrestine recrute aussi souvent des enzymes de destruction des seconds messagers, par exemple des PDE et des DAG kinases (151, 152). Une fois au récepteur, la β -arrestine permet le recrutement de la machinerie d'internalisation par interaction directe avec le complexe AP-2 (153) et la clathrine (154), permettant la formation de puits de clathrines qui mènent à l'internalisation du récepteur. De plus, la β -arrestine interagit avec la protéine tyrosine kinase c-Src, lui permettant de phosphoryler la dynamine, permettant la fission membranaire nécessaire à la création de la vésicule d'endocytose (155, 156).

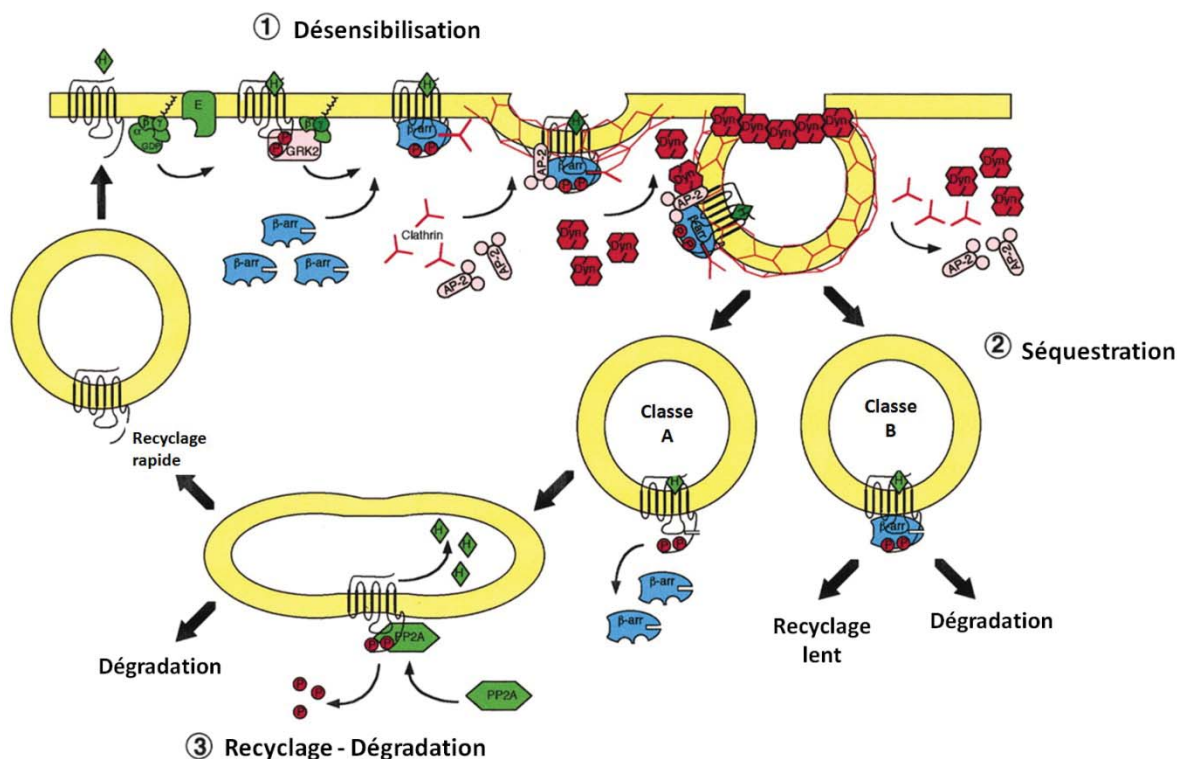


Figure 7 : Modèle classique de la désensibilisation des RCPG, incluant l'activation du récepteur, sa phosphorylation par les GRK, l'initiation de l'internalisation par le recrutement de la β -arrestine ainsi que le choix entre recyclage et dégradation une fois internalisé. Adapté de (125).

Suite à l'internalisation, le récepteur est séquestré dans une vésicule endosomale sous une forme désensibilisée, c'est-à-dire qu'il est phosphorylé, découplé de sa protéine G et est encore souvent lié par son agoniste (157). Tel qu'expliqué auparavant, il existe deux types de récepteurs en regard à l'interaction à la β -arrestine. Les récepteurs de classe A interagissent de façon transitoire avec la β -arrestine, ce qui corrèle avec un recyclage rapide, tandis que la classe B interagit longuement avec la β -arrestine, ce qui est associé avec un recyclage lent et/ou un ciblage vers la dégradation lysosomale (113). L'interaction entre la β -arrestine et le récepteur est favorisée par la phosphorylation de ses domaines intracellulaires, et la présence de plusieurs sites de phosphorylation rapprochés suggère une appartenance à la classe B (158).

Le recyclage est accompagné d'une resensibilisation du récepteur au sein d'endosomes au pH acide (159) contenant Rab4 (160), où le récepteur va être déphosphorylé (161) avant d'être retourné à la membrane plasmique. Plusieurs RCPG contiennent des séquences de

liaison à des domaines PDZ à la fin de leur queue carboxyl-terminale, influençant le recyclage des récepteurs à ce niveau (162, 163).

Le ciblage aux lysosomes pour la dégradation semble nécessiter le passage à travers les corps multivésiculaires (MVB), ce qui peut être favorisé par l'ubiquitination (164) du récepteur ou par l'interaction avec différentes protéines cytoplasmiques, tels GASP (*G-protein coupled receptor-associated sorting protein*) (165) et Dysbindin (166). Il semble que de façon générale, le complexe ESCRT-1 (*endosomal sorting complexes required for transport*) des MVB soit nécessaire pour la dégradation des récepteurs (167).

Nouveaux paradigmes du contrôle de la signalisation

Plusieurs kinases différentes peuvent phosphoryler un RCPG durant le processus de désensibilisation, et des découvertes récentes semblent suggérer que les différents sites de phosphorylation ont des rôles distincts. Dans le cas du β 2AR, les sites GRK2 semblent être fortement liés à la perte d'activité et à l'internalisation, tandis que la phosphorylation par PKA mènerait à la transition du récepteur de l'activation de la protéine $G\alpha_s$ à la protéine $G\alpha_i$, malgré que ce phénomène demeure controversé (168). Dans le cas de CXCR4, la queue C-terminale contient 7 sites potentiels de phosphorylation pouvant différenciellement être phosphorylés par GRK2, GRK3, GRK5 ou PKC. La phosphorylation par GRK2 et GRK6, couplé à l'interaction à la β -arrestine 2, régule négativement la signalisation par le calcium, tandis que la phosphorylation par GRK3 et GRK6 couplés à l'interaction avec la β -arrestine 1 régulent positivement l'activité d'ERK1/2. GRK2 aurait quand à elle un rôle négatif sur ERK1/2. Finalement, la phosphorylation par PKC serait impliquée dans le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 AIP4 et régulerait la dégradation du récepteur (169). Dans le même ordre d'idée, l'endocytose des récepteurs ATII_{1A} et V2R serait contrôlée par GRK2 et GRK3, tandis que leur signalisation β -arrestine-dépendante serait plutôt dépendante de GRK5 et GRK6 (170, 171).

L'ensemble de ces exemples a mené à une hypothèse de «code barres» de la phosphorylation, où le spectre de phosphorylation sur un récepteur permet un recrutement d'effecteurs différents selon les sites phosphorylés (172). Les exemples précédents se concentrent à différencier les sites individuellement ou en groupe, mais on pourrait penser

qu'une combinaison pourrait mener à des phénotypes intermédiaires ou distincts. L'hypothèse principale pour expliquer ce phénomène serait que les β -arrestines seraient précouplés en complexe avec leurs effecteurs et que les différents complexes auraient des motifs de reconnaissance différents au sein du récepteur phosphorylé sur divers sites.

Signalisation dépendante de la β -arrestine et indépendante de la protéine G

Longtemps considérés comme des récepteurs n'ayant qu'une flèche à leur arc, étant seulement capable d'activer leur protéine G associée, il semble maintenant acquis que les RCPG sont en mesure d'activer des voies de signalisation qui ne sont pas directement dépendante de la protéine G. Beaucoup d'attention a été portée sur le recrutement de la β -arrestine au récepteur et la signalisation qui en découle. Cela soutient un rôle de la β -arrestine qui est indépendant de sa capacité à interrompre la signalisation classique des RCPG.

Les premières découvertes suggérant un rôle de la β -arrestine dans la signalisation ont été reliées à sa capacité à servir de protéine d'échafaudage pour favoriser l'activation de voies de signalisation. Les premiers exemples trouvés furent au niveau de l'échafaudage des protéines Raf-1, MEK-1 et ERK1/2 de la voie des MAP Kinases par la β -arrestine 2 (173). On retrouve un exemple similaire sur la voie d'activation JNK par l'échafaudage d'ASK1, MKK4, JNK3 et MKP7 par la β -arrestine 2 (174). Un exemple distinct repose sur l'interaction de la β -arrestine 2 avec la kinase Akt et la phosphatase PP2A (175). Le recrutement conjoint des deux permet à PP2A de déphosphoryler Akt, la rendant inactive. Une fois inactive, Akt n'est plus en mesure de phosphoryler et inactiver GSK-3. Un des effets biologiques du lithium, utilisé pour traiter les patients bipolaires, est d'inhiber la liaison PP2A- β -arrestine 2, menant à une inhibition de GSK-3 (176). On retrouve aussi des évidences de signalisation reliée à la β -arrestine pour les voies de signalisation de c-Src, de PI3-Kinase et RhoA.

La β -arrestine peut aussi réguler la transcription de gènes *de novo*, tel qu'illustré à la figure 7. Un premier exemple de cette régulation est illustré par l'interaction directe de la β -arrestine avec le complexe $I\kappa B\alpha$ -NF κ B, protégeant $I\kappa B\alpha$ de la dégradation et inhibant la transcription NF κ B -dépendante (177, 178). Il fut par la suite découvert que la β -arrestine peut diffuser vers le noyau suite à l'activation de certains RCPG. Une fois au noyau, elle est en mesure de recruter l'histone acétyltransférase p300 et favoriser la transcription de différents

gènes, incluant *c-fos* et *p27* (179). Plusieurs autres voies de signalisation dépendantes de la β -arrestine risquent d'être découvertes, considérant que des études de protéomiques ont trouvé plus de 300 protéines d'interaction à une ou aux deux β -arrestines (180).

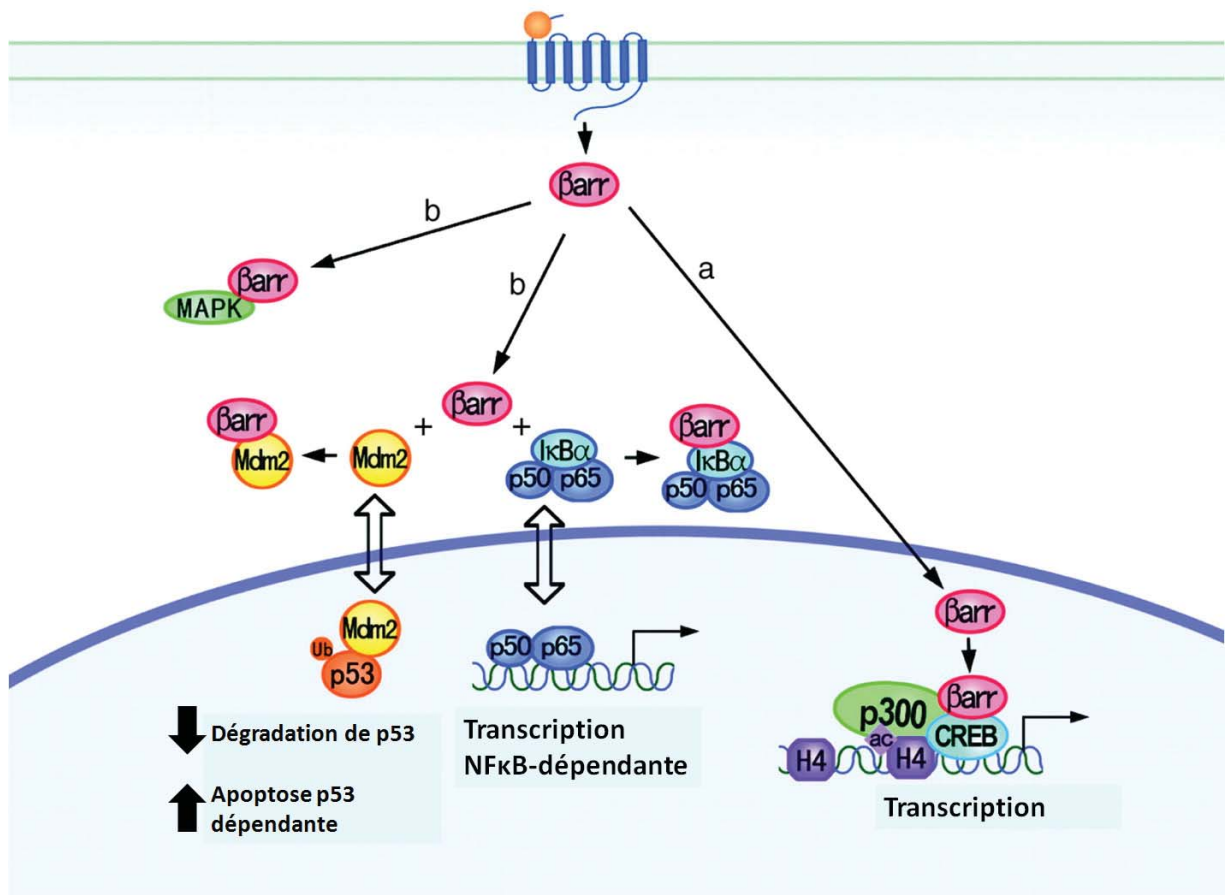


Figure 8 : Trois exemples de voies de signalisation dépendantes de la β -arrestine permettant de réguler le cycle cellulaire, l'apoptose et la transcription. Adapté de (181).

Il faut noter que la majorité des exemples présentés dans le paragraphe précédent nécessite la β -arrestine, mais sont généralement retrouvés dans un contexte où la protéine G est activée auparavant. Il y a quelques exemples récents de ligands fonctionnellement sélectifs qui permettent d'activer des voies de signalisation dépendante de la β -arrestine sans avoir d'effet sur la protéine G (182). Ces exemples démontrent que dans certains cas, on a bel et

bien droit à (minimalement) deux voies totalement distinctes utilisant des mécanismes moléculaires différents.

Une partie de la signalisation des RCPG provient de la transactivation de récepteurs de familles distinctes. En effet, il a été découvert que pour plusieurs RCPG, l'activation des voies MAP Kinases provient de l'activation en aval de RTK. Par exemple, plusieurs RCPG, sont en mesure de transactiver le récepteur à l'EGF, ce qui mène à une activation de la voie MAP Kinase dépendante de Ras (183). Dans le cas du récepteur à la vasopressine V2, la voie MAP Kinase est engagée par l'activation d'une métalloprotéase qui est en mesure de cliver un prolifand du récepteur à l'IGF-1, ce qui mène à son activation subséquente et l'activation de ERK1/2 en aval (184). Il est intéressant de constater que dans plusieurs cas, la β -arrestine peut être directement recrutée au RTK, ce qui peut laisser présager plusieurs rôles distincts de celle-ci au sein d'une chaîne de signalisation suite à l'activation d'un RCPG (185).

Il subsiste des questions quant à l'universalité des voies de signalisations de la β -arrestine. En effet, plusieurs des voies suggérées ci-dessus ne sont observées que pour un seul récepteur. Il semble donc y avoir des déterminants moléculaires non-identifiés au niveau du récepteur permettant de sélectionner la signalisation découlant de la β -arrestine.

L'ubiquitination

Principes généraux d'ubiquitination

L'ubiquitine est une petite protéine ubiquitaire de 8 kDa qui peut être conjuguée à un substrat protéique comme modification post-traductionnelle (186). Une fois conjuguée, le rôle principal de l'ubiquitine est d'agir comme une étiquette permettant de réguler la dégradation de la protéine substrat (187). La deuxième étude présentée dans cette thèse traitera spécifiquement de l'ubiquitination du récepteur GABA_B, et il est donc important d'introduire les concepts généraux qui y sont attachés.

Le système d'ubiquitination repose sur une chaîne de trois enzymes, comme on peut le voir à la figure 8. L'ubiquitine est premièrement activée par conjugaison enzymatique à l'enzyme E1, qui peut par la suite elle-même transférer l'ubiquitine sur une enzyme de type E2. Finalement, l'enzyme E2 forme un complexe avec une ubiquitine ligase E3, qui est généralement impliquée dans la reconnaissance des substrats, mais n'est elle-même pas

conjuguée à l'ubiquitine (188). On ne retrouve qu'une seule ligase E1 dans tout le génome humain, appelée UBA1, environ une vingtaine de ligases E2 de la famille UBE2 et plus de 600 ligases E3, incluant Mdm2 et Nedd4, impliqués dans l'ubiquitination des RCPG (189).

Tout comme la phosphorylation, l'ubiquitination est une modification réversible. Il existe une classe d'enzymes, appelées déubiquitinases (DUB, ou peptidases spécifiques à l'ubiquitine, USP) qui peuvent retirer l'ubiquitine d'un substrat en clivant le lien peptidique formé entre le groupement carboxyl-terminal de l'ubiquitine et le groupement amine de la chaîne latérale d'une lysine. On retrouve environ 100 DUB dans le génome humain (190).

L'ubiquitine elle-même possède 7 lysines pouvant à leurs tours être ubiquitinées. De plus, la méthionine initiatrice peut elle-même être un substrat de conjugaison (191). Les chaînes ainsi formées peuvent être homogènes ou posséder une topologie mixte, selon les lysines ubiquitinées dans la chaîne. On peut donc se retrouver avec plusieurs types d'ubiquitination : monoubiquitination, multimonoubiquitination, polyubiquitination homogène, polyubiquitination mixte et polyubiquitination branchée (voir figure 9). De plus, certaines chaînes de polyubiquitines non conjuguées à un substrat semblent avoir des effets biologiques. Typiquement, les résidus K11, K48 et K63 sont les sites de polyubiquitination les plus détectés, mais des chaînes de polyubiquitines ont été détectées sur l'ensemble des autres lysines, avec des conséquences biologiques indéterminées (192).

L'étiquette de polyubiquitine, impliquant classiquement des chaînes sur la lysine 48, cible les protéines vers la dégradation par le protéasome 26S (193). La chaîne polyubiquitine est reconnue par la protéine Rpn13, qui est le 'récepteur' d'ubiquitine du protéasome (194) et interagit ensuite avec USP14, ce qui induit l'ouverture du protéasome et son activation (195). USP14 est alors en mesure de cliver les chaînes de polyubiquitine, permettant le recyclage de l'ubiquitine.

Au niveau des protéines membranaires, l'ubiquitination est non seulement reliée à la dégradation, mais aussi à l'internalisation et a été particulièrement étudiée au niveau des récepteurs RTK. Dans le cas du récepteur de l'EGF, son activation mène à son autophosphorylation, ce qui permet le recrutement de la protéine d'échafaudage Grb2, qui elle-même recrute des ubiquitine ligases E3 de la famille Cbl (196). Il faut noter qu'à basse concentration de ligand, l'EGFR n'est pas ubiquitiné, mais internalise dans des voies clathrine-dépendantes et qu'à haute concentration, il est fortement ubiquitiné et internalise

plutôt par des voies liées aux radeaux lipidiques (197). Ce mécanisme nécessite l'ubiquitination, qui va permettre la liaison aux protéines contenant des motifs d'interactions à l'ubiquitine eps15, eps15R et epsin (198). Les différences de voies d'internalisation vont se refléter dans le destin du récepteur, les récepteurs ubiquitinés se retrouvant ciblés à la dégradation, malgré qu'il soit difficile de différencier si le destin des récepteurs est influencé par la voie d'internalisation plutôt que par l'ubiquitination elle-même (199). Il est possible que ces effets soient dépendants du contexte cellulaire, car il a aussi été suggéré que l'ubiquitination puisse favoriser l'internalisation à travers les puits de clathrines (200).

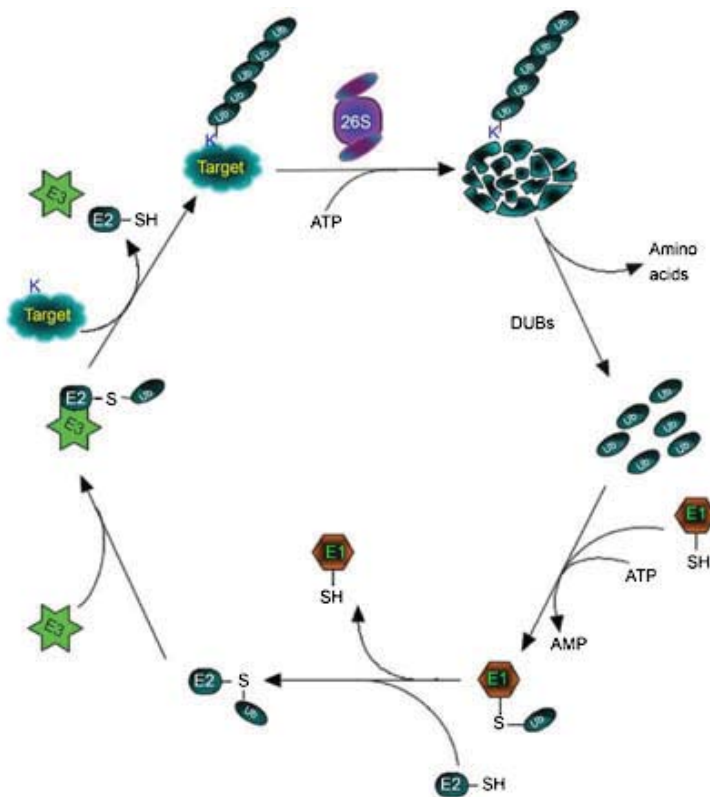


Figure 9 : Cycle de l'ubiquitination, où on dénote la conjugaison à l'enzyme E1 (UBA1), le transfert sur l'enzyme E2 (UBE2A), la ligase E3 qui identifie la protéine substrat, la dégradation par le protéasome ainsi que la deubiquitination par les DUB, menant à de l'ubiquitine libre qui peut être réutilisée. Provenant de (201).

L'utilisation du BRET pour détecter l'ubiquitination

Le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) est une technique permettant de mesurer des interactions protéiques en associant les protéines d'intérêt à une luciférase (*Renilla*) et à une protéine fluorescente verte modifiée (GFP). Cette technique devenant de plus en plus courante, je vais citer les articles de revue suivants pour les explications générales (202, 203) et me concentrer sur son application pour mesurer l'ubiquitination.

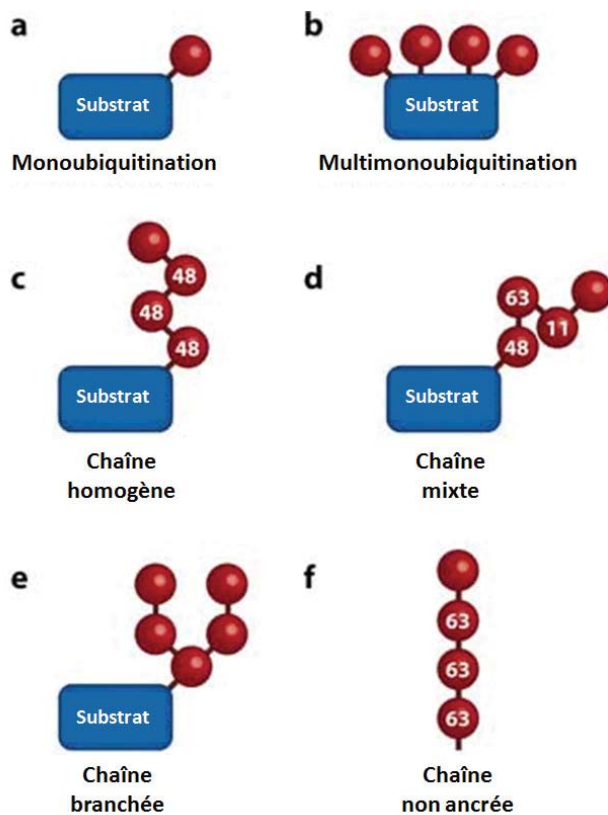


Figure 10 : Les différentes chaînes d'ubiquitines. Le chiffre à l'intérieur de l'ubiquitine représente la lysine sur laquelle la chaîne se forme. Adapté de (204)

La détection de l'ubiquitination est généralement difficile, et nécessite la solubilisation des protéines dans le but de les isoler. Il est difficile de mesurer l'ubiquitination par la méthode classique d'immunobuvardage, car on observe souvent de longues trainées pour lesquelles il est difficile de s'assurer de la spécificité et où la quantification est impossible. Le

laboratoire a développé une approche utilisant le BRET pour mesurer l'ubiquitination dans des cellules vivantes (205). Cette technique repose sur une protéine de fusion entre l'ubiquitine et la GFP. La protéine substrat de l'ubiquitine doit quant à elle être fusionnée à une luciférase. Lorsque la protéine substrat est ubiquitinée, la GFP va se retrouver à proximité de la luciférase, ce qui va permettre le transfert d'énergie de résonance, qu'on peut quantifier. On peut voir un schéma utilisant la β -arrestine comme substrat à la figure 10.

Plus récemment, des techniques utilisant la spectrométrie de masse ont aussi permis de mesurer l'ubiquitination (206). La digestion par la trypsine d'un substrat ubiquitiné laisse les deux résidus glycines terminaux de l'ubiquitine sur la lysine, ce qui permet de mesurer une différence de poids moléculaire prévisible sur les peptides détectés. L'utilisation de cette technique permet de faire des études sur l'ubiquitination globale des protéines de la cellule (207).

Rôle de l'ubiquitination chez les RCPG

Le rôle de l'ubiquitination dans la régulation des RCPG semble se jouer en deux temps. Il y a un premier rôle au niveau même de l'internalisation, par l'entremise de l'ubiquitination de la β -arrestine. Le deuxième rôle est plutôt au niveau de l'ubiquitination du récepteur, qui dans ce cas est plutôt lié au ciblage post-endocytose et à la dégradation du récepteur (208).

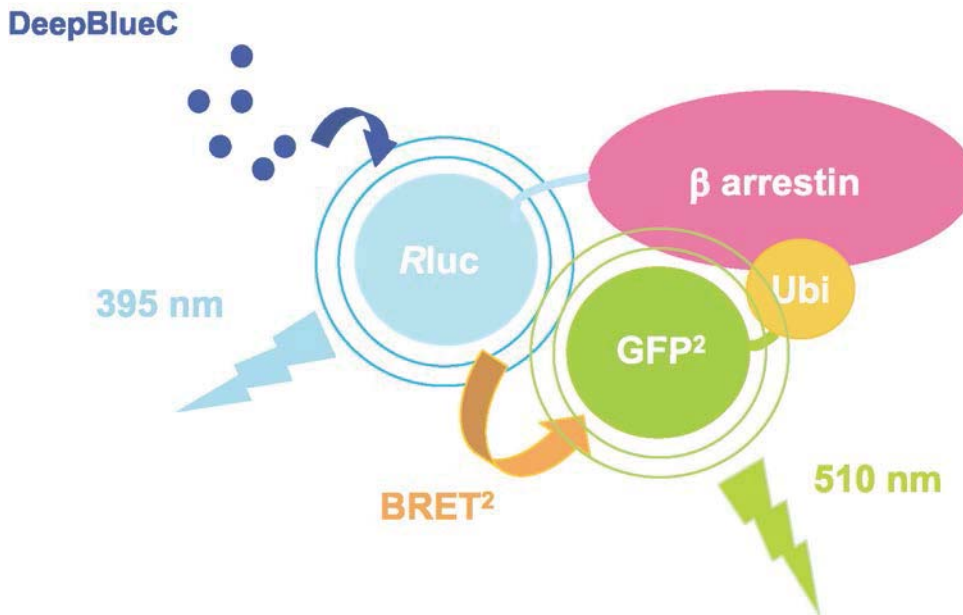


Figure 11 : Schéma de l'utilisation du BRET pour mesurer l'ubiquitination. Dans ce cas, la β -arrestine est la protéine fusionnée à la luciférase et l'on mesure son ubiquitination par ajout du substrat Deep Blue C, ce qui permet le transfert d'énergie de résonance vers la GFP².

Provenant de (205).

La β -arrestine contient un protéome très vaste (180), et au sein de ce protéome se retrouvent plusieurs ubiquitine ligases E3. L'internalisation des RCPG impliquant la β -arrestine nécessite l'ubiquitination de cette dernière par l'ubiquitine ligase Mdm2 (209). En bloquant l'ubiquitination de la β -arrestine, l'internalisation du β 2AR fut inhibée, mais de façon surprenante, pas sa dégradation, suggérant un mécanisme de dégradation indépendant de l'internalisation. La mutation de l'ensemble des lysines accessibles du récepteur inhibe sa dégradation, mais n'a aucun effet sur son internalisation. L'ubiquitination que subit la β -arrestine est différente selon le récepteur activé et il est suggéré que ces différences puissent moduler l'organisation du signalosome et la durée de l'interaction récepteur- β -arrestine (210). De plus, il semble que la β -arrestine soit déubiquitinée à un rythme différent selon son interaction avec un récepteur de classe A ou de classe B. Elle est rapidement déubiquitinée avec les RCPG de classe A et beaucoup plus lentement avec les RCPG de classe B (211). Cette déubiquitination serait dépendante de la déubiquitinase USP33, ce qui invoque un cycle ubiquitination-déubiquitination de la β -arrestine dans les processus d'internalisation et de contrôle post-endocytose (212).

Au niveau des récepteurs, plusieurs exemples d'ubiquitination ont été démontrés à ce jour. Dans le cas du β 2AR, il est ubiquitiné après stimulation avec l'agoniste par l'E3 ligase Nedd4, qui semble être recrutée par la β -arrestine 2 au niveau de la membrane plasmique (213). Le β 2AR peut aussi être déubiquitiné par USP20 et USP33 suite à son internalisation, ce qui favorise son recyclage aux dépens de sa dégradation (214).

Dans le cas du récepteur CXCR4, il est ubiquitiné de façon agoniste-dépendante par une E3 ligase, AIP4, qui est recrutée au récepteur par la β -arrestine (215), autant à la membrane plasmique qu'au niveau des endosomes (216). Dans ce cas, il semble y avoir une première étape d'ubiquitination au niveau de la surface cellulaire, et une deuxième étape dépendante d'AIP4 plus tardive au sein des endosomes. Il est aussi à noter que dans ce cas, les déubiquitinases USP8 et USP14 sont requises pour la dégradation efficace du récepteur en réponse à son agoniste (217, 218).

Le cas du récepteur PAR-1 est très différent des précédents. En effet, PAR-1 est activé par la protéolyse de son domaine amino-terminal par la thrombine, et son domaine tronqué devient un agoniste qui lie le récepteur et l'active (219). Le récepteur une fois clivé devient donc presque constitutivement actif. Dans le but d'interrompre sa signalisation, le récepteur doit donc être internalisé par un mécanisme prévenant son recyclage. Dans son cas, le récepteur est ubiquitiné à l'état basal, ce qui inhibe son internalisation (164). Lorsqu'activé, il est déubiquitiné et internalisé. Il ne semble pas pouvoir être recyclé à cette étape, et est plutôt ciblé à la dégradation lysosomale par l'entremise du complexe ESCRT-1, mais indépendamment de l'ubiquitine. Il semble plutôt interagir avec le complexe adaptateur AP-3 (220) et la protéine ALIX (221). Il faut noter que PAR-1 est sujet à une forte internalisation constitutive en absence d'activation, suivi du recyclage du récepteur. Il faut aussi noter que ni l'internalisation constitutive, ni l'internalisation dépendante d'un agoniste n'implique la β -arrestine, mais probablement une interaction directe avec le complexe AP-2 (164). Dans ce cas, le recrutement de la β -arrestine au récepteur aurait un rôle dans l'activation de voies de signalisation.

Plusieurs protéines contiennent des domaines pouvant lier l'ubiquitine et sont impliquées dans les différentes étapes du triage suite à l'internalisation. Par exemple, la protéine Hrs est fortement impliquée dans le trafic des protéines ubiquitinées au niveau des endosomes, dans un mécanisme similaire à celui des protéines de la famille Epsin (198). Hrs

possède un domaine de liaison à l'ubiquitine, et possède aussi un domaine de liaison à la clathrine, ce qui lui permet d'interagir avec les protéines ubiquitinées et les acheminer vers les puits de clathrine intraendosomaux, dirigeants les protéines vers les corps multivésiculaires. Une fois dans les corps multivésiculaires, les différents complexes ESCRT possèdent tous de nombreuses protéines pouvant lier l'ubiquitine, qui leur permet de séquentiellement lier les protéines ciblées, et les acheminer à l'intérieur du système endosomal vers un recyclage lent ou une dégradation lysosomale selon le cas (222).

Malgré plusieurs exemples d'ubiquitination des RCPG dénombrés à ce jour, les mécanismes moléculaires précis régissant les actions observées sont encore obscurs, et il semble que plusieurs des acteurs à ce niveau soient encore inconnus. Nous nous sommes intéressés à ces questions, qui feront l'objet du deuxième article présenté dans la thèse.

La fusion membranaire et la protéine NSF

Dans le cadre de la première étude de cette thèse, la protéine NSF, son interaction avec GABA_B et son rôle sur la signalisation du récepteur vont être examinés. Il est donc important de brièvement introduire NSF et ses rôles connus dans les mécanismes de régulation de la fusion membranaire et de différents récepteurs membranaires.

Fusion membranaire

Le processus de fusion membranaire est d'une importance vitale pour la cellule, et nécessite l'implication de vastes complexes protéiques en amont et en aval de l'évènement de fusion. On distingue deux types de fusions membranaires. Il y a premièrement une fusion constitutive qui se produit en absence de stimulus par la cellule. Il y a ensuite une fusion membranaire contrôlée qui nécessite une activation et un signal déclencheur (223). Par exemple, la relâche de neurotransmetteur dans une synapse nécessite une fusion contrôlée.

La fusion membranaire est guidée par la présence de petites GTPases de la famille Rab sur les vésicules. Les Rab sont en quelque sorte l'étiquette qui dirige la vésicule vers sa membrane cible. Lorsqu'elles lient le GTP, les Rab sont ancrés sur la vésicule et permettent de recruter des effecteurs. Une fois la fusion terminée, le GTP est hydrolysé en GDP et les Rab redeviennent solubles (223).

La fusion membranaire nécessite la présence de protéines de la famille SNARE sur les vésicules et sur les membranes cibles, qui agissent comme le moteur de la fusion. Une fois l'action de ciblage des Rab effectuée, les SNARE, maintenant en proximité, peuvent s'associer entre elles. Les SNARE sont caractérisées par leur capacité à former des hélices de type *coiled-coil* (hélices superhéliçoidales), une forme de structure quaternaire très stable (224). On retrouve des SNARE sur toutes les membranes de la cellule, divisés en deux grandes classes : les SNARE de la membrane cible (t-SNARE) et les SNARE de la membrane vésiculaire (v-SNARE). Les SNARE fonctionnent en équipe, les v-SNARE devant s'associer avec les t-SNARE pour former la structure *coiled-coil* et promouvoir la fusion membranaire. Les SNARE ont généralement une forte spécificité d'interaction entre partenaires, ce qui permet d'assurer un bon ciblage (225). Un exemple de partenaires SNARE est au niveau de la relâche de neurotransmetteur, où VAMP1 est présente sur la membrane vésiculaire (v-

SNARE), tandis que SNAP25 et la syntaxine-1 sont présents sur la membrane synaptique (t-SNARE) (226). Lorsque la vésicule s'approche de la membrane cible, la proximité des SNARE va favoriser leur interaction et la formation du domaine *coiled-coil*, ce qui va former un complexe SNARE en trans. Cet événement va générer une grande quantité d'énergie qui va être impliquée dans le remodelage des bicouches lipidiques entre les deux membranes (227). Les protéines de la famille synaptotagmine vont aussi être impliquées dans la fusion membranaire. Les synaptotagmines s'assemblent au niveau des complexes trans-SNARE et sont des senseurs de calcium. Lorsqu'il y a un influx de calcium, la synaptotagmine se lie aux phospholipides des membranes et à l'aide des complexines, permet le transfert de l'énergie de liaison du *coiled-coil* des SNARE vers les membranes lipidiques, ce qui va créer l'ouverture du pore de fusion (228). Les protéines de la famille SM, tel MUNC18, sont aussi impliquées dans le processus de fusion membranaire. Il semble qu'elles agissent comme chaperons permettant l'amorçage des SNARE avant la formation du complexe *trans* (229).

Une fois la fusion terminée, les SNARE restent sous forme *coiled-coil*, mais sous une forme *cis*, les deux étant sur la même membrane. Ils doivent donc être séparés pour pouvoir être recyclés et générer un nouvel événement de fusion. C'est la protéine NSF, accompagnée des cofacteurs SNAP, qui effectue cette action (230).

La protéine NSF

La protéine NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) est membre de la famille des AAA (ATPase associée à différentes activités cellulaires) et est composée de trois domaines distincts (231). Elle possède deux domaines ATPases, dont un est catalytiquement inactif. Elle possède aussi un domaine amino-terminal ne possédant pas une structure stable. Le domaine ATPase inactif sert à former un complexe multimérique car NSF est active sous forme d'hexamère (232). Des expériences de microscopie électronique semblent indiquer que NSF prend la forme d'un baril entourant son substrat (233).

NSF se lie aux complexes cis-SNARE et une fois le complexe SNARE-NSF formé, les cofacteurs SNAP peuvent se lier sur NSF et activer son activité ATPasique (230). L'hydrolyse conjointe de 6 ATP fournit une grande quantité d'énergie, qui permet à NSF de désassembler le *coiled-coil*, séparant les différents SNARE. C'est cet événement qui est à la base du recyclage des SNARE et permet à la fusion membranaire de se reproduire. Une

inhibition de NSF après un évènement de fusion mène à l'arrêt de la fusion une fois les réserves de vésicule épuisées. La protéine NSF tire son nom de sa sensibilité au N-éthylmaléimide, un agent alkylant ciblant les cystéines libres. Les cystéines de NSF sont essentielles à son activité, car elles peuvent aussi être régulées par la S-nitrosylation, ce qui bloque NSF en complexe sur les SNARE et bloque la fusion membranaire (234).

NSF et le récepteur AMPA

La protéine NSF a aussi été trouvée comme protéine d'interaction sur la sous-unité GluR2 du récepteur ionotropique AMPA (235). Une partie importante de la régulation de l'activité des récepteurs AMPA se situe au niveau du contrôle de son expression à la synapse. La protéine NSF favorise l'expression à la membrane synaptique du récepteur (236). Le récepteur AMPA est internalisé par l'association de la protéine PICK1, sujet à la phosphorylation par PKC (237, 238) et NSF, conjointement avec les SNAP, désassemble le complexe PICK-1/AMPA, ce qui permet une réinsertion au sein de la membrane, tel qu'on peut le voir à la figure 12 (239).

NSF et les RCPG

NSF a aussi été discernée comme acteur dans les processus d'internalisation des RCPG. Premièrement, elle fut identifiée comme protéine d'interaction avec la β -arrestine 1 ayant un impact sur l'internalisation du β 2AR (240). Elle fut ensuite identifiée comme partenaire d'interaction du β 2AR et de CLR-RAMP3, sur lesquelles NSF lie le motif PDZ terminal en compétitionnant avec la protéine NHERF-1 (163, 241). Cette compétition permet de moduler le recyclage des récepteurs par un mécanisme encore mal compris (242).

NSF lie aussi le récepteur de la dopamine D2 au niveau de sa 3^e boucle intracellulaire. Cette liaison permet de faire un pont entre D2R et AMPAR, ce qui permet à D2R de moduler les effets neurotoxiques reliés à l'activation chronique de l'AMPA et du NMDAR, en diminuant l'activité du récepteur AMPA, réduisant du même coup l'activation du NMDAR (243). Plusieurs autres récepteurs semblent aussi en mesure de lier NSF, mais aucun effet fonctionnel n'est encore caractérisé (244, 245).

Considérant ces effets de NSF sur les différents récepteurs membranaires, incluant des RCPG, il sera intéressant de rechercher des similarités auprès de $GABA_B$ dans notre étude sur cette interaction.

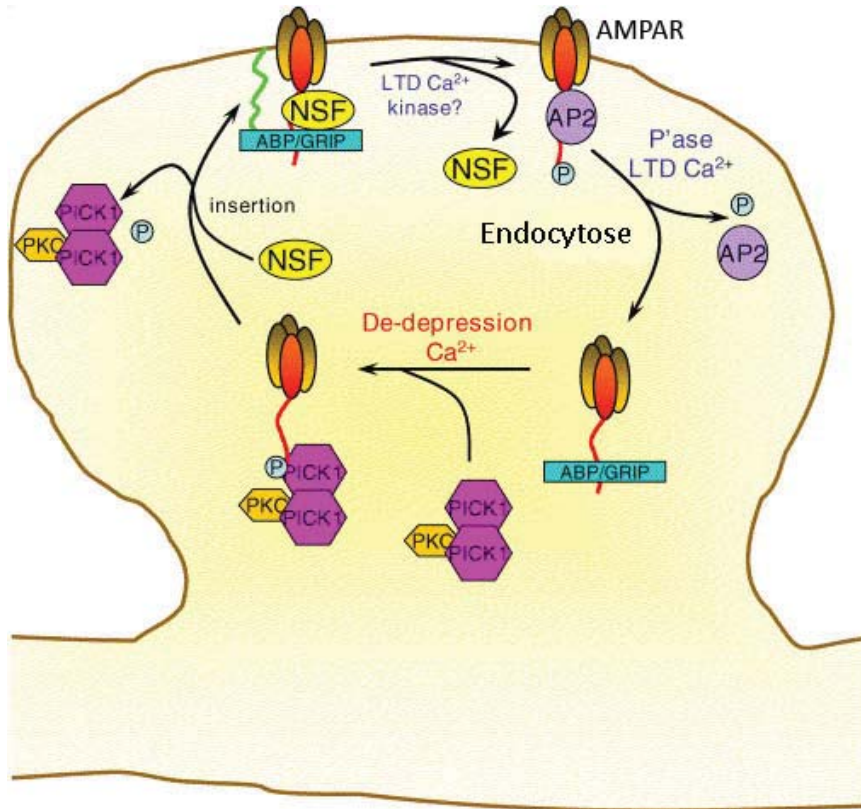


Figure 12 : Rôle de NSF dans la régulation de l'expression du récepteur AMPA à la membrane synaptique. Adapté de (246)

Modèle d'étude : le récepteur GABA_B

La signalisation GABAergique

Le modèle d'étude utilisé dans ma thèse est le récepteur GABA_B. La signalisation GABAergique est la principale voie de neurotransmission inhibitrice du système nerveux central (247). Le GABA régule l'activité neuronale, et dans le but d'expliquer son action, je vais résumer le mécanisme d'activation d'un neurone. La transmission synaptique repose sur le déséquilibre ionique qui se crée entre l'intérieur et l'extérieur d'un neurone. À l'état basal, il y a une forte concentration de sodium et de chlore à l'extérieur du neurone, tandis qu'une forte concentration de potassium se retrouve à l'intérieur. Ceci donne au neurone une différence de potentiel au repos d'environ -65 mV. L'ajout de glutamate à la dendrite permet l'activation de récepteurs ionotropiques du glutamate (types AMPA, NMDA, kainate). Ces récepteurs permettent l'entrée de sodium, ce qui crée une dépolarisation de la membrane (voir figure 13). Si l'entrée de sodium est assez importante, cette dépolarisation locale se transmet le long de la dendrite jusqu'au soma. Lorsqu'un certain seuil est atteint au niveau du cône d'implantation, des canaux sodiques dépendants du voltage sont activés, ce qui crée une entrée massive de sodium. On surnomme ce phénomène 'potentiel d'action'. Ce potentiel d'action est transmis le long de la dendrite jusqu'au soma et ensuite au sein de l'axone par activation directionnelle des canaux dépendants du voltage (voir figure 14). Arrivé à la membrane présynaptique de l'axone, le potentiel d'action permet l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage, qui permettent l'entrée de calcium. Tel que vu auparavant, l'entrée de calcium permet la fusion membranaire et la relâche de neurotransmetteur, ce qui permet de passer le signal au neurone suivant.

Le rôle du GABA au sein de cette transmission se joue en deux temps. Premièrement, le GABA active l'ouverture des récepteurs-canaux chloriques GABA_A. Ces récepteurs permettent l'entrée de l'ion chlorique dans le neurone, ce qui crée une hyperpolarisation de la membrane. Cette hyperpolarisation fait en sorte que la force du signal dépolarisant nécessaire pour atteindre le seuil d'activation des canaux sodiques dépendants du voltage doit être plus élevée, diminuant la chance de créer un potentiel d'action. Les récepteurs GABA_A sont d'une incroyable complexité pharmacologique, étant des hétéro-pentamères composés minimalement

d'une sous-unité α , d'une sous-unité β et d'une combinaison de trois autres sous-unités pouvant être de famille α , β , γ , δ , ϵ , π , ou θ (248). Il y a 6 types de sous-unités α , 3 types de sous-unités β et γ et une seule sous-unité des familles δ , ϵ , π , et θ , ce qui crée une très grande quantité de récepteurs différents. Il faut noter que le récepteur GABA_A typique est composé de deux sous-unités α et β , et une sous-unité γ (voir figure 15). Le récepteur GABA_A est aussi une cible pour plusieurs ligands importants, incluant les benzodiazépines, l'éthanol et certains neurostéroïdes.

L'action du GABA a aussi une composante métabotrope, c'est-à-dire une action impliquant des seconds messagers. Cette composante est médiée par un deuxième type de récepteur, nommé GABA_B, et implique une inhibition de la relâche de neurotransmetteur au niveau présynaptique ainsi qu'une hyperpolarisation de la membrane post-synaptique par l'entrée de potassium dans le neurone.

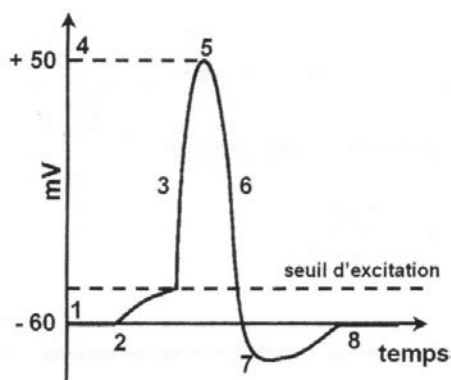


Figure 13 : Visualisation d'un potentiel d'action. 1) Le potentiel au repos de la membrane (environ -60 mV). 2) Stimulation. 3) Potentiel d'action. Le potentiel atteint le seuil d'activation, ce qui mène à l'ouverture des canaux sodiques voltages dépendants. 4-5) Atteinte du potentiel d'équilibre du sodium et inactivation des canaux sodiques. 6) Ouverture des canaux potassiques, ce qui mène à une repolarisation. 7) Période de latence, ou hyperpolarisation de la membrane. 8) Retour au potentiel de repos.

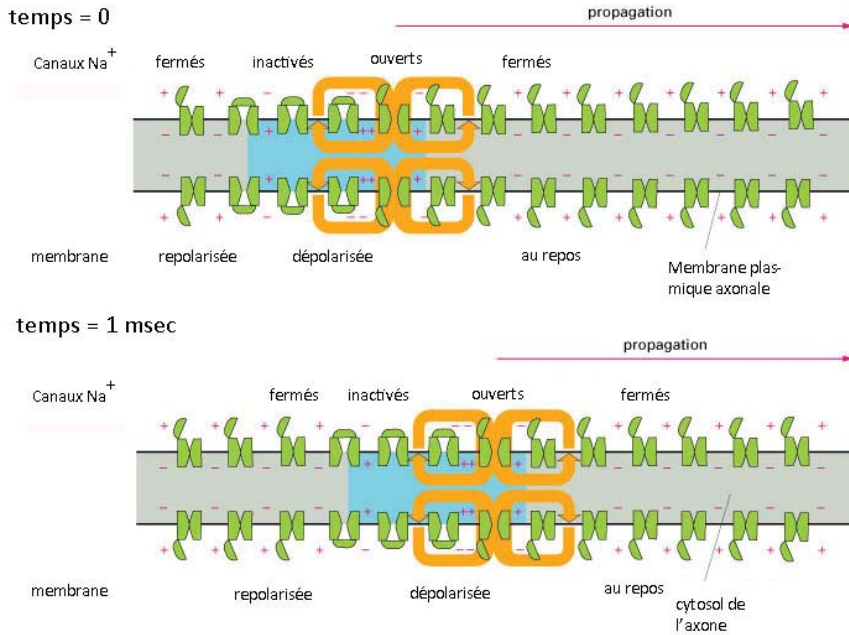
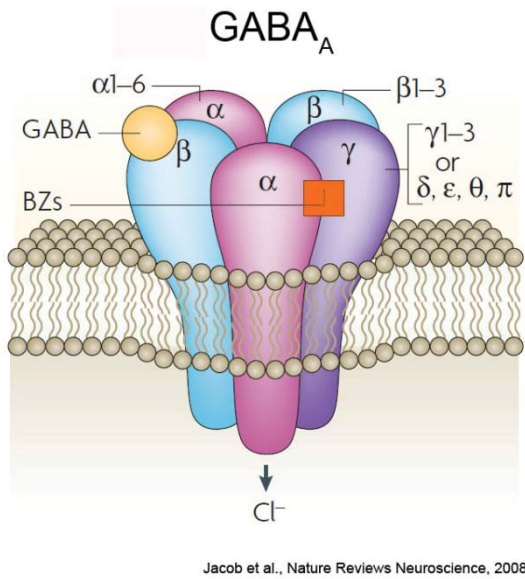


Figure 14 : Illustration du mécanisme de transmission du potentiel d'action au sein de l'axone. Adapté de (249).



Jacob et al., Nature Reviews Neuroscience, 2008

Figure 15 : Illustration du récepteur GABA_A incluant les différentes sous-unités le composant et les sites de liaisons de ses différents ligands. Adapté de (250)

Identification du récepteur GABA_B

Le récepteur GABA_B fut identifié au début des années 1980 quand le groupe de Bowery s'aperçut qu'un traitement avec la bicuculline, un antagoniste à spectre large des récepteurs GABA_A, n'abolissait pas l'ensemble des sites de liaison du GABA (251). Il fut ensuite constaté que les sites résistants à la bicuculline pouvaient lier le baclofen, un agoniste synthétique analogue au GABA (252). Malgré de nombreux travaux sur le récepteur natif, le clonage moléculaire s'avéra très difficile. Il fallut attendre le milieu des années 1990, où la synthèse d'un antagoniste radio-marqué à l'iode 125 et la création de banques d'ARN messagers de cerveau, permirent l'identification d'un premier récepteur GABA_B. En effet, en 1997, le groupe de Bettler identifia un récepteur qui comportait certaines caractéristiques du récepteur natif, mais semblait de basse affinité (253) et semblait être retenu dans le réticulum endoplasmique (254). Il fallut attendre peu de temps pour que l'identification du récepteur sous sa forme complète soit accomplie. En effet, dans une situation très rare, 4 publications à hauts impacts furent publiées dans l'espace de quelques semaines dans Nature et Science, de la part de 4 grandes compagnies pharmaceutiques, montrant l'identification d'une deuxième sous-unité du récepteur et la formation d'un hétérodimère fonctionnel obligatoire (79–82). La première sous-unité identifiée, liant le ligand, fut nommée GABA_{B1}, tandis que la deuxième sous-unité fut nommée GABA_{B2}.

Cet hétérodimère obligatoire démontrait la majorité des propriétés pharmacologiques du récepteur natif, et restaurait une affinité typique pour la liaison du GABA et du baclofen. Cependant, les études effectuées dans les tissus natifs suggéraient une diversité pharmacologique difficile à expliquer avec seulement deux sous-unités, même en prenant en considération les deux isoformes différents de GABA_{B1}, GABA_{B1(a)} et GABA_{B1(b)} (255). Bien qu'il existe quelques autres isoformes de GABA_{B1}, ils sont très peu exprimés dans le système nerveux, et leurs rôles ne sont pas très bien compris (256, 257). Les causes de cette diversité pharmacologique restent donc encore mystérieuses. L'expression de GABA_{B1(a)} et GABA_{B1(b)} n'est pas le résultat d'un épissage alternatif, mais plutôt d'une différence au niveau des promoteurs et du site d'initiation de la transcription du gène (258). Pour ce qui est de la sous-unité GABA_{B2}, il fut originalement suggéré que des formes d'épissage alternatif pouvaient exister, mais cela ne fut pas soutenu par les études ultérieures (259). Un troisième gène

homologue aux deux premières sous-unités fut aussi recensé chez l'humain et le rat, mais fut classé comme un pseudo-récepteur, GABA_{BL} (260). Ce RCPG contient une séquence *coiled-coil* similaire à celle présente sur GABA_{B1} et GABA_{B2} et contient lui aussi une séquence de rétention de type R-X-R. Malgré que son ARN messenger soit fortement exprimé dans les testicules et le cerveau fœtal, aucune protéine ne peut être détectée, le récepteur ne semblant pas être traduit. Il est cependant exprimé chez le rat et la souris, malgré que son rôle ne soit pas encore caractérisé. Il ne peut se substituer à GABA_{B1} ou GABA_{B2} dans la formation d'un hétérodimère fonctionnel et ne peut lier les ligands du GABA. Considérant l'absence d'expression chez l'humain, GABA_{BL} est considéré comme un gène vétuste n'ayant plus d'importance physiologique.

La preuve finale de l'existence de seulement deux sous-unités physiologiquement importantes pour le récepteur GABA_B provient d'études génétiques chez la souris. L'ablation génétique de l'expression de GABA_{B1} mène à une perte complète de l'activité GABA_B et aucun site de liaison n'est mesurable (261). L'ablation génétique de GABA_{B2}, quant à elle, mène à une perte complète de l'activité typique GABA_B, mais il subsiste une activité GABA_{B1} anormale dans certains types neuronaux, toujours mal expliquée (262). Les travaux d'invalidation des gènes chez la souris ont donc confirmé que l'ensemble de la signalisation GABA_B est dépendante de la coexpression des deux sous-unités.

Le récepteur GABA_B possède des activités présynaptiques et postsynaptiques distinctes. La localisation du récepteur est déterminée par la sous-unité GABA_{B1}. En effet, un dimère GABA_{B(1a-2)} va être dirigé vers l'axone et la membrane présynaptique, tandis que le dimère GABA_{B(1b-2)} va être dirigé vers les dendrites et la membrane postsynaptique (263). Il est important de noter à ce niveau que la seule différence entre les deux isoformes se retrouve au niveau du domaine extracellulaire, où GABA_{B1(a)} possède deux domaines de type sushi qui sont absents chez GABA_{B1(b)}. Les isoformes sont par ailleurs identiques, incluant l'ensemble des domaines intracellulaires, qui contiennent la même séquence.

Pathologies/physiologie

L'ablation des gènes codant pour GABA_{B1} et GABA_{B2} chez la souris mène à des phénotypes notables, incluant le développement de crises d'épilepsie spontanées, d'hyperalgésie, de problèmes locomoteurs et de graves problèmes de formation de la mémoire

(261, 262). Le récepteur GABA_B a aussi été lié indirectement à des maladies tels la schizophrénie, l'anxiété, la dépression et les troubles obsessionnels compulsifs (264). Cependant, à ce jour, un seul polymorphisme du gène de GABA_{B1} a été associé à une forme d'épilepsie du lobe temporal (265).

Le baclofen, agoniste synthétique du récepteur GABA_B, est utilisé cliniquement comme agent antispastique et relaxant musculaire chez les patients atteints de la sclérose en plaques, ainsi que pour traiter la rigidité associée aux corps de Lewis chez les patients atteints de Parkinson (266). De plus, des études cliniques ont permis d'observer un vaste potentiel pour des ligands de GABA_B dans le traitement de la dépendance à plusieurs drogues, ainsi que pour traiter la douleur neuropathique (267, 268). Plus récemment, il a été suggéré que le récepteur GABA_B pourrait être ciblé pour traiter certains types de cancer (269). À ce jour, les ligands de GABA_B sont peu utilisés en clinique, car ils causent des effets secondaires majeurs, particulièrement au niveau de la relaxation musculaire, qui n'est pas un effet désiré pour des traitements de santé mentale. L'étude des mécanismes de régulation du récepteur ouvre potentiellement la porte à la découverte de cibles pharmacologiques plus spécifiques.

Pharmacologie

Plusieurs ligands du récepteur GABA_B ont été découverts et caractérisés à ce jour, tel qu'illustré dans le tableau 1. De façon générale, les agonistes possèdent une faible affinité pour le récepteur, incluant l'agoniste naturel, le GABA, qui possède un EC₅₀ d'environ 30 µM. Il est suggéré qu'évolutivement, le récepteur n'a pas eu une grande pression sélective pour garder une haute affinité pour le GABA, considérant qu'au sein de la synapse, les concentrations atteintes sont très élevées (270). Le baclofen est le composé le plus souvent utilisé pour activer le récepteur, étant le premier agoniste synthétique, et ayant une bonne sélectivité pour GABA_B en comparaison avec GABA_A.

Les antagonistes classiques de GABA_B, tels le saclofen et le phaclofen, possèdent de très faibles affinités pour le récepteur (EC₅₀ d'environ 100 µM), plus faible que le GABA, ce qui a longtemps compliqué les études *in vivo*. Les antagonistes plus récents possèdent de bien meilleures affinités, et ont contribué au clonage moléculaire du récepteur, particulièrement le CGP64213, qui a été couplé à de l'iode 125 pour faire un composé à haute affinité (K_D = 1.2±0.2 nM) qui peut être couplé à sa cible par photo-affinité (253).

Il est intéressant de noter qu'aucun agoniste inverse n'a été caractérisé à ce jour pour le récepteur GABA_B. Il est possible que le mécanisme de liaison et d'activation du récepteur ne permette pas une forte activation constitutive qui serait nécessaire à l'observation d'agonisme inverse. Aucune pluridimensionnalité de signalisation des ligands n'a été observée à ce jour non plus, pouvant indiquer un mécanisme d'activation au sein du récepteur qui diffère des récepteurs de famille A et B.

Tableau I : Classification des différents ligands du récepteur GABA_B ainsi que leurs affinités respectives (exprimées sous forme de pK_i ou EC50 (-log (nM)))

Classe	Nom	Affinité	Unité	Référence
Agonistes	GABA	4,1 - 6,7	pK _i	(271)
	Baclofen	4,3 - 6,2	pK _i	(271)
	3-APPA	5,2 - 7,2	pK _i	(272)
	3-APMPA	5,1	pK _i	(271)
Antagonistes	saclofen	3,7 - 4,3	pK _i	(271)
	phaclofen	3,9	pK _i	(271)
	CGP 62349	8,5 - 8,9	pK _i	(272)
	CGP 54626A	8,1 - 8,2	pK _i	(272)
	CGP 55845	7,8	pK _i	(271)
	SCH 50911	5,5 - 6,0	pK _i	(272)
	CGP 46381	5,3	pK _i	(271)
	CGP 35348	4,4	pK _i	(271)
Modulateurs allostériques	CGP 7930	6,7	EC50	(273)
	GS 39783	N/D	-	
	BHF 177	N/D	-	
	ADX 71441	N/D	-	

Quelques modulateurs allostériques ont été décrits pour le récepteur GABA_B. Ces molécules se lient à un site de liaison allostérique au sein des domaines transmembranaires de GABA_{B2} et sont en mesure d'augmenter l'amplitude de la signalisation et améliorer l'affinité des agonistes pour le récepteur (274). Il a été suggéré qu'en absence de GABA_{B1}, certains modulateurs allostériques comme le CGP7930 pourraient même posséder une activité agoniste intrinsèque sur GABA_{B2} exprimé en absence de GABA_{B1} (273).

Le récepteur GABA_B est par ailleurs responsable des effets nocifs de l'acide γ -hydroxybutyrique (GHB), molécule présente de façon endogène dans le cerveau, mais aussi utilisé comme drogue illicite lorsque consommé en grande quantité, et nommée «drogue du viol» (275). Les effets nocifs du GHB sont liés à la prise conjointe d'alcool et incluent la perte de mémoire et la perte de conscience. GABA_B possède une faible affinité pour le GHB, qui possède des fonctions d'agoniste et agit donc seulement lorsque pris en forte dose, et ses effets nocifs sont abolis par des antagonistes de GABA_B (276). La concentration physiologique de GHB ne semble pas être en mesure d'activer GABA_B.

De plus, il a été récemment démontré que le récepteur pouvait être directement activé par la liaison des α -conotoxines Vc1.1 et Rg1A provenant du venin des mollusques de type *Conus*, et que cette liaison était déplacée par les antagonistes du récepteur (277).

Liaison du ligand et mécanisme d'activation

Chacune des deux sous-unités GABA_B possède un domaine de type «*Venus Fly Trap*» (VFT) extracellulaire, mais seulement celui de GABA_{B1} est en mesure de lier les ligands du récepteur (80). Il semble que cette fonction ait été acquise il y a longtemps dans l'évolution du récepteur, car la composition en acides aminés du VFT de GABA_{B2} n'est pas conservée, même chez les espèces près de l'*homo sapiens* (278). Le VFT de GABA_{B1} comporte deux lobes globulaires, et le site de liaison se retrouve entre les deux lobes. La liaison d'un agoniste se fait principalement par le contact du groupement carboxylate du GABA avec la cystéine 245, la sérine 246 et la glycine 267 du lobe I, ainsi que la tyrosine 366 du lobe II, tandis que le groupement amine interagit avec la tyrosine 395 et le glutamate 465 du lobe II (voir figure 16). Ces interactions permettent au lobe I de se refermer sur le lobe II, stabilisant ainsi le récepteur dans sa forme active (voir figure 17). Au contraire, la liaison d'un antagoniste bloque les deux lobes dans une conformation ouverte. Le VFT de GABA_{B2}, même s'il n'est pas en mesure de lier de ligand, interagit avec celui de GABA_{B1} et augmente l'affinité des agonistes pour le récepteur par un facteur de 10 (279). Le GABA a aussi besoin de la présence d'un ion Ca²⁺ dans le site de liaison pour posséder son affinité maximale (280). Les agonistes synthétiques (et les antagonistes) ne nécessitent pas la liaison du calcium.

Des études de mutagenèse dirigée ont permis de démontrer que la simple fermeture du VFT est capable à elle seule d'activer le récepteur. En effet, la création d'un pont disulfure

entre le lobe I et le lobe II du VFT de GABA_{B1} rend le récepteur constitutivement actif et insensible aux ligands, autant pour le GABA que pour les antagonistes (281). Un traitement au DTT, agent réducteur, retransforme le récepteur en mode inactif et le rend de nouveau sensible au GABA.

Une fois l'agoniste dans son site et le VFT refermé sur lui-même, le mécanisme précis d'activation des domaines transmembranaires n'est pas encore bien élucidé, mais il semble que la nouvelle conformation des domaines extracellulaires induit un changement conformationnel au sein des TM, ce qui induit l'activité GEF de la sous-unité GABA_{B2} (282).

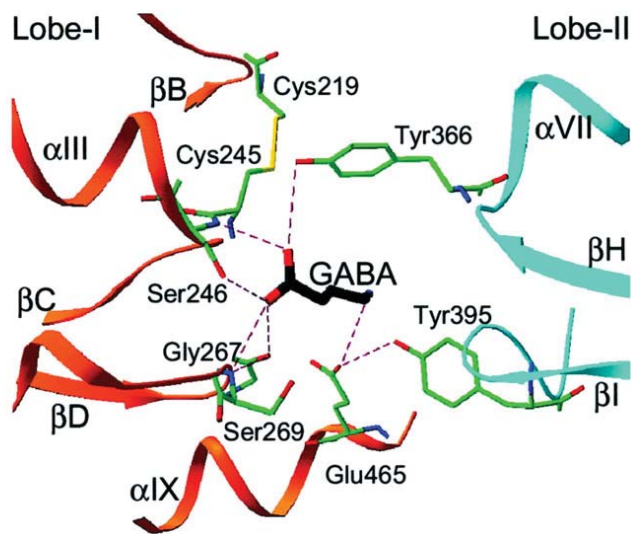


Figure 16 : Modèle structural de la liaison du GABA au domaine extracellulaire de GABA_{B1}. Adapté de (278).

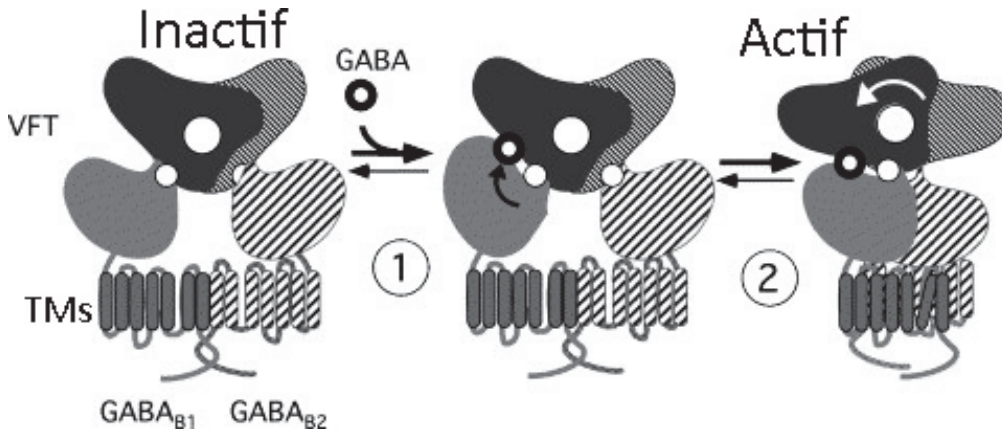


Figure 17 : Modèle d'activation du récepteur GABA_B et transition de l'état inactif à l'état actif avec réarrangement des domaines extracellulaires. 1. La liaison du GABA permet la fermeture du VFT de GABA_{B1}. 2. Une fois le GABA lié et le VFT refermé, un réarrangement se produit au sein des domaines extracellulaires et transmembranaires des deux sous-unités menant à la forme active du récepteur. Adapté de (283)

Signalisation

Le récepteur GABA_B est couplé aux protéines G de la famille $G_{\alpha_{i/o}}$, et est donc en mesure d'inhiber la production d'AMPc. On sépare généralement sa signalisation selon sa localisation synaptique (voir figure 18). Le récepteur postsynaptique est responsable de l'ouverture des canaux de la famille Kir3.1 (GIRK), qui sont des canaux potassiques rectifiants entrants (284). L'activation de ces canaux se fait par l'entremise de la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G. Ces canaux sont responsables de l'entrée de potassium de l'extérieur du neurone vers le cytoplasme, ce qui provoque une hyperpolarisation de la membrane. Le récepteur présynaptique régule quant à lui la relâche de neurotransmetteur en inhibant les canaux calciques voltage dépendants (285, 286) et en modulant directement l'arrimage des vésicules à la synapse par inhibition de la production d'AMPc (287). Cet arrimage est favorisé par l'activation d'EPAC2, un GEF dépendant de l'AMPc, qui agit conjointement avec la calmoduline pour faciliter l'arrimage des vésicules.

Quelques autres voies de signalisation ont également été suggérées pour GABA_B. Le récepteur semble être en mesure d'activer la relâche de calcium dans les astrocytes, par l'entremise d'une activation de la PLC β (288). Il a été suggéré que le récepteur est en mesure d'activer la transcription de gènes par interaction directe avec le facteur de transcription ATF4

(289). La transactivation du récepteur à l'IGF-1 a aussi été proposée comme un mécanisme d'activation de la voie anti-apoptotique d'Akt par le récepteur GABA_B (voir figure 19), menant à un mécanisme de neuroprotection observé dans des neurones du cortex (290). Il a récemment été suggéré que GABA_B est en mesure d'inhiber la composante calcique des récepteurs NMDA du glutamate, par un mécanisme impliquant l'activation post-synaptique de PKA (291).

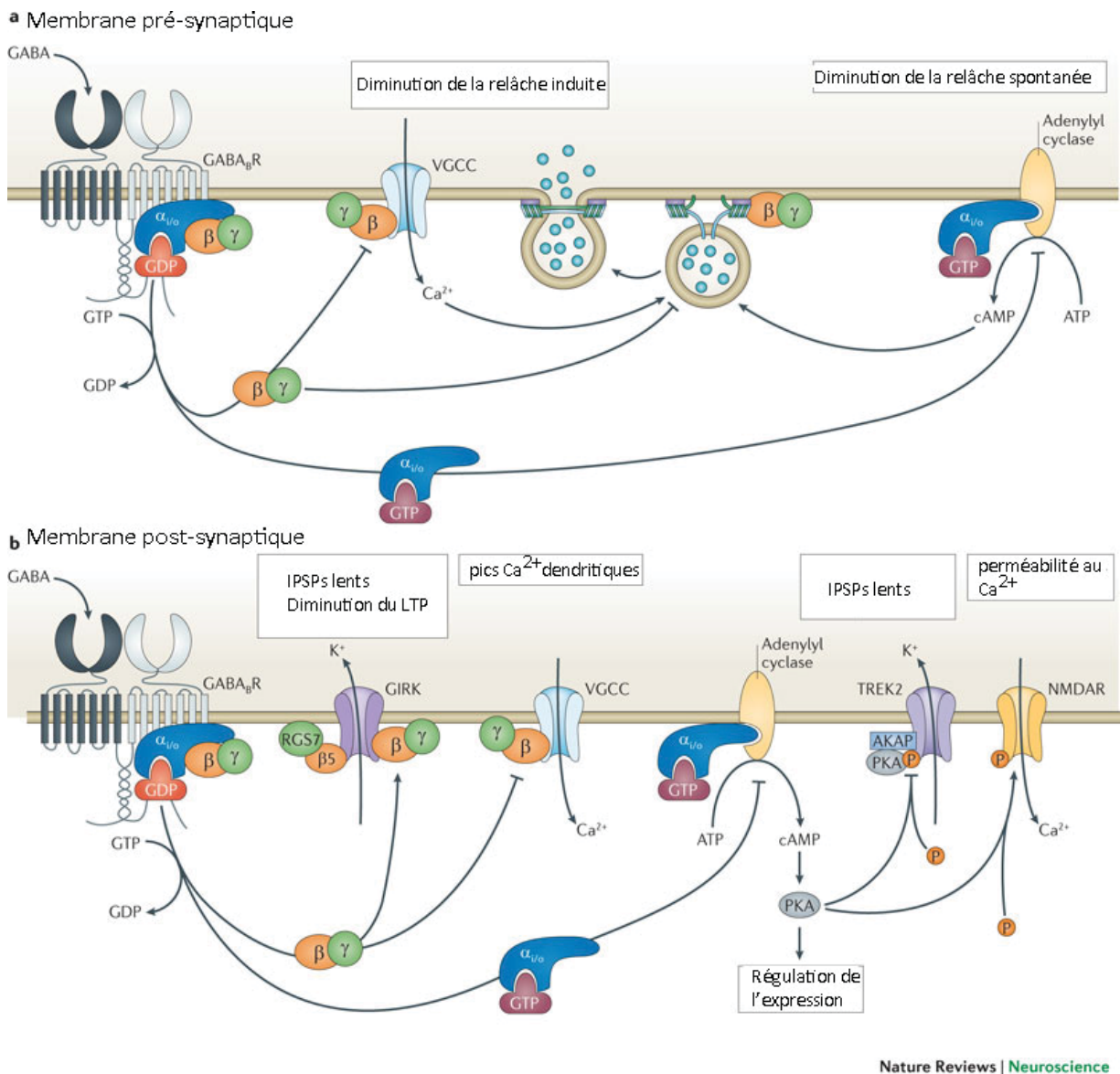


Figure 18 : Signalisation présynaptique (a) et postsynaptique (b) du récepteur GABA_B. Adapté de (292)

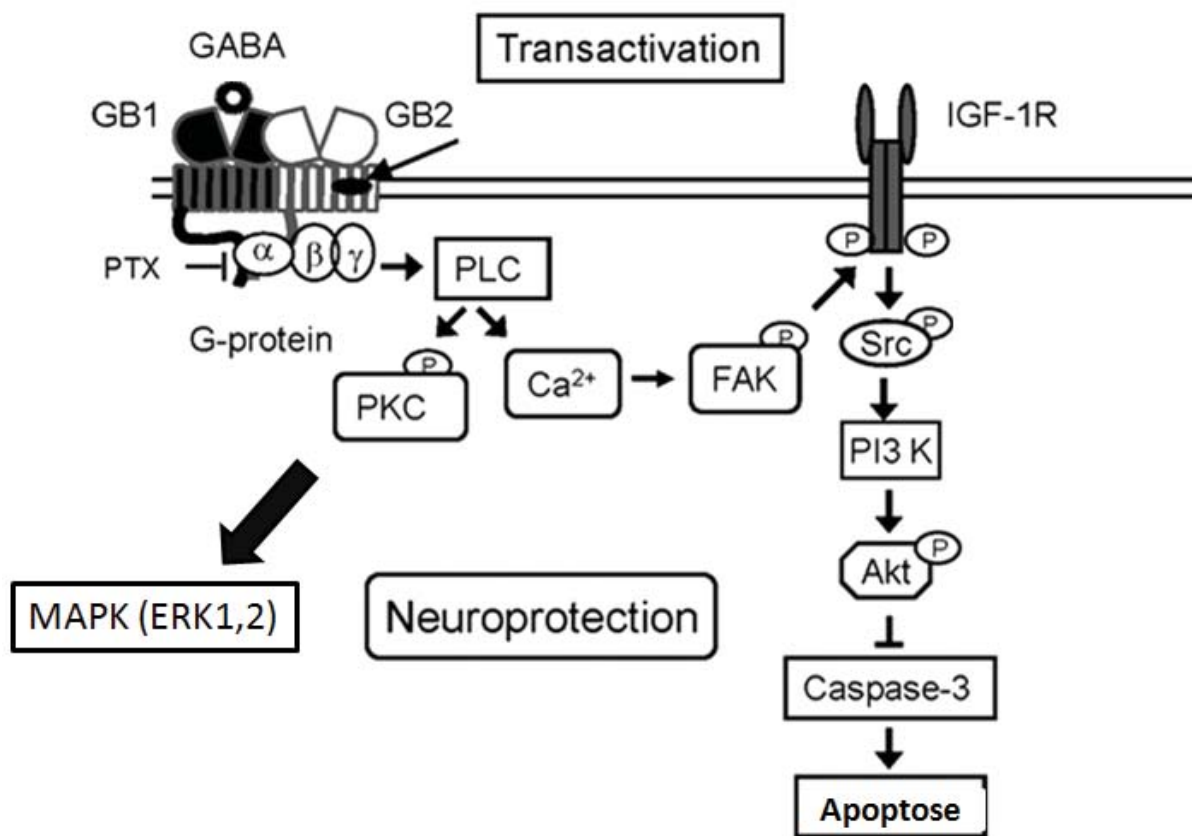


Figure 19 : Mécanisme de transactivation du récepteur IGF-1R par l'activation du récepteur GABA_B, menant à la neuroprotection par activation d'Akt, tel qu'observé dans des neurones isolés du cortex cérébral. Adapté de (290).

Trafic du récepteur

Le récepteur GABA_B est régulé de façon prépondérante par le contrôle de son trafic vers la membrane plasmique, tel qu'on peut le voir à la figure 20. En effet, la sous-unité GABA_{B1} possède un site de rétention de type R-X-R à la suite de la région *coiled-coil* dans son domaine carboxyl-terminal (293). Ce site permet l'interaction du récepteur avec le complexe de transport rétrograde COPI (coat protein I) lorsque le récepteur arrive au niveau du réseau Golgi (2). COPI interrompt donc le transport vers la membrane pour plutôt ramener GABA_{B1} vers le RE. La dimérisation de GABA_{B1} avec GABA_{B2} permet la formation du domaine *coiled-coil* des queues carboxyl-terminales, ce qui masque le signal de rétention et

permet le transport du récepteur vers le réseau trans-Golgi. Certains chercheurs ont proposé que des protéines de la famille 14-3-3 pouvait réguler le transport au niveau de ce site, car ils peuvent lier le récepteur directement au niveau de la séquence R-S-R-R (294). Cependant, les évidences expérimentales semblent suggérer que la perte de l'interaction avec 14-3-3 ne modifie pas le trafic du récepteur (2). Un deuxième site de rétention de type dileucine est présent en amont du motif R-S-R-R, au tout début du *coiled-coil* (295). Ce motif permet l'interaction avec la protéine Msec7-1, un facteur d'échange GTP : GDP des petites protéines G de la famille ARF, impliquée dans le transport vésiculaire. Cette interaction diminue la quantité de récepteurs acheminés à la membrane plasmique, et semble le bloquer au niveau du réseau Golgien.

Le récepteur GABA_B, comme la majorité des récepteurs à 7TM, peut être glycosylé sur ses deux sous-unités. Certains RCPG nécessitent la présence des polysaccharides pour le bon repliement et le transport membranaire (296), mais le retrait de l'ensemble des sites de glycosylation de GABA_{B1(b)} ne semble pas modifier son activité ni son transport à la membrane (270). Cependant, le récepteur non-glycosylé semble perdre un peu d'affinité pour le GABA.

Une distinction importante existe au niveau du transport cellulaire du récepteur selon l'identité de la sous-unité GABA_{B1}. En effet, le récepteur GABA_{B(1a-2)} est activement transporté vers l'axone pour exercer son rôle présynaptique, tandis que le récepteur GABA_{B(1b-2)} semble dans son cas plutôt être transporté de façon passive vers les membranes somatodendritiques (297). La présence des domaines *sushi* présents sur GABA_{B1(a)} est nécessaire à ce mécanisme de ciblage (298). La seule protéine d'interaction connue à ce jour pour les domaines sushis de GABA_{B1(a)} est la fibuline-2, une protéine de la matrice extracellulaire (299), et il semble peu probable que cette interaction soit celle dictant le ciblage, considérant que la perte de l'interaction n'affecte pas le transport vers l'axone du dimère GABA_{B(1a-2)}. Le mécanisme moléculaire précis de ce ciblage reste donc toujours à déterminer.

Il a été suggéré qu'en plus de l'association entre les sous-unités du récepteur lui-même, des interactions avec d'autres protéines pourraient moduler le transport du récepteur. Premièrement, la sous-unité GABA_{B1} peut s'associer à la sous-unité γ 2S du récepteur GABA_A (1), ce qui permet son transport à la surface en absence de GABA_{B2}. Cependant, aucune

activité fonctionnelle n'était associée à ce complexe. Il a aussi été suggéré que le dimère $GABA_{B(1a-2)}$ pouvait interagir avec le facteur de transcription CHOP, menant à une diminution de son expression à la surface (300). Cet effet ne serait pas détectable sur le dimère $GABA_{B(1b-2)}$, car la protéine CHOP n'y a pas d'interaction.

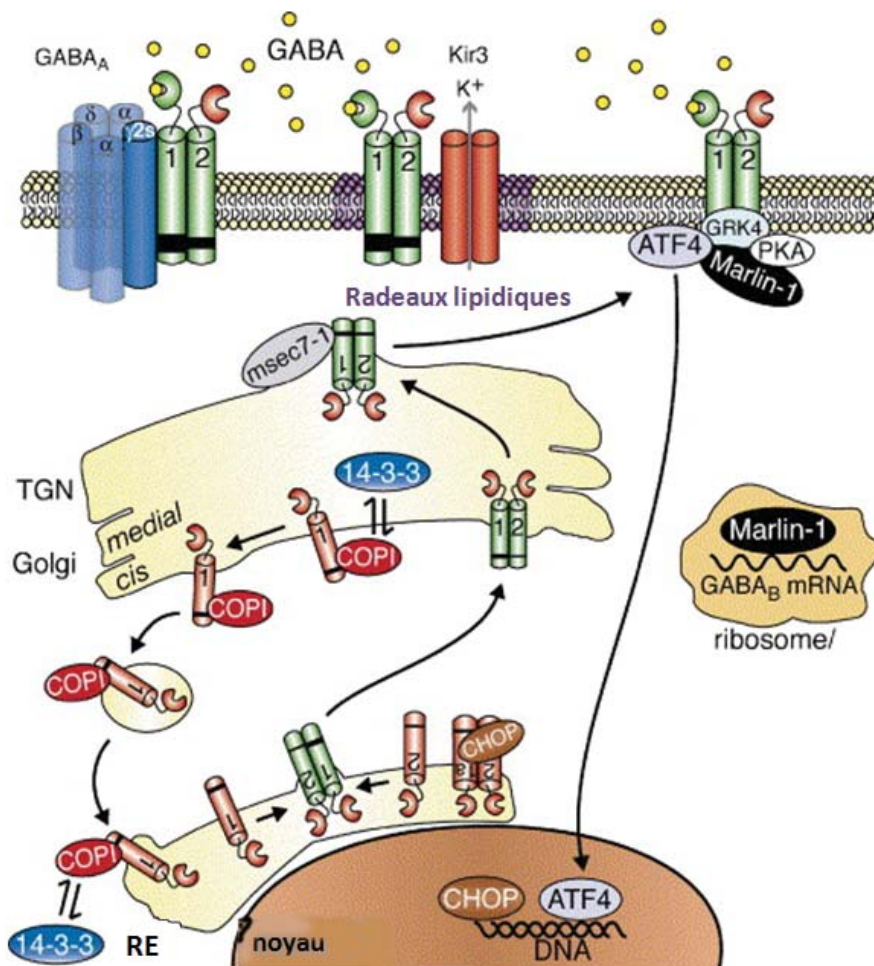


Figure 20 : Schéma des différents mécanismes de régulation du trafic du récepteur $GABA_B$ vers la membrane régulée par COPII et msc7-1, ainsi que ses interactions avec diverses protéines régulant la transcription (CHOP, ATF4), la traduction (Marlin-1) et sa signalisation (GRK4, PKA, Kir3.1). Adapté de (297).

Modulation de la signalisation et interactome

Contrôle de l'activité du récepteur GABA_B par interactions protéiques

Les mécanismes connus de désensibilisation du récepteur GABA_B semblent assez différents de ceux observés pour les RCPG classiques. En effet, le récepteur est déjà fortement phosphorylé à l'état basal et sa phosphorylation ne semble pas augmenter suite à une stimulation par l'agoniste (301). De plus, le récepteur n'est pas en mesure de recruter la β -arrestine et n'est pas internalisé de façon dépendante de l'agoniste (302, 303).

Un mécanisme connu de désensibilisation du récepteur nécessite la présence de GRK4. Contrairement aux mécanismes typiques liés à la désensibilisation dépendante des GRK, le domaine kinase de GRK4 n'est pas nécessaire et aucune évidence de phosphorylation et d'internalisation en réponse à l'agoniste n'est observée (304). Le domaine RGS de la protéine semble être suffisant à cette désensibilisation. Cependant, la protéine GRK4 à elle seule ne peut pas supporter l'ensemble des phénomènes de désensibilisation physiologiquement importants, car son patron d'expression chez l'humain est limité lorsque comparé à celui de GABA_B (305). Il a été observé que GRK5 pouvait interagir avec le récepteur, mais aucune évidence de son rôle dans la désensibilisation n'a été apportée (306). Le mécanisme précis de désensibilisation dans le cas de GRK4 n'est pas caractérisé.

Dans un mécanisme possiblement similaire à celui observé pour GRK4, l'activité du récepteur peut être modulée par son interaction avec la protéine RGS4 (307). Cette interaction semble remodeler le complexe récepteur-protéine G, car elle permet d'accélérer les propriétés d'activation de la protéine G, mais aussi de fortement accélérer la désactivation de la protéine G. L'association de RGS4 semble donc en mesure de moduler les propriétés de couplage de la protéine G_i, favorisant un mécanisme d'activation et d'inactivation rapide en réponse au GABA. Il est possible que d'autres protéines de la famille RGS puissent réguler l'activité du récepteur, mais qu'elles ne soient toujours pas caractérisées.

L'activité du récepteur GABA_B, mesurée par son activation des canaux Kir3.1, peut aussi être régulée par l'interaction directe de GABA_{B2} avec des protéines de la famille KCTD (308, 309). KCTD12a et KCTD12b sont en mesure d'accélérer la désensibilisation du

récepteur en réponse à une stimulation soutenue par le GABA, tandis que KCTD8 et KCTD16 interagissent eux aussi avec le récepteur, mais n'ont pas d'effet sur la désensibilisation (310). Le mécanisme moléculaire précis sous-tendant ce phénomène n'est pas encore élucidé.

Modifications post-traductionnelles de GABA_B

Malgré l'absence de phosphorylation dépendante des GRK, plusieurs autres kinases sont responsables de réguler l'activité de GABA_B par modification post-traductionnelle. En premier lieu, la PKA est responsable de la phosphorylation de la sérine 892 de GABA_{B2} (311). La désensibilisation des courants potassiques provenant des canaux Kir3.1 est retardée par la phosphorylation de la sérine 892, entraînant donc une forme de sensibilisation du récepteur à son effecteur. Le récepteur GABA_B étant couplé à la protéine G_i, il diminue la production d'AMPC et a donc un rôle inhibiteur sur la PKA, diminuant ainsi sa propre phosphorylation et favorisant la désensibilisation des courants potassiques. De plus, la stabilité du récepteur à la membrane semble améliorée par cette phosphorylation dépendante de la PKA.

La kinase AMPK est quant à elle responsable de la phosphorylation d'un site sur chacune des deux sous-unités (312). Recrutée par interaction directe sur GABA_{B1}, elle phosphoryle un premier site sur cette sous-unité, la sérine 917, située dans la région *coiled-coil* de la queue carboxy-terminale. Les conséquences fonctionnelles de cette phosphorylation n'ont pas été caractérisées à ce jour. Étonnamment, lorsque la sérine 917 est mutée, AMPK est en mesure de phosphoryler la sérine 923, située dans le site de rétention au RE. L'importance physiologique de cette observation n'est pas connue. Le site de phosphorylation d'AMPK dans la queue carboxyl-terminale de GABA_{B2}, situé sur la sérine 783, a quand à lui des effets plus clairs. En effet, la phosphorylation de ce résidu semble avoir un effet positif sur le couplage entre le récepteur et les canaux Kir3.1, similaire à ce qui a été observé pour la phosphorylation de la sérine 892 par la PKA. L'atténuation du signal en réponse à des stimulations consécutives est diminuée lorsque le récepteur est phosphorylé. Une étude consécutive a démontré que la sérine 783 phosphorylée serait une cible de la phosphatase PP2A en réponse à l'activation du récepteur au glutamate de type NMDA (313), mais l'effet de la déphosphorylation sur la désensibilisation du récepteur n'a pas été évaluée.

L'activité du récepteur peut aussi être contrôlée via une phosphorylation dépendante de la CaMKII (314). Dans ce cas, l'activation du NMDAR mènerait à l'activation de CaMKII, qui serait en mesure de phosphoryler la sérine 867 sur GABA_{B1}. Cet effet semble spécifique au NMDAR, car d'autres mécanismes de mobilisation du calcium n'ont pas entraîné cette phosphorylation.

Finalement, un dernier site de phosphorylation du récepteur, la sérine 884 de GABA_{B2}, a été découvert dans un criblage protéomique des protéines synaptiques humaines (315). Cependant, aucune autre information n'a été apportée à ce jour sur ce site et sur son importance physiologique. La séquence entourant le site est de type PEST, riche en proline, sérine, thréonine, acide glutamique et acide aspartique, pouvant suggérer un recrutement par une kinase dirigée par les prolines (316). Les séquences PEST étant souvent associées à l'ubiquitination et la protéolyse des protéines les contenant, il est possible que ce site de phosphorylation soit impliqué dans de tels processus (317).

La désensibilisation du récepteur GABA_B est au centre des questions adressées dans cette thèse, et il est donc important de bien comprendre les mécanismes déjà connus de régulation de cette activité. Cette question demeure ouverte, car comme on peut le constater, plusieurs mécanismes ont été proposés, mais aucun n'explique le phénomène de désensibilisation fonctionnelle. Au contraire, la majorité de la phosphorylation observée semble retarder la désensibilisation du récepteur, et n'induit aucun recrutement de la β -arrestine, ni d'internalisation en réponse à l'agoniste. C'est une des raisons pour lesquelles nous allons aussi étudier la régulation du récepteur en absence de stimulation.

Contrôle de l'activité par oligomérisation et localisation membranaire

Tel que mentionné plus haut, il a été démontré que le récepteur GABA_B existait sous forme oligomérique, minimalement sous forme de tétramères comportant deux sous-unités GABA_{B1} (116). Il a été suggéré que la tétramérisation du récepteur serait un frein à son activité, le récepteur semblant être plus actif sous forme de dimère que sous forme de tétramère, ce qui suggère une forme de coopérativité fonctionnelle négative des oligomères de haut niveau (318). Il semble donc que le contrôle de l'oligomérisation du récepteur soit en mesure de moduler son activité, révélant possiblement un type de mécanisme de contrôle de la signalisation.

Le récepteur GABA_B semble aussi pouvoir être présent dans les microdomaines de la membrane plasmique appelés «radeaux lipidiques» (319). Ces domaines sont des régions de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides qui comportent une grande quantité de protéines de signalisation. Contrairement à plusieurs RCPG, GABA_B semble plutôt être moins actif dans les radeaux lipidiques que dans les membranes normales, bien que le mécanisme moléculaire précis n'ait pas été caractérisé (320). Cela suggère donc un mécanisme supplémentaire de contrôle de la signalisation, où le contrôle de la localisation membranaire peut jouer sur la capacité à activer la protéine G.

Endocytose et triage endosomal

Tel qu'indiqué plus haut, le récepteur GABA_B n'est pas internalisé en réponse à une stimulation par son agoniste. Cela peut être partiellement expliqué par l'absence de phosphorylation dépendante des GRK et l'absence de recrutement de la β -arrestine, qui sont généralement les éléments déclencheurs de l'internalisation dépendante des agonistes des RCPG. Cependant, il fut découvert que GABA_B peut être internalisé constitutivement de façon importante, 20 à 40% du récepteur étant retiré de la membrane plasmique en deux heures (303). Le mécanisme d'endocytose constitutif n'est pas encore caractérisé, mais il a été suggéré que le récepteur puisse recruter le complexe AP-2 directement. Sa demi-vie à la membrane plasmique semble faible dans les neurones et dans les cellules HEK293, mais des études précédentes suggéraient une grande stabilité dans les cellules COS-7 (270, 301). Il est possible que certains éléments de régulation ne soient pas exprimés dans certains des types cellulaires, ce qui modifierait la stabilité du récepteur à la membrane plasmique.

Une étude a suggérée que l'interaction directe entre le récepteur GABA_B et la sous-unité γ 2S du récepteur GABA_A pourrait permettre au récepteur d'être internalisé suite à la stimulation avec du GABA dans des cellules HEK293 (1). Il est difficile d'étendre cette conclusion globalement, considérant que ces protéines ont des patrons d'expressions très similaires, mais qu'aucune internalisation dépendante de l'agoniste n'est mesurable dans les neurones (301).

Plusieurs éléments de régulation, incluant la phosphorylation et les interactions protéiques, décrites ci-haut, semblent jouer un rôle sur l'internalisation du récepteur. La phosphorylation par PKA de la sérine 892 de GABA_{B2} stabilise le récepteur à la membrane et

diminue l'internalisation constitutive (311). L'interaction avec la protéine KCTD12 diminue fortement l'internalisation constitutive du récepteur, contrairement aux autres membres de la famille KCTD (321). Il semble aussi, de façon générale, que la sous-unité GABA_{B2} est celle qui régule le taux d'internalisation constitutif (322), probablement en masquant le site dileucine de la sous-unité GABA_{B1}, les motifs dileucines étant associés à l'internalisation des RCPG (157). Malgré l'absence d'internalisation dépendante de l'agoniste de GABA_B, son endocytose est favorisée par la relâche synaptique de glutamate (323). La phosphorylation par CamKII de la sérine 867 de GABA_{B1}, en réponse à l'activation des récepteurs à NMDA semble médier cet effet (314).

Suite à son endocytose, le récepteur GABA_B recycle de façon très efficace en absence de stimulus extérieur (324). La stimulation par le glutamate par l'entremise du NMDAR semble aussi en mesure de réguler le recyclage (325). Dans ce cas, l'entrée de calcium produite par l'activation du NMDAR permet l'activation de PP2A, qui peut déphosphoryler la sérine 783 de GABA_{B2}. Cette déphosphorylation favoriserait la dégradation du récepteur en inhibant le recyclage. La co-activation de GABA_B semble le protéger de cette issue, par un mécanisme encore incompris. Les protéines directement impliquées dans le triage entre le recyclage et la dégradation n'ont pas encore été caractérisées.

L'internalisation du récepteur est un autre des sujets principaux de ma thèse. Considérant la forte internalisation constitutive observée, il est important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent ce phénomène. C'est pourquoi nous avons fait un criblage dans le but d'identifier de nouvelles interactions protéiques pouvant jouer un rôle dans la régulation de la stabilité membranaire du récepteur.

Autres protéines d'interaction et rôles possibles

L'intérêt pharmaceutique apporté au récepteur GABA_B depuis son clonage a mené à une vaste course à la caractérisation du protéome d'interaction du récepteur. Les protéines impliquées dont les rôles ont été caractérisés dans les mécanismes de contrôle de l'activité ont été décrites ci-haut. Voici un résumé des autres interactions identifiées et leurs rôles possibles (voir tableau 2).

Tel que vu auparavant, les régions *coiled-coil* des sous-unités GABA_B s'avèrent très intéressantes d'un point de vue protéomique. Non seulement leur association est nécessaire pour la formation d'un récepteur fonctionnel, mais chacune des sous-unités possède des partenaires d'interactions dans cette région. Plusieurs des protéines identifiées interagissent avec les queues c-terminales en formant une structure *coiled-coil*, et sont donc des protéines rarement associées avec les autres RCPG. Par exemple, les facteurs de transcription ATF4 (CREB2) et ATFx interagissent avec la queue c-terminale de la sous-unité GABA_{B1} (289, 326, 327). Deux rôles potentiels, mais inverses ont été proposés pour cette interaction. Il a été suggéré que l'activation du récepteur permettait l'activation du facteur de transcription ATF4, augmentant l'expression d'un gène rapporteur associé à son promoteur (289). Une autre étude suggère plutôt que le rôle de GABA_B serait de séquestrer ATF4 hors du noyau, le rendant ainsi inactif (327). Cette interaction entre ATF4 et GABA_{B1} semble cependant compétitive à l'interaction avec GABA_{B2}, ce qui complique l'analyse au niveau du rôle sur le récepteur fonctionnel.

La queue c-terminale de GABA_{B2} forme elle aussi une structure *coiled-coil* avec un facteur de transcription, CHOP (300). Lorsque GABA_{B2} est co-exprimé avec GABA_{B1(b)}, il y a perte de l'interaction avec CHOP, car ils partagent le même site d'interaction au niveau du *coiled-coil*. Cependant, l'expression de GABA_{B1(a)} permet quand à elle de conserver l'interaction avec CHOP, cette fois sans interaction du domaine *coiled-coil* à CHOP. Bien que le site d'interaction GABA_{B1(a)}-CHOP n'est pas décrit, les auteurs suggèrent que cela serait dû à un réarrangement des boucles intracellulaires de GABA_{B1(a)} causé par la présence des domaines sushis extracellulaires. Ceci représente un premier exemple connu de différence intracellulaire entre GABA_{B1(a)} et GABA_{B1(b)}. Il est intéressant de noter qu'ATF4 et CHOP sont tous deux impliqués dans les voies de réponses au stress du réticulum endoplasmique (328). En plus, l'expression de CHOP est elle-même régulée par ATF4 (329). Il n'est pas encore déterminé si la rétention de GABA_{B1} peut mener à un stress endoplasmique, mais si c'est le cas, il serait intéressant de revoir ces deux interactions sous cette lumière.

La protéine de liaison à l'ARN Marlin-1 (aussi connue sous le nom de JAMIP) peut elle aussi former une interaction *coiled-coil* avec la sous-unité GABA_{B1}. Dans ce cas aussi, l'interaction est compétitive à GABA_{B2}. Marlin-1 semble posséder deux rôles au niveau du récepteur. Premièrement, elle est en mesure de lier l'ARN messager de GABA_{B2} et semble

pouvoir moduler sa traduction (330). Elle semble aussi être en mesure d'interagir avec le moteur moléculaire kinésine-1 pour lier le récepteur au cytosquelette et pour moduler son transport vésiculaire (331).

Tableau 2 : Protéines d'interactions des sous-unités du récepteur GABA_B, domaines d'interactions et rôles connus ou supposés.

Sous-unité	Protéine d'interaction	Domaine d'interaction	Rôle	Référence
GABA _{B1}	CREB2 (ATF4)	<i>coiled-coil</i> (AA 884-927)	Régulation transcriptionnelle?	(326)
	ATFx	<i>coiled-coil</i> (AA 884-927)	inconnu	(289)
	Marlin-1	queue c-terminale	Transport axonal/liaison ARNm	(330)
	GABA _A γ2S	AA 925-933	Transport/internalisation	(1)
	AMPK	AA 910-925	Phosphorylation	(312)
	COP I	RSRR (AA 923-926)	rétenion dans le RE	(2)
	14-3-3 (η/ζ)	AA 905-928	Régulation de la dimérisation?	(294, 332)
	Msec7-1	LL (AA 890-891)	Transport vers la membrane	(295)
	CaSR	inconnu	rétenion dans le RE ?	(333)
GABA _{B1(a)}	Fibulin1	domaine sushi	Transport vers axone?	(299)
	CHOP	inconnu	Régulation du transport?	(300)
GABA _{B2}	CHOP	<i>coiled-coil</i>	Régulation du transport?	(300)
	MPDZ	AA 938-941	Modulation de la demi-vie?	(334)
	β-filamin	inconnu	inconnu	(335)
	KCTD (12, 12b, 8, 16)	AA 901-906	Sensibilisation/désensibilisation	(308)
	Récepteur M2 muscarinique	inconnu	Inconnu	(336)
	CaSR	inconnu	Inconnu	(333)
	Tamalin	queue c-terminale	Inconnu	(337)
	Hrd1	queue c-terminale	Ubiquitination liée à l'ERAD	(338)
GABA _B	Kir3.1	inconnu	Signalisation	(307)
	GRK4	inconnu	Désensibilisation	(304)
	GRK5	inconnu	Désensibilisation?	(306)
	RGS4	inconnu	Signalisation/Désensibilisation	(307)
	mGluR4	inconnu	Inconnu	(339)

Tel que décrit auparavant, il est aussi connu que 14-3-3 interagit avec le récepteur (294). La liaison de 14-3-3 est généralement reliée à la phosphorylation sous-jacente de son site de liaison, mais dans le cas présent, c'est plutôt le cas contraire, le peptide phosphorylé

n'étant plus en mesure d'interagir avec 14-3-3. Une hypothèse intéressante sur cette interaction a été récemment proposée par le groupe de Landry (332). Les auteurs proposent que la liaison de 14-3-3 ζ soit en mesure de désassembler l'hétérodimère fonctionnel pour abolir son activité. Les données présentées semblent suggérer une capacité à empêcher une interaction fonctionnelle entre les deux récepteurs, mais l'hypothèse du désassemblage dynamique est peu soutenue. Il est intéressant de noter que l'expression de 14-3-3 ζ est fortement augmentée dans les cas de douleurs chroniques, ce qui pourrait affecter l'activité de GABA_B dans ces conditions.

La queue c-terminale de GABA_{B2} interagit quant à elle avec des protéines de fort poids moléculaire, la β -filamine et MPDZ (334, 335). Dans le premier cas, la β -filamine est une protéine interagissant avec l'actine, qui est souvent liée au processus de réorganisation du cytosquelette. Aucun rôle précis de GABA_B dans ces processus n'a été identifié à ce jour, mais le site d'interaction de la β -filamine sur GABA_{B2} chevauche une région importante dans l'ancrage du récepteur à la membrane (340). La protéine MPDZ (aussi connue sous le nom de MUPP-1) possède 13 domaines PDZ et est impliquée dans l'échafaudage de macro-complexes de signalisation. L'interaction de MPDZ à GABA_{B2} est en mesure de moduler la demi-vie du récepteur par un mécanisme encore inconnu. Il est intéressant de noter que MPDZ est impliqué dans l'activation de la CaMKII et l'activation de voies de signalisation MAP Kinases en réponse à l'activation du récepteur NMDA, et pourrait donc contribuer à la régulation croisée entre GABA_B et le NMDAR (341).

Il a aussi été proposé que le récepteur GABA_B peut interagir avec d'autres RCPG pour former différents hétéro-oligomères. Il a été retrouvé comme partenaire avec deux autres récepteurs de la famille C, mGluR4 et CaSR (333, 339). Dans le cas du récepteur mGluR4, il a été suggéré que ce dernier pouvait permettre le trafic à la membrane de GABA_{B1}, mais ne permettait pas la formation d'un hétérodimère fonctionnel. Dans le cas du CaSR, la sous-unité GABA_{B1} est en mesure de le retenir dans le RE, tandis que la sous-unité GABA_{B2} semble plutôt favoriser son transport à la membrane. La coexpression des deux sous-unités ne donne aucun effet supplémentaire, et il ne semble pas y avoir formation d'un complexe oligomérique impliquant les trois récepteurs à 7TM.

Dans une classe différente de RCPG, le récepteur muscarinique M2 a été trouvé comme partenaire d'interaction de GABA_{B2} (336) et cette interaction est en mesure de bloquer

la régulation négative due à une stimulation chronique du récepteur M2 par son agoniste. Aucun effet réciproque n'a été observé sur GABA_B à ce jour.

On peut donc constater que le récepteur GABA_B possède un riche protéome d'interaction, déjà fortement caractérisé. Malgré cela, plusieurs des mécanismes modulant les propriétés de base du contrôle de l'activité de signalisation, soit la désensibilisation, l'internalisation et la dégradation du récepteur, sont encore mal compris. Cette thèse a donc comme objectif d'approfondir ces mécanismes moléculaires par l'identification de nouvelles interactions protéiques.

Objectifs de la thèse

L'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des RCPG est nécessaire à la compréhension de leur fonctionnement et à l'établissement de nouvelles thérapies sélectives. L'objectif général de ma thèse consistait à caractériser des nouveaux mécanismes menant à la régulation du récepteur GABA_B et de sa signalisation par la découverte de nouvelles interactions protéiques.

Depuis son clonage en 1997-1998 (80, 253), le récepteur GABA_B fut le sujet de nombreuses études portant sur la régulation de sa signalisation. Il fut rapidement identifié que le récepteur avait des propriétés anormales pour un RCPG au niveau de ses mécanismes de désensibilisation. Bien que le récepteur semble être désensibilisé par GRK4 dans le cervelet (304), cette dernière a un profil d'expression limité comparativement au récepteur, et n'explique donc pas le comportement du récepteur dans le reste du cerveau. Notre premier objectif était donc d'étudier le phénomène de désensibilisation de GABA_B, et à cette fin, nous avons identifié la phosphorylation par PKC et l'interaction avec la protéine NSF comme étant impliquée dans ce processus.

Nous nous sommes par la suite intéressés à la régulation négative de l'expression du récepteur. GABA_B ne démontre pas de dégradation en réponse à une stimulation par l'agoniste, mais possède néanmoins une très courte demi-vie comparée aux autres RCPG (324). Notre deuxième objectif était donc d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de dégradation du récepteur en absence de stimulation. Nous nous sommes attardés à la régulation du récepteur fonctionnel à la membrane plasmique, et avons découvert que PKC était en mesure de promouvoir l'ubiquitination de GABA_B, et que cette ubiquitination était corrélée avec une dégradation plus rapide du récepteur. De plus, nous avons identifié la déubiquitinase USP14 comme protéine favorisant la dégradation du récepteur.

Finalement, GABA_B démontre des propriétés d'internalisation anormales pour un RCPG, n'étant pas internalisé en réponse à une stimulation par un agoniste, mais étant fortement internalisé constitutivement (303). Les mécanismes régulant cette internalisation constitutive étant encore inconnus, notre troisième objectif était de caractériser de nouvelles interactions protéiques pouvant intervenir dans ce processus. Nous avons identifié la protéine

Grb2 comme interagissant avec la queue carboxyl-terminale de GABA_{B1} et pouvant diminuer l'internalisation constitutive du récepteur.

Résultats

Article 1

Coordinated action of NSF and PKC regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Stéphanie M. Pontier, **Nicolas Lahaie**, Rachel Ginham, Fannie StGelais, Hélène Bonin, David J. Bell, Helen Flynn, Louis-Eric Trudeau, Jeffrey McIlhinney, Julia H White et Michel Bouvier. 2006. Publié dans *EMBO Journal* **25**(12), 2698-2709.

Résumé

L'hétérodimérisation obligatoire du récepteur GABA_B soulève des questions fondamentales sur les mécanismes moléculaires régulant son efficacité de signalisation. Dans cette étude, nous montrons que la protéine de fusion membranaire sensible au NEM (NSF) interagit directement avec l'hétérodimère GABA_B au niveau des synaptosomes et dans des cellules CHO, formant un complexe ternaire qui peut être dissocié par une stimulation avec un agoniste. L'inhibition de la liaison de NSF à GABA_B par un peptide dérivé de GABA_{B2} (TAT-Pep-27) n'affecte pas l'activité de signalisation basale, mais abolit considérablement la désensibilisation promue par un agoniste, autant dans les cellules CHO que dans des tranches d'hippocampe. Considérant aussi le rôle de PKC dans le processus de désensibilisation, nos observations que TAT-Pep-27 prévient le recrutement dépendant de l'agoniste de PKC et la phosphorylation du récepteur suggèrent que NSF est un facteur d'amorce requis pour la désensibilisation de GABA_B. Étant donné que la désensibilisation de GABA_B n'inclut pas d'internalisation du récepteur, l'action coordonnée de NSF et PKC suggère que NSF peut réguler l'efficacité de signalisation des RCPG indépendamment de son rôle sur le trafic membranaire. L'interaction fonctionnelle entre trois régulateurs importants de la relâche de neurotransmetteurs, tels que GABA_B, NSF et PKC, pourrait apporter de nouvelles hypothèses sur l'action présynaptique de GABA_B.

Contribution : J'ai contribué à une partie substantielle de la génération des résultats, incluant le design expérimental des expériences de phosphorylation (en coordination avec S. Pontier) et

l'expérimentation complète, ainsi qu'une implication importante pour le design et l'expérimentation des expériences de mesure de l'activité du récepteur et de désensibilisation par mesure de $GTP\gamma^{35}S$. J'ai aussi participé à l'expérimentation dans les expériences de co-immunoprécipitation, ainsi qu'aux discussions et aux idées en ce qui a trait à la génération du modèle proposé. J'ai revu le manuscrit avant soumission, sans cependant en être l'auteur principal.

Coordinated action of NSF and PKC regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Stéphanie M. Pontier¹, Nicolas Lahaie¹, Rachel Ginham², Fannie StGelais³, Hélène Bonin¹, David J. Bell⁴, Helen Flynn⁴, Louis-Eric Trudeau³, Jeffrey McIlhinney², Julia H White⁴ and Michel Bouvier^{1,5}

¹*Département de Biochimie and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Institut de recherche en immunologie et Cancérologie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.*

²*Medical Research Council Anatomical Neuropharmacology Unit, University Department of Pharmacology, University of Oxford, Mansfield Road, Oxford, OX1 3TH, UK*

³*Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.*

⁴*Pathway Discovery, Genomics and Proteomic Sciences, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Gunnels Wood Road, Stevenage, UK.*

⁵*To whom correspondence should be addressed: email: michel dot bouvier at umontreal dot ca*

Running title: *NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy*

Key words: GABA_B/ heterodimer/ NSF/ PKC/ desensitization

Subject categories: Signal transduction

Character count: 54675

Abstract

The obligatory heterodimerization of the GABA_B receptor (GBR) raises fundamental questions about molecular mechanisms controlling its signaling efficacy. Here, we show that NEM sensitive fusion (NSF) protein interacts directly with the functional GBR heterodimer both in rat brain synaptosomes and heterologous expression system, forming a ternary complex that can be regulated by agonist stimulation. Inhibition of NSF binding with a peptide derived from GBR2 (TAT-Pep-27) did not affect basal signaling activity but almost completely abolished agonist-promoted GBR desensitization in both CHO cells and hippocampus slices. Taken with the role of PKC in the desensitization process, our observation that TAT-Pep-27 prevented both agonist-promoted recruitment of PKC and receptor phosphorylation suggests that NSF is a priming factor required for GBR desensitization. Given that GBR desensitization does not involve receptor internalization, the concerted action of NSF and PKC revealed herein suggests that NSF can regulate GPCR signalling efficacy independently of its classical role in membrane trafficking. The functional interaction between three *bona fide* regulators of neurotransmitter release, such as GBR, NSF and PKC could shed new light on the modulation of GBR action at presynaptic sites.

Introduction

Ionotropic and metabotropic receptors mediate the action of the inhibitory neurotransmitter γ -amino-butyric acid (GABA) in the central nervous system. The metabotropic GABA_B receptor (GBR) consist of an obligatory heterodimer between two homologous seven transmembrane domain (7TM) receptors, known as GBR1 and GBR2 (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; Kuner et al., 1999; White et al., 2000). In addition to play a role in ER export (Couve et al., 1998; Margeta-Mitrovic et al., 2000), the GBR1/GBR2 heterodimerization is required for the formation of a functional receptor. Indeed, while only GBR1 can bind GABA, GBR2 appears to be the subunit engaging the heterotrimeric G protein for downstream signaling (Galvez et al., 2001; Robbins et al., 2001; Margeta-Mitrovic et al., 2001). Such transactivation across two distinct 7TM receptors raises fundamental questions about the molecular mechanisms controlling their signaling efficacy.

Among the mechanisms controlling 7TM receptor activity, agonist-promoted desensitization is one of the best characterized at the molecular level. As for most receptors, sustained stimulation of GBR can lead to functional desensitization (Couve et al., 2002; Gonzalez-Maeso et al., 2003; Perroy et al., 2003; Tosetti et al., 2004). However, β arrestin recruitment to the receptor and the ensuing endocytosis of the complex, which are classically associated to agonist-promoted desensitization, do not appear to contribute to the regulation of GBR responsiveness (Perroy et al., 2003; Fairfax et al., 2004). We recently reported that a phosphorylation-independent mechanism involving the G protein receptor kinase 4 (GRK4) can regulate GBR activity in the cerebellum (Perroy et al., 2003). However, the restricted expression pattern of GRK4, mainly found in testes and cerebellum (Sallese et al., 2000; Virlon et al., 1998), suggests that other mechanisms may modulate GBR signaling efficacy in other tissues. There is in fact multiple evidences that different desensitization mechanisms may be at work since distinct desensitization and phosphorylation profiles were reported for

different cellular systems (Couve *et al.*, 2002; Gonzalez-Maeso *et al.*, 2003; Tosetti *et al.*, 2004). These discrepancies between different systems are most likely due to the relative expression levels of different protein partners that can influence receptor signaling efficacy. Among other factors, PKC activation has previously been shown to regulate GBR activity (Dutar and Nicoll, 1988; Thompson and Gahwiler, 1992), however its direct role in agonist-promoted desensitization has not been documented yet.

In an effort to identify new proteins that could regulate receptor function, we performed a yeast two-hybrid screen using the GBR2 carboxyl tail (c-tail) as bait that revealed the N-ethylmaleimide (NEM) sensitive fusion (NSF) protein as a potential interacting partner. NSF belongs to the “ATPase Associated to various cellular Activities” (AAA ATPase) family and is classically devoted to the regulation of protein-protein interactions that support membrane fusion and trafficking events (Whiteheart and Matveeva, 2004). In this context, it promotes the dissociation of soluble NSF-associated protein receptor (SNARE) complexes that control fusion specificity via appropriate coiled coil interactions. Such an uncoiling activity of NSF is of particular interest when considering its interaction with GBR since the receptor’s carboxyl tails are engaged in a coiled-coil interaction within the GBR1/GBR2 heterodimer (Kammerer *et al.*, 1999; White *et al.*, 1998).

In addition to the established role of NSF in controlling the assembly/disassembly of SNARE complexes, its direct interaction with cell surface receptors such as the AMPA receptor (Nishimune *et al.*, 1998; Osten and Ziff, 1999), the β_2 -adrenergic (β_2 AR) receptors (Cong *et al.*, 2001), the dopaminergic receptors (Heydorn *et al.*, 2004) and the adrenomedulin receptor (Bomberger *et al.*, 2005) has been reported. In the three cases where the functional consequences were characterized, NSF binding was proposed to modulate the post-endocytic sorting of these receptors (Hanley *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Noel *et al.*, 1999; Cong *et al.*, 2001; Bomberger *et al.*, 2005). Given that GBR does not undergo rapid agonist-promoted

internalization in any of the systems tested (Perroy *et al*, 2003; Fairfax *et al*, 2004), we sought to investigate further the interaction between NSF and GBR and its potential role in regulating receptor function.

Results

NSF interacts directly with GBR subunits

A yeast two-hybrid screen (YTH) was performed with both GBR1 and GBR2 full length c-tails (⁸⁶⁰I-⁹⁶¹K and ⁷⁴¹I-⁹⁴¹L respectively) against a human brain cDNA library. In addition to the complementary GBR subunit (White et al., 2002) and the transcription factor ATFx/CREB2 (White et al., 2000), we found NSF as a potential binding partner of GBR2 (Fig. 1). Using shorter segments of the carboxyl domain, the interacting region was narrowed down to the distal part of the GBR2 coiled-coil domain and more specifically to a 27 amino acid peptide encompassing residues 799-825 (Pep27). As previously observed for the interaction between GluR2 and NSF (Nishimune et al., 1998), the integrity of the full length AAA ATPase appeared essential for its association with the receptor c-tail. Indeed, none of the truncation mutants of NSF tested could bind to the receptor c-tail (data not shown).

To further characterize the interaction between NSF and the GBR2 c-tail, we carried out *in vitro* binding assays using the receptor c-tail fused to a Glutathione-S-transferase (GST) protein and purified His₆-tagged NSF. GST pull-down performed with increasing amount of NSF in the presence of non-hydrolysable ATP γ S (to inhibit NSF ATPase activity) demonstrated a direct interaction between NSF and the full length GBR2 c-tail (Fig. 2A). As can be seen in the right panel of Fig. 2A, the binding of NSF to GBR2 c-tail tends to saturate at ~ 50 nM, reaching half saturation at 15nM thus indicating a relatively high affinity of NSF for the receptor. The nucleotide dependence of the NSF binding was then determined (Fig. 2B) by evaluating the impact of ATP and ATP γ S under different salt conditions. Conditions favoring the ATPase activity of NSF (ATP and Mg²⁺) disrupted the association whereas its inhibition (ATP γ S + Mg²⁺, ATP + EDTA or ATP + Mg²⁺ + EDTA) favored the interaction with the GBR2 c-tail (Fig. 2B). Such influence of the nucleotide-bound state of NSF is reminiscent of other functionally relevant interactions involving NSF (Osten et al., 1998;

Hanley et al., 2002; Muller et al., 2002; Sollner et al., 1993). Consistent with YTH data presented above, the Pep27 region of the coiled-coil domain of GBR2 was sufficient to sustain NSF binding as shown by the efficient pull-down of NSF by a GST-Pep27 fusion protein (Fig. 2C). Interestingly, the Pep27 was as efficient as a previously described 10 amino acid peptide corresponding to the NSF binding site on GluR2 (Pep2m) (Lee et al., 2002; Nishimune et al., 1998; Osten et al., 1998; Song et al., 1998). In contrast to the results obtained in the YTH experiments, however, the binding of NSF was not found to be restricted to the GBR2 c-tail, and the full length GBR1 c-tail (^{854}I - ^{961}K) fused to GST also bound selectively to NSF, reaching binding levels comparable to those detected with the GBR2 c-tail (Fig. 2D).

Such partial discrepancy between YTH and GST pull-down experiments is not unusual, nevertheless, to clarify whether the GBR1 could truly interact with NSF and to confirm that the interaction between GBR2 and endogenous NSF can occur in living cells, immunoprecipitations were performed in CHO cells. Immunoprecipitating the GBR1 or GBR2 from cell expressing each of the receptor individually led to the co-sedimentation of NSF (Fig. 3A-B). In the reverse configuration, NSF immunoisolation revealed that the ATPase bound to two molecular species of GBR2 (Fig. 3B), corresponding to the ER-localized core-glycosylated precursor (~100kDa) and fully processed (~120kDa) forms of the receptor (Supplementary data, Fig. S1). NSF interaction with these two GBR2 populations suggests that the ATPase binds to distinct GBR2 species along the maturation path from the ER to the plasma membrane. In the case of GBR1, which cannot reach the cell surface and is retained in the ER when expressed alone (Couve et al., 1998), co-immunoprecipitation with NSF implies that the interaction between these two molecules occurs in the ER. Taken together, these data may indicate that, as has been previously suggested for other plasma

membrane protein (Hanley et al., 2002; Noel et al., 1999; Shi et al., 2001; Cong et al., 2001), NSF could be involved in the transport of GBR to the cell surface.

In agreement with the importance of the nucleotide binding state of NSF found in the GST-pull-down experiments, the functionality of the NSF ATPase was found to be essential for its interaction with both GBR1 and GBR2 since a treatment with the alkylating agent, N-ethylmaleimide (NEM, 1mM for 5min at 37°C), inhibited their co-immunoprecipitation with NSF (data not shown).

The active form of the GBR associates with NSF

To determine if, in addition to its ability to interact with each receptor subtype individually, NSF can also bind to the functional GBR1/GBR2 heterodimer, we compared the amount of NSF co-immunoprecipitated with GBR1 in cells expressing or not the GBR2 subtype. Equivalent amount of NSF were recovered in both conditions (Fig. 3C: lanes 5 and 6), suggesting that GBR1/GBR2 heterodimerization did not interfere with the NSF/GBR1 interaction. To confirm the existence of a NSF/GBR1/GBR2 ternary complex, we took advantage of the fact that GBR1 can be trafficked to the cell surface only in association with GBR2 (White et al., 1998). Hence, co-sedimentation of NSF following cell surface immunoprecipitation of GBR1 would indicate that at least part of the GBR interacting with NSF correspond to the GBR1/GBR2 heterodimer. As shown in figure 3C (lanes 7 and 8), both NSF and GBR2 were co-precipitated with cell surface GBR1, suggesting the binding of the GBR active population to NSF. The occurrence of such an interaction between the functional heterodimer and NSF was also confirmed *in vivo*. Indeed, mass spectrometry analysis of the protein complex co-sedimented with GBR1 following its immunoprecipitation from rat brain synaptosome extracts revealed the presence of NSF (Supplementary data, Table 1).

To confirm the specificity of interaction between NSF and GBR, we assessed the ability of the Pep27 peptide to inhibit the association of NSF to GBR2 in cell co-expressing GBR1 and GBR2. For this purpose, we inserted a HIV TAT sequence (that allows the diffusion of the hybrid protein through the plasma membrane; (Becker-Hapak et al., 2001)) attached to a HA epitope within the GST-Pep27 protein in order to generate a GST-TAT-HA-Pep27 (TAT-Pep27) fusion protein. The ability of this peptide to penetrate plasma membrane was confirmed by immunofluorescence using an anti-HA antibody (data not shown). As expected for a specific interaction, treatment performed with the TAT-Pep27 abolished the NSF/receptor association (Fig. 3D) whereas a treatment with a GST-TAT-HA-random sequence peptide (TAT-RSP) had no effect. Interestingly a GST-TAT-HA-Pep2m protein also impaired NSF co-precipitation with the receptor, indicating that GluR2- and GBR2-derived peptides share a unique binding site on NSF.

Classically, NSF is described as a soluble cytoplasmic protein (Morgan et al. 2004). To further document a possible interaction between GBR and NSF at the cell surface, their co-localization was assessed using confocal immunofluorescence microscopy. For this purpose, cells expressing GBR1 and GBR2 (Fig. 4A) were first labeled using antibodies directed against the N-terminal epitopes displayed by each of the receptor (myc for GBR1 (panel a) and HA for GBR2 (panel b)). Following extensive washing, cells were then permeabilized and NSF labeled with a specific antibody (panel c). As can be seen in the overlay panels d, e and f, both GBR1 and GBR2 (that were as well co-localizing; panel d) are detected in close apposition with NSF at the plasma membrane as illustrated by the co-localization signal in magenta (panel e) and yellow (panel f) respectively. Similar results were obtained using green fluorescent protein-tagged-NSF (avoiding the need for permeabilization) indicating that the co-localization between NSF and both receptors did not result from a permeabilization artifact (data not shown). This co-localization did not result from a massive

redistribution of NSF upon expression of the GBR since the extent of co-localization between NSF and GFP-GRK5, a protein that is constitutively associated to the plasma membrane (Thiyagarajan et al., 2004), was not noticeably affected by the presence of GBR1 and GBR2 (supplementary figure 2). This indicates that the association between NSF and GBR may occur in specialized domains of the plasma membrane.

To confirm that co-localization of GBR and NSF can occur in native tissue, we examined the sub-cellular localization of GBR2 and NSF in primary cultures of rat brain cortical neurons. Co-localized immunoreactivity for GBR2 and NSF was observed in both neuronal cell bodies (Fig. 4B, panels a-f) and dendritic extensions (Fig. 4B, panels a-i) where they display a punctuated labeling pattern (white arrows). This is reminiscent of the co-localization between NSF and GluR2 AMPA receptor previously observed at the synaptic junctions of hippocampal neurons (Song et al., 1998).

GBR activation destabilize the NSF/heterodimer complex

Since NSF was found to bind to the GBR1/GBR2 heterodimer at the cell surface, we wondered if activation of the receptor could modulate this association. As shown in Fig. 5A, stimulation with GABA promoted the disruption of the ternary complex, as indicated by the time-dependent decrease in the amount of NSF co-immunoprecipitated with GBR1. This effect of GABA was mimicked by the selective GBR agonist, baclofen, (Fig. 5B). The pharmacological selectivity of the GABA action is further supported by the observation that the level of co-immunoprecipitated NSF with GBR2 expressed alone (the subunit that does not bind agonists) was insensitive to agonist pre-incubation (Fig. 5C). In contrast, the agonist effect was recovered when GBR2 was expressed with GBR1 (the subunit harboring the GABA/baclofen binding site) (Fig. 5C). Interestingly, similar results were obtained whether GBR2 was co-expressed with GBR1a or GBR1b, two common splice variants of GBR1. In

addition to confirm that NSF is associated with the functional GBR1/GBR2 heterodimer at the cell surface where GABA can act, these results laid the foundation to explore the potential functional implications of this interaction.

Preventing NSF binding preserves the GBR/G protein coupling following chronic stimulation

The observation that NSF is released from the GBR complex following stimulation lead us to test whether NSF could be implicated in the regulation of the GABA-mediated G protein activation. Given the ability of native GBR to interact with NSF in rat brain, quantification of the receptor-promoted GDP/GTP exchange was assessed by GTP γ [³⁵S] binding assays in both CHO cells and hippocampus slices (a tissue known to endogenously express functional GBR (Lopez-Bendito et al., 2004). Treatment of hippocampus slices with TAT-Pep27 (to impair the GBR/NSF interaction) or the corresponding TAT-RSP control protein did not alter the ability of the receptor to promote GTP γ S³⁵ binding. Indeed, the peptides were without effect on either the baclofen maximal efficacy or EC50 to stimulate GTP γ S³⁵ binding (Table 1). Previous studies demonstrated that the G protein coupling activity of the GBR wanes over time following sustained agonist stimulation in CHO cells, cerebellum granular cells, and rat hippocampus slices (Perroy et al., 2003; Couve et al., 2002; Gonzalez-Maeso et al., 2003; Tosetti et al., 2004). Consistent with these findings, we observed that a 30 min pre-stimulation with GABA led to a 36 ± 2 % reduction of the maximal baclofen-stimulated GTP γ S binding (Fig. 6A-B) in hippocampus slices. Treatment with TAT-Pep27 completely blocked this GABA-promoted desensitization ($-3 \pm 9\%$) whereas TAT-RSP was without effect ($45 \pm 5\%$; Fig. 6A-B). These results that indicate a role of NSF in the agonist-promoted desensitization of GBR in hippocampus, were recapitulated in CHO cells (Fig. 6C) where the $39 \pm 8\%$ desensitization promoted by a 30 min pretreatment with GABA was also blocked by TAT-Pep27 ($8 \pm 4\%$). Because NSF was previously implicated

in the membrane sorting of GluR2 and β 2AR (Hanley et al., 2002; Noel et al., 1999; Shi et al., 2001; Cong et al., 2001), we assessed whether receptor pre-stimulation with GABA affected cell surface expression of GBR1 or GBR2 in these cells. As recently reported in hippocampus neurons (Fairfax et al., 2004), ELISA analysis revealed that the cell surface receptor density was very stable in the continuous presence of its ligand (Supplementary data, Fig. S2). NSF, however, has previously been shown to modulate both forward trafficking and endocytosis of membrane proteins (Hanley et al., 2002; Noel et al., 1999; Shi et al., 2001; Cong et al., 2001). Therefore, since NSF was found to interact with GBR immature species, one cannot formally exclude the possibility that NSF affects both endocytosis and insertion of *de novo* synthesized receptors such that the steady state concentration of GBR at the cell surface remained unaffected. This is however unlikely given the lack of surface labeled GBR internalization following a 30 minutes agonist stimulation in CHO cells (data not shown); a behavior also observed in HEK293 cells (Perroy et al., 2003) COS cells and hippocampus primary neuron cultures (Fairfax et al., 2004). It follows that in absence of agonist-promoted internalization, insertion of *de novo* synthesized receptors would have led to an increase in the steady state receptor level detected by ELISA. Since this was not the case, the above results suggest that the role that NSF could play in forward trafficking of GBR probably does not impact on the short-term events contributing to the process of rapid desensitization.

The agonist-promoted desensitization of GBR is a PKC dependent mechanism

Given the proposed role of PKC in the regulation of GBR signaling efficacy in rat hippocampus (Dutar and Nicoll, 1988; Thompson and Gahwiler, 1992; Tosetti et al., 2004), we investigated the potential contribution of this kinase in the NSF-mediated desensitization of the receptor in CHO cells. First, we investigated the ability of GABA to promote plasma membrane translocation of PKC in cells expressing a GFP-tagged PKC α (GFP-PKC) construct. In agreement with what was previously observed in hippocampal neurons

(Tremblay et al., 1995), treatment with GABA induced the recruitment of GFP-PKC protein to the plasma membrane (Fig. 7A) reaching its maximum at 5 min. This recruitment was comparable to the one promoted by a diterpene molecule directly activating PKC (Blumberg, 1991), the phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Inhibiting PKC activation with GFX completely blocked the GABA-promoted attenuation of the baclofen-stimulated $\text{GTP}\gamma\text{S}^{35}$ binding (Fig. 7B) suggesting a role for this protein in the desensitization process. Consistent with such a role, direct PKC activation with PMA reduced the maximal baclofen response by $48 \pm 3\%$, thus mimicking the desensitizing effects of GABA ($40 \pm 3\%$; Fig. 7B). Also consistent with a role for PKC is the observation that the GABA-promoted phosphorylation of GBR1 ($154 \pm 9\%$; Fig. 7C) and GBR2 (data not shown) was blocked by GFX whereas PMA strongly stimulated it ($278 \pm 19\%$). Interestingly, the recruitment of PKC occurred concomitantly with the release of NSF from the receptor (50% of NSF being released from GBR following 5 min of stimulation a time at which the recruitment of PKC is maximal; Fig. 5) thus suggesting that these two events act in a coordinated fashion to promote the agonist-mediated desensitization of GBR.

NSF primes GBR for its PKC dependant desensitization

To further explore the link between PKC and NSF in the agonist-promoted desensitization process, we assessed the influence of the NSF/GBR interaction blocking peptide, TAT-Pep27, on the GABA-promoted recruitment of PKC and the ensuing phosphorylation of GBR. As observed in Fig. 8A-B, pretreatment with TAT-Pep27, completely abolished the GABA-induced recruitment of GFP-PKC to the plasma membrane. Consistent with these results, TAT-Pep27 also prevented the agonist-dependant increase in GBR phosphorylation (Fig. 8C-D). Overall, these results indicate that the binding of NSF to

the heterodimeric receptor is critical to the PKC-mediated processes involved in the blunting of GBR signaling efficacy.

PKC induces the dissociation of NSF from the activated GBR

Since we previously observed that NSF dissociates from the receptor following agonist stimulation, we assessed the role of PKC in this process. As shown in figure 10, GFX strongly inhibited the disruption of the NSF/receptor complex that follows the activation of the receptor. These results indicate that the GABA-stimulated dissociation of NSF from the receptor involves PKC activation. Consistent with such a role for PKC is the observation that PMA treatment was sufficient to promote NSF release (Fig. 9).

Discussion

In the present study, we showed that the interaction between NSF and GBR regulates the signaling efficacy of this heterodimeric receptor through a mechanism involving PKC activation.

NSF was found to interact directly with both GBR1 and GBR2 in a non-competitive manner as illustrated by the fact that binding of the ATPase to a given subunit was not inhibited by the co-expression of the other. This contrasts with other proteins such as 14-3-3 (Couve et al., 2001), CREB2 (White et al., 2000) and Marlin-1 (Couve et al., 2004) that were found to interact only with GBR1 and to compete for the GBR1-GBR2 interaction. The concomitant interaction of NSF with both GBR1 and GBR2 reflects its ability to interact with the functional receptor expressed at the cell surface as illustrated by the regulation of the interaction upon receptor agonist stimulation. As previously reported for the NSF/GluR2 interaction (Hanley et al., 2002), a peptide corresponding to the interacting domain of the receptor with NSF was sufficient to block the interaction. Interestingly, peptides derived from both GluR2 (Pep2m) and GBR2 (Pep27) subunits inhibited the association of NSF to GBR. This indicates that these peptides share a unique binding site on NSF that may represent a common interaction domain for GBR and GluR2 subunits.

Also reminiscent of the GluR2/NSF interaction, the nucleotide binding status of NSF was found to regulate its interaction with the GBR subunits. This is important when considering that the classical functions of the ATPase are dictated by its nucleotide binding state and its ATPase activity. For instance, NSF-promoted SNARE complex uncoiling involved in membrane fusion events requires ATP hydrolysis that leads to the dissociation of the ADP-bound NSF from its substrate (Sollner et al., 1993). Interestingly, GBR stimulation led to a reduction of its co-immunoprecipitation with NSF, indicative of an agonist-promoted dissociation of the enzyme. Since NSF interacts within the coiled-coil region of GBR2, it is

tempting to draw a parallel with the typical uncoiling action of NSF and propose that the ATPase regulates the association of the GBR subunit carboxyl-tails. However, an uncoiling of the GBR c-tails alone would not be sufficient to explain the NSF-mediated agonist-promoted reduction in signaling efficacy. Indeed, it was previously shown that the entire deletion of the GBR coiled-coil domain does not affect the receptor activity (Grunewald et al., 2002; Margeta-Mitrovic et al., 2001). Thus, an additional factor needs to be invoked to explain how NSF contributes to the desensitization of GBR. Overall, our data suggest that this additional factor could be PKC.

Consistent with this hypothesis, inhibition of the NSF/GBR interaction by TAT-Pep27 blocked both PKC recruitment and GBR phosphorylation, as well as the agonist-promoted desensitization. Taken with the observation that that PMA-mediated activation of PKC promoted both GBR phosphorylation and its functional uncoupling from the G protein and that inhibiting PKC with GFX prevented desensitization, these data clearly support the existence of a coordinated role of NSF and PKC in the regulation of GBR activity. Since PKC- dependant phosphorylation of NSF regulates the ATPase function (Matveeva et al., 2001), a role of NSF phosphorylation in the regulation of GBR cannot be excluded. This is, however, unlikely since no change in the NSF phosphorylation state was observed following GBR stimulation or PMA treatment (data not shown).

The coordinated action of NSF and PKC in the regulation of GBR activity is further supported by the observation that the agonist-promoted release of NSF from the receptor requires PKC activation and that PMA treatment is sufficient to induce the dissociation of the ATPase. In such a scenario, the pre-association of NSF with GBR could be seen, as a priming event required for the engagement of PKC that in turns would promote receptor desensitization and favor NSF release thus terminating the regulatory cycle.

A functional interaction between PKC and NSF also emerged from several studies on the regulation of ionotropic GluR2-containing AMPA receptor. In this case, however, NSF was shown to stabilize the receptor at the synaptic membrane and to prevent its removal by a combined action of PKC and the protein interacting with C kinase (PICK-1) (Hanley et al., 2002; Perez et al., 2001) thus preventing the occurrence of long term depression. In this scenario, NSF has been proposed to modulate both the incorporation and the lateral diffusion of GluR2 in the plasma membrane (Steinberg et al., 2004). Given that GBR activation does not promote endocytosis and does not affect steady-state receptor density at the cell surface, the role of NSF in GBR desensitization does not appear to involve removal or insertion of receptor from the plasma membrane. Therefore, the hypothesized role of NSF in membrane protein lateral diffusion may be a more appealing mechanism to explain the regulatory influence of NSF on GBR function especially when considering the localization of GBR in raft microdomain and its potential role in the control of receptor signaling activity (Becher et al., 2004).

Taken together, our results demonstrate the existence of a concerted regulation of GBR signaling efficacy involving both NSF and PKC. Based on our observations, we propose a model whereby the pre-association of NSF with the receptor is a prerequisite for the occurrence of the PKC-promoted desensitization (Fig. 10). In the absence of GBR/NSF interaction (ex: in the presence of TAT-Pep27), GBR stimulation fails to promote PKC recruitment and phosphorylation of the receptor that becomes refractory to desensitization (Fig. 10a). In contrast, pre-association of NSF primes the receptor such that agonist stimulation results in the recruitment of PKC and the ensuing phosphorylation of GBR leading to agonist-promoted desensitization (Fig. 10b). In addition to promote desensitization, PKC also terminates the regulatory process by favoring NSF dissociation from the

heterodimer (Fig 10c). Although the precise mechanism by which NSF/GBR association primes the desensitization process cannot be firmly established, two non-mutually exclusive mechanisms can be imagined: 1) through its uncoiling activity, NSF could unmask phosphorylation sites that are implicated in desensitization, 2) The presence of NSF could favor the engagement of a signaling pathway required for PKC activation. Also remaining to be established is whether NSF dissociation occurs before or after the completion of the PKC-dependent desensitization and/or contributes to the regulation of signaling efficacy.

The role of NSF and PKC in the desensitization of GBR should also be placed in the context of other mechanisms that have been shown to contribute to this process. For instance, a phosphorylation-independent contribution of GRK-4 (Perroy et al. 2003) as well as a negative influence of PKA-mediated phosphorylation of GBR (Couve et al, 2002) on its desensitization have been reported. The relative contribution of these various mechanisms most likely depends on the relative expression levels of the different regulatory proteins. Noticeably, no GRK-4 expression could be detected in CHO cells suggesting that the NSF/PKC may represent the dominant mechanism in these cells. This process also appears to be relevant for GBR desensitization in at least some native tissues since the NSF blocking peptide TAT-Pep-27 abolished agonist-promoted desensitization in hippocampus slices. Interestingly, the GBR desensitization previously observed in rat hippocampus slices was shown to concern pre-synaptic GBR that regulate neurotransmitter release (Tossetti et al, 2004). Taken with the role of both NSF and PKC in the regulation of synaptic exocytosis (Lin and Scheller, 2000; Barclay et al, 2003), our demonstration of their implication in GBR desensitization raises the intriguing possibility of the existence of an integrated process controlling the GBR-mediated inhibition of neurotransmitter release.

Materials and methods

A detailed description of the different materials and plasmids used in this manuscript may be found in supplementary information.

YTH

This protocol has already been described (White et al., 2000) but a detailed description can be found in supplementary information.

In vitro protein interaction assay

Protocols used to purify the different proteins used in this assay are detailed in the supplementary methods appended to this manuscript. All experiments were performed essentially as previously described (Hanley et al., 2002). Detailed protocol can be found in supplementary information.

Cell culture and rat hippocampal slices preparation

CHO cells stably expressing either myc-GBR1b, HA-GBR2, GBR1a/GBR2 (these cells have been described previously (White et al., 2000)), or myc-GBR1b/HA-GBR2 were maintained in F12/DMEM media containing 10% foetal bovin serum, 2 mM L-glutamine and 250µg/mL G418. In the case of the myc-GBR1b/HA-GBR2 cell line, 5µg/mL puromycine was added to the media. Before experiments, cells were cultured in media without antibiotics for 48h. Transfections were performed with the indicated plasmid using Fugene 6 following manufacturer's instructions.

Primary rat brain cortical cells were plated onto glass coverslips for 17-21 days and then prepared for immunocytochemistry as described previously (Almeida et al., 2001).

In order to isolate hippocampus, a Sprague-Dawley rat (P14-P15) was anesthetized with halothane (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) and sacrificed by

decapitation. The brain was then quickly removed and placed in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solution gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. Coronal slices (350 μm) were then cut in room temperature ACSF solution containing (in mM): NaCl (126), KCl (3.5), MgCl₂ (1.3), CaCl₂ (2), NaHPO₄ (1.2), glucose (11), NaHCO₃ (26), pH 7.35, 300 mOsm with a Leica VT1000S vibratome (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Hippocampus were isolated from slice in oxygenated ACSF and treatments were performed as described below.

Cell treatments

All treatments were performed at 37°C on intact hippocampal slices or CHO cells. Pre-stimulations of cells with 1mM GABA or 0.1mM Baclofen were performed for 30min when not specified and for the indicated time. In order to demonstrate the role of PKC, cells were incubated with vehicle or 0.5μM GFX for 30min prior to the pre-stimulation with GABA or with 1μM PMA for 10min. Finally, to inhibit NSF/GBR interaction, cells were incubated with 400nM GST-TAT-Pep27 or 800nM –Pep2m hybrid proteins, for 1h before any treatment. Treatment with the control GST-TAT-RSP protein was performed at 800nM for 1h.

Immunoprecipitation

Every step was performed on ice. Cells were washed twice with PBS, harvested and centrifuged at 800g. Cells were solubilized in TNTO buffer (50mM Tris-HCl pH7.4 at 4°C, 150mM NaCl, 1% TritonX100, 60mM β-octylglucopyranoside, 1mM DTT, 5 mg/ml leupeptine, 5 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 10 mg/ml benzamidine), under rocking for 1h. Nuclei were removed from lysate by centrifugation for 15min at 12000g and supernatant was then submitted to another centrifugation step at 150000g for 1h to pellet non-solubilized products. 1mg/mL of cell lysate was incubated with the indicated antibody, 0.1% BSA and protein G-sepharose beads over night under agitation. Immune complexes were pelleted by a

short centrifugation at 12000g and wash three times in TNTO buffer containing 350mM NaCl. Immunoprecipitated proteins were eluted at 50°C for 30min in 40μL of SDS-PAGE loading buffer containing 50mM DTT. Proteins were then submitted to western blot analysis.

A complete description of this last procedure may be found in supplementary methods.

In the case of phosphorylation assay, cells were lysed for 30min on ice in RIPA buffer (50 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM DTT, 1% SDS, 5 mg/ml leupeptine, 5 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 10 mg/ml benzamidine) containing 0.2 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride and 10 mM sodium phosphate. Lysates were centrifuged for 15min at 15000g and incubated overnight in RIPA buffer as described previously.

Whole-cell phosphorylation

Protocol has already been described (Perroy et al., 2003), but the detailed protocol can be found in supplementary information.

[³⁵S] GTPγS binding assay

Membranes from CHO stably transfected with GBR1a/GBR2 or hippocampus slices were prepared as already described (Perroy et al., 2003) (See also supplementary information). The membrane pellets were resuspended in assay buffer [50 mM HEPES pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 15 mM GDP and 0.5% BSA]. Membranes (20 μg of protein per assay) were then incubated in 300 pM [³⁵S]GTPγS (1250 Ci/mmol) in the presence of 10⁻⁴ M baclofen for 60 min at 25°C. Binding was terminated by rapid filtration over GF/B filters using a cell harvester. Filters were washed three times in 50 mM Tris pH 7.4 containing 50 mM NaCl and 5 mM MgCl₂, and counted.

Immunofluorescence

The protocol is described in detailed in the supplementary information section.

Mathematical and statistical analysis

For GTP γ S binding, dose response curve experiments were analysed by non-linear regression using Prism program (GraphPad software, San Diego, CA) (Fig. 6A). For other GTP γ S binding studies, basal GTP γ S binding obtained without stimulation was subtracted to the maximal GTP γ S binding obtained in presence of 0.1mM baclofen. Every conditions were expressed in percentage of the corresponding control condition. The statistical significance of results obtained in GTP γ S binding or in the case of co-immunoprecipitation experiments was determined using a one-way ANOVA analysis followed by a Bonferroni's multiple comparison test. Statistical significance between the control condition and the condition of interest are represented as follow: * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$ and *** when $p < 0.001$.

Acknowledgments

Authors are grateful to François-Xavier Campbell-Valois, Monique Lagacé, and Ali Salahpour for their constant fruitful discussions. Authors are also grateful to Billy Breton for the kind gift of the GFP-GRK5 plasmid. This work was supported by a CIHR/Rx&D grant sponsored by GlaxoSmithKline. NL holds a CIHR studentship. M.B. is the recipient of the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

References

Almeida,A., Almeida,J., Bolanos,J.P., and Moncada,S. (2001). Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 15294-15299.

Barclay, J.W., Craig, T.J., Fisher, R.J., Ciufu, L.F., Evans, G.J., Morgan, A. and Burgoyne, R.D. (2003) Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J. Biol. Chem.* 278, 10538-10545

Becher,A., Green,A., Ige,A.O., Wise,A., White,J.H., and McIlhinney,R.A. (2004). Ectopically expressed gamma-aminobutyric acid receptor B is functionally down-regulated in isolated lipid raft-enriched membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 981-987.

Becker-Hapak,M., McAllister,S.S., and Dowdy,S.F. (2001). TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 24, 247-256.

Blumberg,P.M. (1991). Complexities of the protein kinase C pathway. *Mol. Carcinog.* 4, 339-344.

Bomberger,J.M., Spielman,W.S., Hall,C.S., Weinman,E.J., and Parameswaran,N. (2005). RAMP isoform-specific regulation of adrenomedullin receptor trafficking by NHERF-1. *J. Biol. Chem.*

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., Filippov,A.K., Connolly,C.N., Bettler,B., Brown,D.A., and Moss,S.J. (1998). Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 26361-26367.

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.

Couve,A., Restituto,S., Brandon,J.M., Charles,K.J., Bawagan,H., Freeman,K.B., Pangalos,M.N., Calver,A.R., and Moss,S.J. (2004). Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA receptors. *J. Biol. Chem.* *279*, 13934-13943.

Couve,A., Thomas,P., Calver,A.R., Hirst,W.D., Pangalos,M.N., Walsh,F.S., Smart,T.G., and Moss,S.J. (2002). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nat. Neurosci.* *5*, 415-424.

Dutar,P. and Nicoll,R.A. (1988). Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* *1*, 585-591.

Fairfax,B.P., Pitcher,J.A., Scott,M.G., Calver,A.R., Pangalos,M.N., Moss,S.J., and Couve,A. (2004). Phosphorylation and chronic agonist treatment atypically modulate GABAB receptor cell surface stability. *J. Biol. Chem.* *279*, 12565-12573.

Galvez,T., Duthey,B., Kniazeff,J., Blahos,J., Rovelli,G., Bettler,B., Prezeau,L., and Pin,J.P. (2001). Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J.* *20*, 2152-2159.

Gonzalez-Maeso,J., Wise,A., Green,A., and Koenig,J.A. (2003). Agonist-induced desensitization and endocytosis of heterodimeric GABAB receptors in CHO-K1 cells. *Eur. J. Pharmacol.* *481*, 15-23.

Grunewald,S., Schupp,B.J., Ikeda,S.R., Kuner,R., Steigerwald,F., Kornau,H.C., and Kohr,G. (2002). Importance of the gamma-aminobutyric acid(B) receptor C-termini for G-protein coupling. *Mol. Pharmacol.* *61* , 1070-1080.

Hanley,J.G., Khatri,L., Hanson,P.I., and Ziff,E.B. (2002). NSF ATPase and alpha-/beta-SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. *Neuron* *34*, 53-67.

Hanson,P.I., Roth,R., Morisaki,H., Jahn,R., and Heuser,J.E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* *90*, 523-535.

Heydorn,A., Sondergaard,B.P., Hadrup,N., Holst,B., Haft,C.R., and Schwartz,T.W. (2004). Distinct in vitro interaction pattern of dopamine receptor subtypes with adaptor proteins involved in post-endocytotic receptor targeting. *FEBS Lett.* *556*, 276-280.

Jones,K.A., Borowsky,B., Tamm,J.A., Craig,D.A., Durkin,M.M., Dai,M., Yao,W.J., Johnson,M., Gunwaldsen,C., Huang,L.Y., Tang,C., Shen,Q., Salon,J.A., Morse,K., Laz,T., Smith,K.E., Nagarathnam,D., Noble,S.A., Branchek,T.A., and Gerald,C. (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* *396*, 674-679.

Kammerer,R.A., Frank,S., Schulthess,T., Landwehr,R., Lustig,A., and Engel,J. (1999). Heterodimerization of a functional GABAB receptor is mediated by parallel coiled-coil alpha-helices. *Biochemistry* *38*, 13263-13269.

Kaupmann,K., Malitschek,B., Schuler,V., Heid,J., Froestl,W., Beck,P., Mosbacher,J., Bischoff,S., Kulik,A., Shigemoto,R., Karschin,A., and Bettler,B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* *396*, 683-687.

- Kuner,R., Kohr,G., Grunewald,S., Eisenhardt,G., Bach,A., and Kornau,H.C. (1999). Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283, 74-77.
- Lee,S.H., Liu,L., Wang,Y.T., and Sheng,M. (2002). Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* 36, 661-674.
- Lee,S.H., Simonetta,A., and Sheng,M. (2004). Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* 43, 221-236.
- Lin, R.C. and Scheller, R.H. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 19-49.
- Lopez-Bendito,G., Shigemoto,R., Kulik,A., Vida,I., Fairen,A., and Lujan,R. (2004). Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus* 14, 836-848.
- Margeta-Mitrovic,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97-106.
- Margeta-Mitrovic,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2001). Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14649-14654.
- Matveeva,E.A., Whiteheart,S.W., Vanaman,T.C., and Slevin,J.T. (2001). Phosphorylation of the N-ethylmaleimide-sensitive factor is associated with depolarization-dependent neurotransmitter release from synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 12174-12181.
- Muller,J.M., Shorter,J., Newman,R., Deinhardt,K., Sagiv,Y., Elazar,Z., Warren,G., and Shima,D.T. (2002). Sequential SNARE disassembly and GATE-16-GOS-28 complex

assembly mediated by distinct NSF activities drives Golgi membrane fusion. *J. Cell Biol.* 157, 1161-1173.

Nishimune,A., Isaac,J.T., Molnar,E., Noel,J., Nash,S.R., Tagaya,M., Collingridge,G.L., Nakanishi,S., and Henley,J.M. (1998). NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21, 87-97.

Noel,J., Ralph,G.S., Pickard,L., Williams,J., Molnar,E., Uney,J.B., Collingridge,G.L., and Henley,J.M. (1999). Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron* 23, 365-376.

Osten,P., Srivastava,S., Inman,G.J., Vilim,F.S., Khatri,L., Lee,L.M., States,B.A., Einheber,S., Milner,T.A., Hanson,P.I., and Ziff,E.B. (1998). The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and a. *Neuron* 21, 99-110.

Osten,P. and Ziff,E.B. (1999). AMPA receptor forms a biochemically functional complex with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 558-560.

Perez,J.L., Khatri,L., Chang,C., Srivastava,S., Osten,P., and Ziff,E.B. (2001). PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *J. Neurosci.* 21, 5417-5428.

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.

Robbins,M.J., Calver,A.R., Filippov,A.K., Hirst,W.D., Russell,R.B., Wood,M.D., Nasir,S., Couve,A., Brown,D.A., Moss,S.J., and Pangalos,M.N. (2001). GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J. Neurosci.* 21, 8043-8052.

Sallese,M., Salvatore,L., D'Urbano,E., Sala,G., Storto,M., Launey,T., Nicoletti,F., Knopfel,T., and De Blasi,A. (2000). The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J.* *14*, 2569-2580.

Schiff,M.L., Siderovski,D.P., Jordan,J.D., Brothers,G., Snow,B., De Vries,L., Ortiz,D.F., and Diverse-Pierluissi,M. (2000). Tyrosine-kinase-dependent recruitment of RGS12 to the N-type calcium channel. *Nature* *408*, 723-727.

Shi,S., Hayashi,Y., Esteban,J.A., and Malinow,R. (2001). Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* *105*, 331-343.

Sollner,T., Bennett,M.K., Whiteheart,S.W., Scheller,R.H., and Rothman,J.E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* *75*, 409-418.

Song,I., Kamboj,S., Xia,J., Dong,H., Liao,D., and Huganir,R.L. (1998). Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* *21*, 393-400.

Steinberg,J.P., Huganir,R.L., and Linden,D.J. (2004). N-ethylmaleimide-sensitive factor is required for the synaptic incorporation and removal of AMPA receptors during cerebellar long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 18212-18216.

Thiyagarajan,M.M., Stracquatano,R.P., Pronin,A.N., Evanko,D.S., Benovic,J.L., and Wedegaertner,P.B. (2004). A predicted amphipathic helix mediates plasma membrane localization of GRK5. *J. Biol. Chem.* *279*, 17989-17995.

Thompson,S.M. and Gahwiler,B.H. (1992). Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol* *451*, 329-345.

Tosetti,P., Bakels,R., Colin-Le Brun,I., Ferrand,N., Gaiarsa,J.L., and Caillard,O. (2004). Acute desensitization of presynaptic GABAB-mediated inhibition and induction of epileptiform discharges in the neonatal rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 3227-3234.

Tremblay,E., Ben Ari,Y., and Roisin,M.P. (1995). Different GABAB-mediated effects on protein kinase C activity and immunoreactivity in neonatal and adult rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* *65*, 863-870.

Virlon,B., Firsov,D., Cheval,L., Reiter,E., Troispoux,C., Guillou,F., and Elalouf,J.M. (1998). Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants. *Endocrinology* *139*, 2784-2795.

White,J.H., McIlhinney,R.A., Wise,A., Ciruela,F., Chan,W.Y., Emson,P.C., Billinton,A., and Marshall,F.H. (2000). The GABAB receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 13967-13972.

White,J.H., Wise,A., Main,M.J., Green,A., Fraser,N.J., Disney,G.H., Barnes,A.A., Emson,P., Foord,S.M., and Marshall,F.H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* *396*, 679-682.

White,J.H., Wise,A., and Marshall,F.H. (2002). Heterodimerization of gamma-aminobutyric acid B receptor subunits as revealed by the yeast two-hybrid system. *Methods* *27*, 301-310.

Whiteheart,S.W. and Matveeva,E.A. (2004). Multiple binding proteins suggest diverse functions for the N-ethylmaleimide sensitive factor. *J. Struct. Biol.* *146*, 32-43.

Tables and figures

Table 1. Functional characterization of native hippocampal GBR following treatment with TAT-peptides

Rat hippocampus slices were treated for 1h with the indicated TAT-peptide and baclofen-stimulated [³⁵S]GTPγS binding was measured in membranes derived from these slices expressing native GBR. The results were expressed in percentage of the vehicle condition for basal and maximal GTPγS binding. EC50 was derived from dose response curves. These results are the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate.

Condition	Basal GTPγS ³⁵ binding (% of control)	Maximal GTPγS ³⁵ binding (% of control)	EC50 (M)	n	R ²
Vehicle	100	99,96±7	2.48 10 ⁻⁵	3	0,909
RSP	105,9±8,7	85,49±6	2.03 10 ⁻⁵	3	0,909
Pep27	103,5±18,5	95,94±9,8	1.3 10 ⁻⁵	3	0,857

Figure 1. Interaction between NSF and GBR c-termini assessed in yeast two hybrid system. GBR c-termini (see schematic representation) were used as bait in a yeast two hybrid screen testing a human brain cDNA library. NSF was one of the positive clones obtained with the GBR2 c-terminus. To delineate the GBR2 minimal region of interaction with NSF, two hybrid assay was performed between the indicated GBR2 c-tail mutants (see table) and NSF. β-Gal activity is determined (+/-) for each construct.

Figure 2. Influence of the ATPase state of NSF on its direct interaction with GBR c-termini. For all experiments, purified His₆-NSF was incubated with GST or GST-hybrid proteins, under the indicated nucleotide and ionic conditions. Bound NSF was revealed by western blot analysis. In (A) GST pull down assay was performed with increasing amount of His₆-NSF and GST or GST-GBR2ct recombinant proteins in the presence of ATPγS and

MgCl₂. **(B)** The binding of 50nM NSF to GST or GST-GBR2ct was assessed under the indicated nucleotide and ionic conditions. **(C)** GST-pep27, GST-pep2m or GST-RSP (random sequence peptide) were incubated with 50nM NSF in the presence of ATP, MgCl₂ and EDTA. **(D)** GST-GBR1ct and GST-GBR2ct were incubated with 50nM NSF in the presence of ATP, MgCl₂ and EDTA. In all cases, results are representative of two to three independent experiments.

Figure 3. Association of NSF with the functional GBR heterodimer

Immunoprecipitations were performed on lysates from control CHO (Mock) or CHO cells stably expressing myc-GBR1b (GBR1, **A**), HA-GBR2 (GBR2, **B**), using either 9E10 anti-myc, anti-GBR2 or mouse anti-NSF antibodies. The presence of endogenous NSF or of receptors was confirmed by western blot analysis using either 3F10 anti-myc, anti-GBR2 or rabbit anti-NSF antibodies. **(C)** CHO cells were transiently transfected with indicated plasmids. Cell lysates were then immunoprecipitated with 9E10 anti-myc antibody. For surface immunoprecipitation, attached cells were labeled with 9E10 anti-myc antibody before cell lysis. **(D)** GST-TAT hybrid proteins fused to the indicated peptide (see schematic representation) were used in order to inhibit the NSF/heterodimer interaction in CHO cells stably expressing or not (Mock) myc-GBR1b/HA-GBR2. NSF/receptor complexes were immunoprecipitated with an anti-GBR2 antibody.

Figure 4. NSF co-localizes with both GBR subunits at the plasma membrane

(A) CHO cells stably expressing myc-GBR1b/HA-GBR2 were used. myc-GBR1b, GBR2 and NSF were respectively labeled for immunofluorescence experiments with the secondary antibodies coupled to respectively Alexa633 (Blue) (a), Oregon green (b) and Texas red (c) fluorophore respectively. GBR1 and GBR2 were surface labeled prior to cell fixation and permeabilization was then done in order to mark NSF. Overlay panels (d, e and f) correspond

to the superposition of the a-b and a-c and b-c images, respectively. **(B)** GBR2 (green, a, d and g) and NSF (red, b, e and h) co-localizations (c, f and i) were determined in primary cultures of cortical neurons. Arrows indicate synaptic structures where both proteins are co-localized. White bars represent the scale of the image (20 μ m).

Figure 5. GABA stimulation disrupts the NSF/GBR complex.

(A) CHO cells stably expressing HA-GBR2 were transfected or not with myc-GBR1b and were treated with GABA for the indicated times. Following immunoprecipitation with 9E10 anti-myc, the amount of precipitated NSF was revealed by western blot and quantified (bar graph). These results represent the means \pm SEM of three to five experiments performed independently. **(B)** cells were treated either with 1mM GABA or 0.1mM Baclofen for 30min. In **(C)** control CHO cells (-) or CHO cells stably expressing HA-GBR2 alone (GBR2), GBR1a/GBR2 or myc-GBR1b/HA-GBR2 (GBR1b/GBR2) were used and treated or not with GABA 1mM for 30min. GBR2 was immunoprecipitated and the presence of endogenous NSF and both receptors revealed by western blot.

Figure 6. Preventing NSF binding preserves GBR activity following GABA pre-stimulation

Maximal baclofen-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding was measured in membranes derived from hippocampal slices expressing native GBR. **(A)** Hippocampus slices were treated for 1h with the indicated TAT-peptide and then with baclofen (empty square) or not (full square) for an additional 30min. Curves represent the specific GTP γ S binding obtained for increasing amount of baclofen. **(B,C)** Comparison of the maximal baclofen induced GTP γ S binding detected following baclofen prestimulation depending on the TAT-peptide used on hippocampal slices **(B)**. **(C)** Similar experiments were performed in CHO cells expressing

stably GBR1a and GBR2. The 30min stimulation were however performed with GABA in this case.

Figure 7. PKC is implicated in the desensitization process of the GABA_B receptor

(A) CHO cells stably expressing GBR1a/GBR2 were transiently transfected with GFP-PKC α construct. Cells were treated as indicated prior to their fixation and PKC localization was visualized by confocal microscopy. These results are representative of two independent experiments. (B) Maximal baclofen-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding was measured in membranes derived from CHO cells stably expressing GBR1a/GBR2. The effect of agonist pre-stimulation on the activity of the receptor was measured in absence or presence of 0.5 μ M GFX and compared to the one induced by phorbol ester treatment. These results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. (C, D) CHO cells stably expressing myc-GBR1b/HA-GBR2 were labeled with [³²P]Pi. GBR1 was immunoprecipitated (9E10 anti-myc) and phosphorylation signal was analysed by autoradiography. Bands corresponding to the GBR1 monomer (mature and immature species) and homodimer were indicated by (*), GBR2 monomer by (#) and GBR1/GBR2 heterodimer by (§). Results were normalized by quantifying (western blot) the amount of precipitated receptor in each condition. Histograms represent the mean \pm SEM of five independent experiments.

Figure 8. GBR/NSF interaction is essential to PKC recruitment and GBR phosphorylation upon agonist stimulation

(A,B) CHO cells stably expressing GBR1a/GBR2 were transiently transfected with GFP-PKC α construct. Cells were treated as indicated prior to their fixation and PKC localization was visualized by confocal microscopy. (B) The histogram represents the percentage of cells displaying membrane PKC recruitment in each condition of treatment and is the result of two independent experiences. In each experience, an average of thirty cells was considered per

condition. (C,D) CHO cells stably expressing myc-GBR1b/HA-GBR2 were labeled with [³²P]Pi and treated as indicated. GBR1 was immunoprecipitated (9E10 anti-myc) and phosphorylation signal was analysed by autoradiography. Histograms represent the mean ± SEM of four independent experiments.

Figure 9. PKC modulates the NSF/GABA_B receptor interaction.

(A) Cells stably expressing HA-GBR2 and transiently transfected or not with myc-GBR1b were used. Following treatments to modulate receptor and/or PKC activities, immunoprecipitation with 9E10 anti-myc antibody was performed and the presence of endogenous NSF was revealed by western blot and quantified (bar graph, B). These results represent the mean ± SEM of three independent experiments.

Figure 10. Model of the regulation of signaling efficacy by a concerted action of NSF

and PKC. Step a) when NSF is dissociated from the GBR heterodimer by a treatment with TAT-Pep27, the receptor becomes refractory to a subsequent desensitization induced by the presence of GABA. Step b) the GBR/NSF ternary complex primes the receptor to a PKC mediated desensitization process that leads to the receptor phosphorylation. Step c) PKC terminates the process by favoring NSF dissociation from the heterodimer.

Supplementary informations

Material and methods

Materials

All reagent for cell culturing (Fetal bovin serum, G418, glutamine, F12/DMEM media and antibiotics) were purchased from Wisent. Different antibodies have been used in this study: mouse 9E10 anti-myc or 12Ca5 anti-HA antibodies (house made), rat 3F10 anti-myc antibody (Roche), anti-NSF antibodies from both rabbit (Calbiochem) and mouse (Boehringer) and finally anti-GBR2 and anti-GBR1 polyclonal antibodies were both made by GSK and generated in rabbit and in sheep respectively. For Western blot analysis, secondary mouse anti-sheep (SIGMA) and goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Amersham) conjugated to the horseradish peroxidase were used. For immunofluorescence, secondary goat anti-rat, anti-rabbit or anti-mouse antibodies coupled respectively to Alexa 488, Alexa568, Alexa633, Texas Red or Oregon green were used (all from Molecular Probes). GF109203X (GFX) was purchased from Calbiochem, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Baclofen and GABA were obtained from SIGMA. 3-(1-pyridinio)-1-propanesulfonate (NDSB) was obtained from Fluka. For deglycosylation experiments, EndoH and PNGase F enzymes were supplied by Roche.

Constructs

For YTH studies, GBR1 and GBR2 c-termini (L⁸⁶⁰-K⁹⁶¹ and V⁷⁴¹-L⁹⁴¹) or the indicated GBR2 c-termini mutants were generated and cloned in frame with Gal4 binding domain (GAL4_{BD}). GAL4_{AD} fusions for NSF were expressed in pACT2 (Clontech), either isolated directly from human brain cDNA library or constructed directly by PCR. Full-length sequence of tagged myc-GABA_B-R1b and HA-GABA_BR2 were inserted into pcDNA3.1(-) as described

previously (White et al., 1998). To generate double stable cell line with HA-GBR2 and myc-GBR1b, myc-GBR1b was subcloned into pCMVpuro3 plasmid (Invitrogen) between NheI and AflIII. For Gluthation-S-Transferase (GST) pull down studies, GBR1 and GBR2 c-termini (containing the residues ⁸⁶¹I-⁹⁶¹K and ⁷⁴⁴I-⁹⁴¹L respectively) were amplified by PCR and cloned in frame with GST into pGEX4T2 (Amersham) between EcoRI and XhoI. His₆tagged-NSF plasmid was constructed by amplifying NSF from YTH template and inserting it into pQE81 plasmid (Qiagen) between BamHI and Sall; NSF construct was further verified by sequencing. GST-TAT fusion proteins were generated by inserting synthesized oligonucleotides coding for the TAT-HA tag between BamHI and EcoRI sites of the pGEX4T2 plasmid. Similar method was used to fuse the coding sequence of human GBR2 derived Pep27 (R⁷⁹⁹MKITELDKDL EEVTMQLQDTPEKTTY⁸²⁵) peptide or rat GluR2 derived pep2m (K⁸⁴⁴RMKVAKNPQ⁸⁵³) to either GST-TAT-HA or GST proteins between EcoRI and XhoI. In each case, the coding sequence of the peptide was flanked with a stop codon. The random sequence peptide (RSP) contained in GST-RSP or GST-TAT-HA-RSP proteins corresponds to an eleven amino acid peptide found in pGEX4T2 plasmid after EcoRI site.

YTH

Yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Y190) expressing either a GAL4_{BD}-GBR1ct or a GAL4_{BD}-GBR2ct fusion protein were selected and transformed with a human brain Matchmaker cDNA library (HL4004AH, CLONTECH) to give a 3-fold representation of the library. Interacting clones were selected with 20 mM 3-amino-1,2,4-triazole (Sigma) followed by production of β-galactosidase as determined by a freeze-fracture assay. DNA from positive clones was recovered from yeast by using the Yeastmaker plasmid isolation kit (CLONTECH), and transformed into *Escherichia coli* before sequencing. Direct two-hybrid interactions were confirmed in Y190 co-transformed with pYTH16, containing the whole c-terminus of GBR1

or GBR2 or c-terminal fragments of GBR2 fused to GAL4_{BD}, and pACT2, expressing NSF as GAL4_{AD} fusions. Fusion constructs were generated directly through PCR or were retrieved as isolates from the library screen. Levels of interaction were determined as described before.

Protein purification

All recombinant proteins were expressed in BL21 Rosetta Blue following an induction of 4h. All purification steps were performed on ice. For His₆-tagged-NSF purification, bacteria were lysed in 50 mM HEPES/KOH pH 7.6, 250 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 10% glycerol, and 0.5 mM DTT by mild sonication as described previously (Hanson et al., 1997). Insoluble materials were removed by a 30000g centrifugation for 30min and NSF was precipitated by binding to Ni²⁺-agarose (Qiagen). Agarose was washed with 50mM Imidazole and elution was then done with 250mM imidazole. Imidazole was removed on a PD-10 columns (Biorad). The purified ATPase was then quick-frozen in liquid nitrogen.

To purify GST-GBR1ct or GST-GBR2ct, bacteria were harvested and washed in buffer A (25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 200 mM KCl, 2mM MgCl₂, 1% Triton-X100, 25 mM DTT and 1mM PMSF). Cells were disrupted by sonication and centrifuged for 30 min at 30000 g. In the case of GST-GBR1ct protein purification, supernatant were incubated with glutathione-agarose beads (Amersham) during 2h under rocking. Beads are then harvested by centrifugation, washed in the same buffer and eluted with 20mM Gluthation. Gluthation was removed on PD-10 column. Since GST-GBR2ct protein displayed insolubility, proteins had to be extracted from inclusion bodies. To do so, lysate were centrifuged at 30000g for 30 min and pellet were washed twice in 25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 200 mM KCl, 1% TritonX-100, 1 mM DTT, 1mM PMSF and solubilized in 25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 6M Guanidium-HCl for 1h and insoluble material were pelleted for 10 min at 100000 g. Guanidium solubilized proteins were then quickly diluted in 1M NDSB solution to favor

folding and incubated for 1h more under rocking. After an O/N dialysis in 25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 200 mM KCl buffer, properly folded proteins were purified on glutathione-agarose beads as described previously for GST-GBR1ct. GST-TAT-peptide proteins were purified in PBS following manufacturer's instructions. The level of purity and the amount of purified proteins were quantified by coumassie blue staining following their resolution on a SDS-PAGE electrophoresis gel, using increasing amounts of BSA protein as reference.

In vitro binding assay

GST-hybrid proteins (2 µg) were immobilized on glutathione-agarose beads in 25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 200 mM KCl, 1% TritonX-100, 10% glycerol and 1 mM DTT (buffer A). Beads were then washed twice with buffer A plus 2 mM ATP, 8 mM MgCl₂ and 8 mM EDTA (buffer B) or 2mM ATP_γS and 8mM MgCl₂ in the presence of 0,2% BSA and incubated with 50 nM or the indicated amount of NSF for 1h under rocking. After four washes in buffer B without BSA, bound proteins were eluted with 20 mM glutathione and detected by western blotting. To determine the effect of the modulation of NSF-ATPase activity on its binding to GST-fusion proteins, the same procedure was performed in the presence of the indicated mix of MgCl₂, EDTA and nucleotide.

Whole-cell phosphorylation

Following incubation for 60 min in phosphate-free medium containing 1% FCS, cells expressing myc-GBR1b/HA-GBR2 were incubated for 2 h in phosphate-free medium containing [³²P]Pi (0.25mCi/mL) and treated or not with 1 mM GABA for 30 min. After immunoprecipitation, as described previously, precipitated proteins were resolved on SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose, and [³²P] detected by autoradiography using BioMax MR Kodak Films. Autoradiograms were scan with a 1200ppi resolution then analyzed with Quantity One BioRad software.

Membrane preparation for [³⁵S]GTP γ S binding

CHO cells or hippocampal tissues were resuspended and lysed under hypotonic conditions (25 mM TrisHCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 5 mg/ml leupeptin, 5 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 10 mg/ml benzamidine) and homogenized with a polytron homogenizer (Ultra-Turrax; Janke and Kunkel) for 10 s. Homogenates were centrifuged at 500 g for 5 min at 4°C and the resulting supernatant fraction was centrifuged at 35 000 g for 20 min at 4°C. Pellet were resuspend in the appropriate GTP γ S binding buffer.

Western blot analysis

Protein samples were resolved on SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and subjected to immunoblotting using the indicated antibody. The nitrocellulose was then incubated with the appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase for 30 min and developed using the Renaissance chemiluminescence kit (Perkin Elmer). Quantification analysis were performed in parallel by scanning blots with a 1200ppi resolution or detecting chemiluminescence directly with phosphoimager device (BioRad). Band intensities were then quantified with the Quantity One BioRad software.

Immunofluorescence

Appropriate treatment was performed on CHO stably expressing myc-GBR1b/HA-GBR2. Cells were then washed with cold PBS and fixed with 3% paraformaldehyde for 15 min, washed again in PBS and finally incubated in PBS containing 0.25% BSA for 30 min. Surface labeling were performed by incubating the indicated primary antibody for 30 min followed by extensive wash in PBS and a permeabilization step with PBS containing 0.15% TritonX100 and 0.25%BSA for 15min. NSF was labeled with the appropriate antibody for another 30min. Cells were washed in the same buffer and incubated with secondary antibodies coupled to

fluorescent markers. The samples were analyzed by confocal laser-scanning microscopy utilizing a Leica TCS SP1 confocal microscope, and co-localisation was performed by overlay of the images using the Leica Confocal Software LCS (Heidelberg, Germany). Excitation and emission filters for the different labelled dyes were as follows: YFP (green): lex¹/₄488 nm, lem¹/₄540/25 nm; Texas red (red): lex¹/₄568 nm, lem¹/₄610/30 nm; Alexa 633 (blue): lex¹/₄633 nm, lem¹/₄705/45 nm.

To visualize GBR2 and NSF localizations in primary cultures of neurons, rabbit anti-GBR2 and mouse anti-NSF antibodies were used as well as the secondary antibodies Alexa 488 (lex¹/₄488 nm, lem¹/₄540/25 nm) conjugated anti-rabbit and Alexa 568 (lex¹/₄568 nm, lem¹/₄610/30 nm) conjugated anti-mouse. Images were collected using a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

Mass spectroscopy analysis of GBR1 associated proteins

Synaptosome membranes (SPM) were prepared from adult Sprague Dawley rat brains and stored frozen at -70°C until use. The membranes were solubilized in sodium deoxycholate (1%) in 50mM Tris-HCl pH 8.0 (solubilization buffer) containing protease inhibitors (Complete EDTA-free Roche Diagnostics) and 10mM iodoacetamide. The detergent to protein ratio was maintained at 10:1 with 9-10mg of SPM protein being used per isolation. The membranes were incubated on ice for 30 minutes and centrifuged at 100,000g for 1 hour. The supernatant from this step was divided into two samples and 5 μg of either normal sheep IgG or affinity purified anti-GBR1 serum added. The samples were rotated at 4°C for 4-6 hours before adding 40 μl of a 1:1 suspension of protein-G in solubilization buffer. Rotation was continued overnight and the beads washed three times in solubilization buffer transferred to a clean eppendorf tube and washed once with 50mM Tris-HCl pH 8.0. Elution was performed with Novex 2 X SDS-sample buffer (25 μl) and heating at 100°C for 2 min.

The eluates were analysed on 4-12% Bis-Tris Novex gradient polyacrylamide gels using MOPS running buffer. The gels were stained using Gel Code Blue staining reagent and destained in distilled water. Slices of decreasing molecular weight were cut from both the control and specific tracks and analysed by mass spectrometry. None of the proteins found in the control (normal sheep IgG) track were considered as positive hits, nor were proteins that appeared only in one isolate. Likewise proteins yielding peptides from gel positions not corresponding to their normal molecular weight were eliminated from the analysis, as were those giving only single peptides. Thus positive immunoprecipitating proteins were those that appeared specifically in two independent immunoprecipitations, that were isolated from the appropriate molecular weight region of the gel and that yielded more than 2 peptides.

Biotinylation, streptavidin pull-down and deglycosylation

For surface biotinylation, cells were washed with PBS on ice, and incubated at 4 °C for 30 min in Dulbecco's PBS containing 0.5 mg/ml of sulfo-NHS-biotin under gentle agitation. Excess biotin was quenched by adding Tris-HCl, pH 7.4, to a final concentration of 50 mM. Cells were then washed twice with cold Dulbecco's PBS and harvested. Biotinylated cell surface proteins were isolated using immobilized streptavidin after solubilizing the total cellular membranes as described for immunoprecipitation in TNTO buffer. 25 µl of resin was used for 1 mg of solubilized membrane proteins in presence of 0.1% BSA (w/v) for 2 h at 4 °C under rocking. Resin was then washed three times and precipitated proteins were eluted as described above. For deglycosylation, eluted streptavidin pull downed or immunoprecipitated proteins were first eluted from the resin in 1% (w/v) SDS, 50 mM sodium phosphate, pH 7.5 then diluted ten times with 50 mM sodium phosphate, pH 7.5. Deglycosylation were performed in the appropriate buffer in presence of EndoH or PNGaseF

at final concentrations of 100 milliunits/ml and 0.001-20 milliunits/ml respectively, over night at 37°C.

Table

Table 1. Analyses of GBR1 associated protein complexes by mass spectroscopy analyses in rat brain

Immunoprecipitation of GBR1 receptor endogenously expressed in rat brain synaptosome membrane was performed with an anti-GBR1 antibody and the presence of NSF was revealed by mass spectroscopy analysis (protocol described in supplementary materials and method). Three independent experiments were performed and NSF peptides found for each of them are indicated.

Purification	Protein	Accession N°	Peptide sequences
1	NSF	P46459	AENSSLNLIGK DIESMDPSILK VLDDGELLVQQTK
2	NSF	P46459	AESLQVTR LLDYVPIGPR VLDDGELLVQQTK
3	NSF	P46459	LLDYVPIGPR IAEESNFPIK VLDDGELLVQQTK

Figure legends

Figure S1. Characterization of GBR2 species expressed in CHO cells

CHO cells stably expressing HA-GBR2 were used. We defined the nature of carbohydrate modifications of each of GBR2 species detected in these cells by performing some deglycosylation treatments. Taking advantage of the fact that the lower molecular weight species (~100kDa) is preferentially recognized by the by anti-HA antibodies, endoglycosidase H (EndoH) treatments were performed on this species following its immunoprecipitation. The sensitivity to the EndoH treatment indicated the presence of unprocessed high mannose oligosaccharides, characteristic of immature glycoproteins, suggesting that the ~100kDa species represent an ER-localized precursor form of the receptor. In contrast, the higher molecular weight specie (~120kDa) of GBR2, purified by streptavidin pull down after cell surface biotinylation, was found to be resistant to EndoH treatment but sensitive to PNGase F (an enzyme removing all kinds of N-linked oligosaccharides from glycoproteins) indicating that it corresponds to the fully processed glycosylated form of the receptor. Protocol used to perform these experiments may be found in supplemental materials and methods.

Figure S2. GBR does not induce a massive change in the NSF cellular distribution

CHO cells expressing or not GBR1a and GBR2 were transfected with a GFP-GRK5 plasmid. The co-localization between endogenous NSF (red) detected with appropriate antibodies and the GFP-GRK5 (green) protein used as a marker of the plasma membrane was assessed by confocal fluorescence microscopy as described in material and methods. Overlay panels at different Z position are presented and the regions where co-localization was detected are enlarged in inset.

Figure S3. Plasma membrane expression of GBR1 and GBR2 following GABA treatment

CHO cells stably expressing myc-GBR1b/HA-GBR2 were treated with 1mM GABA for the indicated period. The level of surface expression of each of the receptor was measured using ELISA assays (performed following SIGMA's instructions). Black and white bars correspond to the quantification of GBR1 and GBR2, respectively. These results represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates.

Figure 1

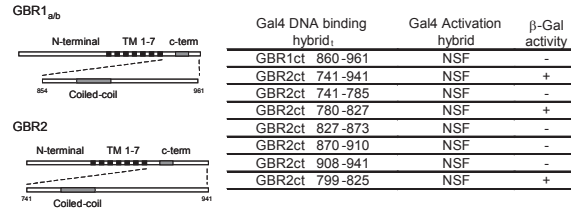
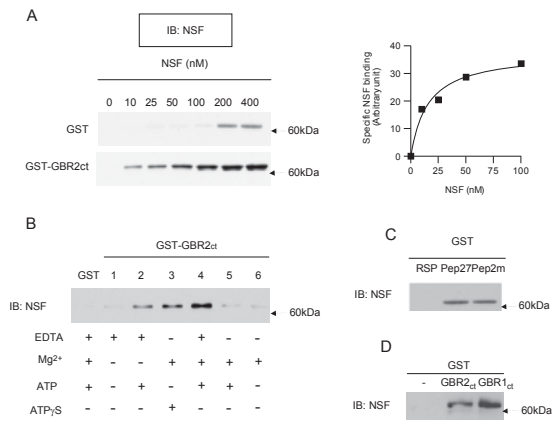
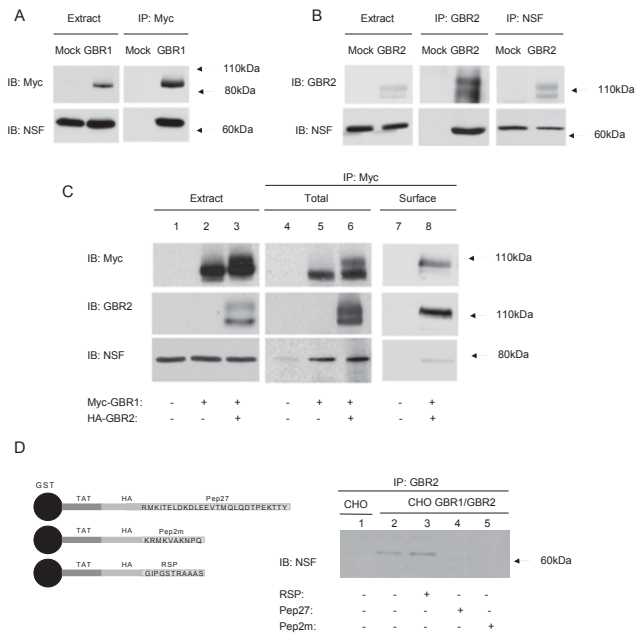


Figure 2



Pontier SM & *al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy

Figure 3



Pontier SM & *al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy

Figure 4

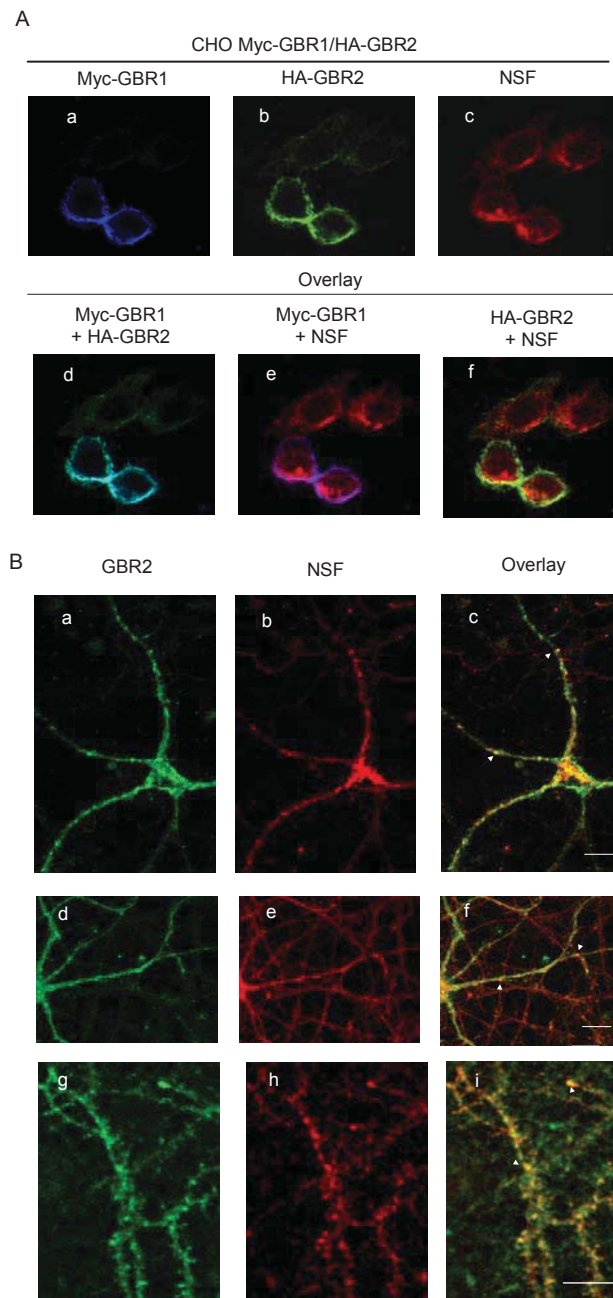
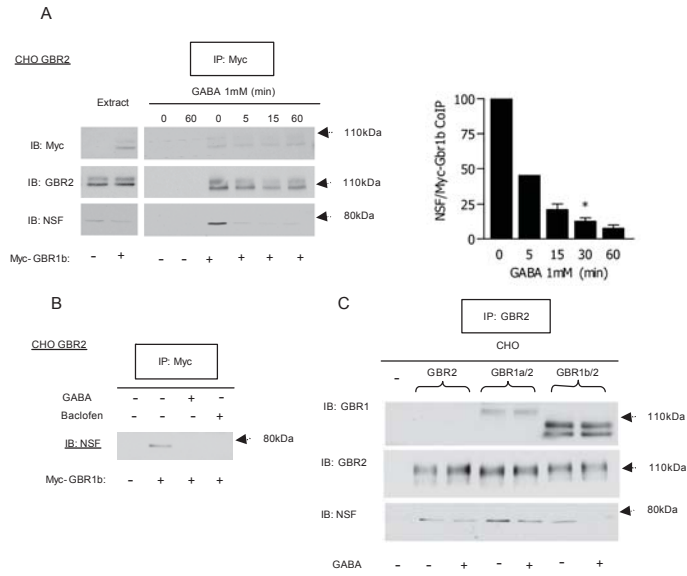
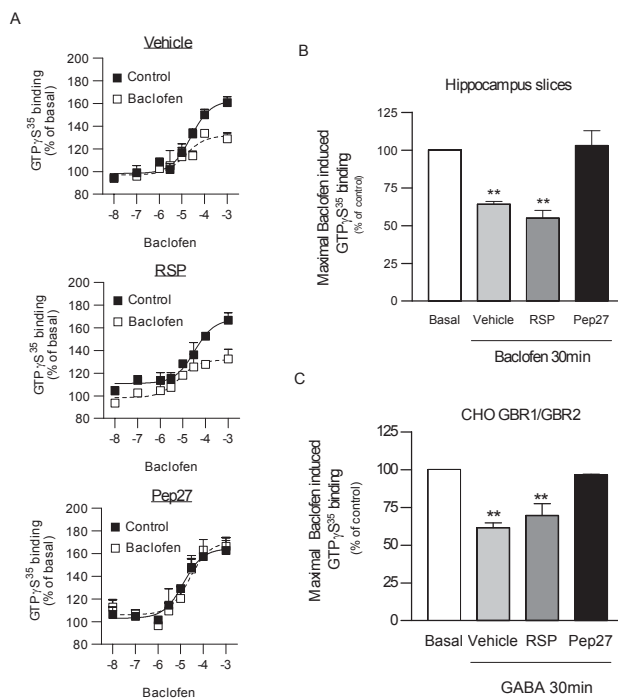


Figure 5



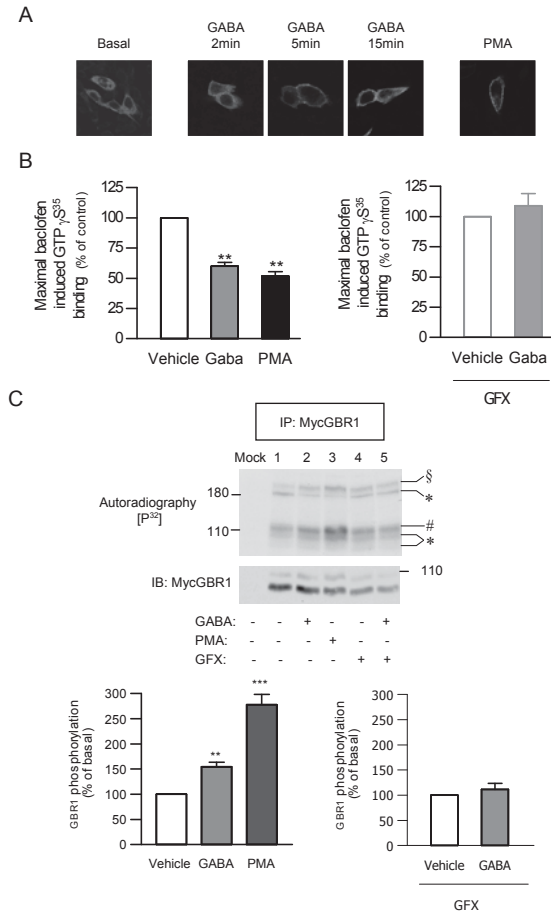
Pontier SM & *al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy

Figure 6



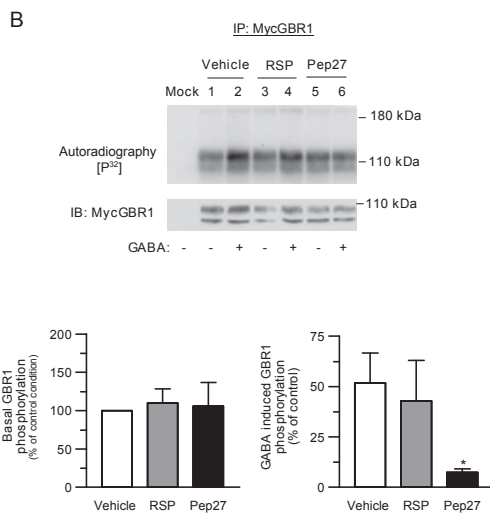
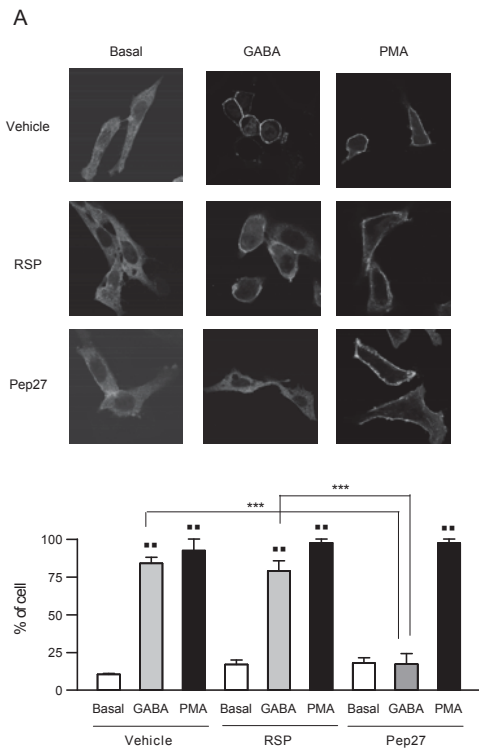
Pontier SM & *al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy

Figure 7



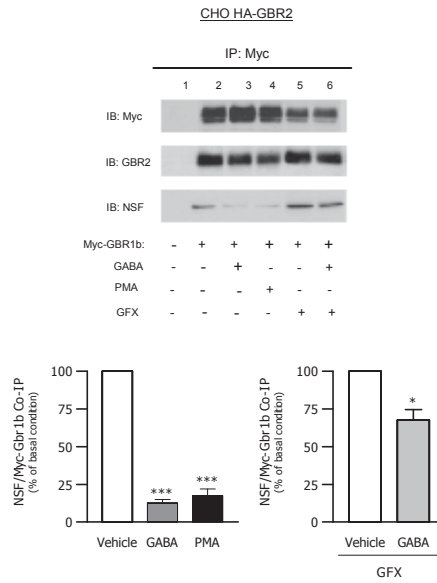
Pontier SM & *al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy

Figure 8



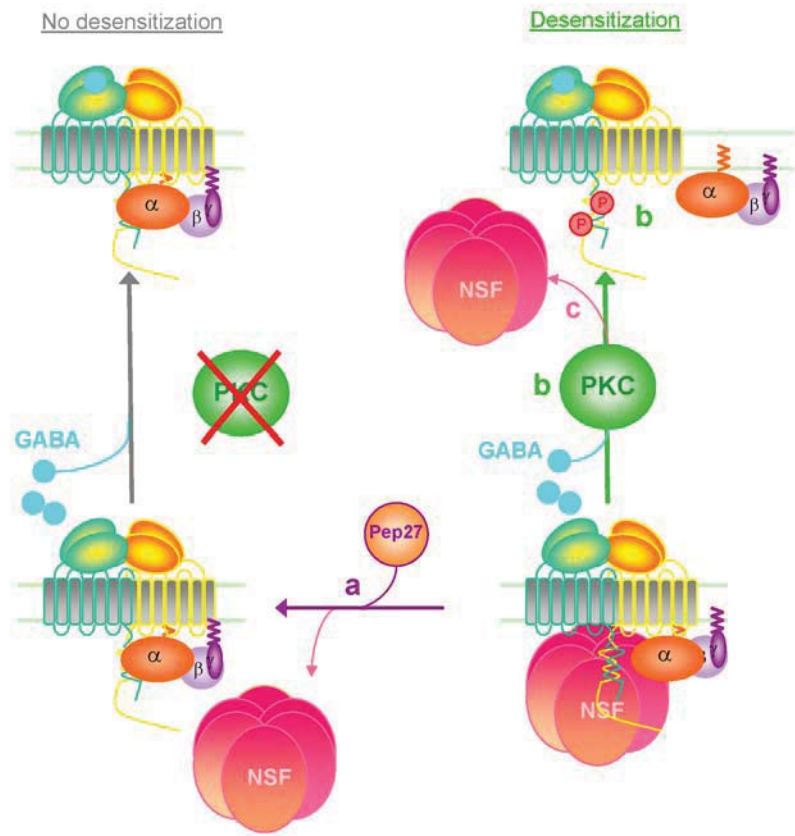
Pontier SM & *al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy

Figure 9



Pontier SM & *al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy

Figure 10



Pontier SM & *al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy

Figure S1

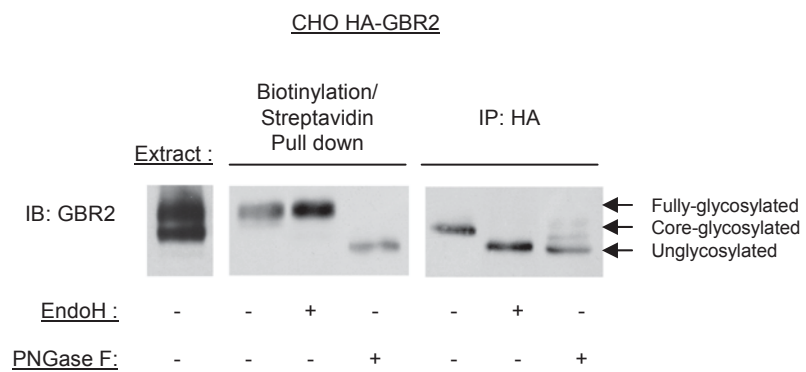


Figure S2

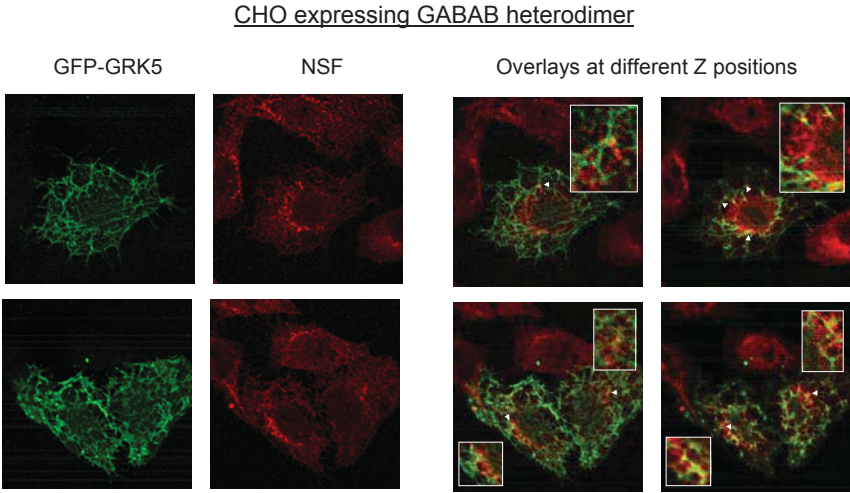
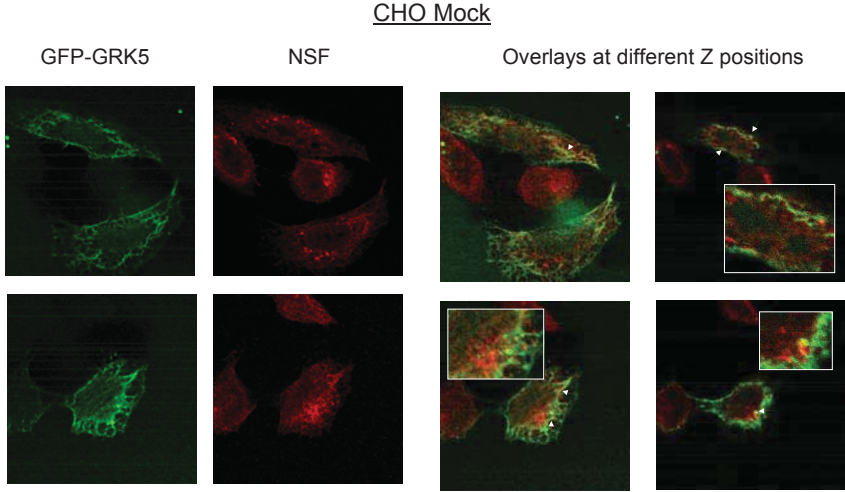
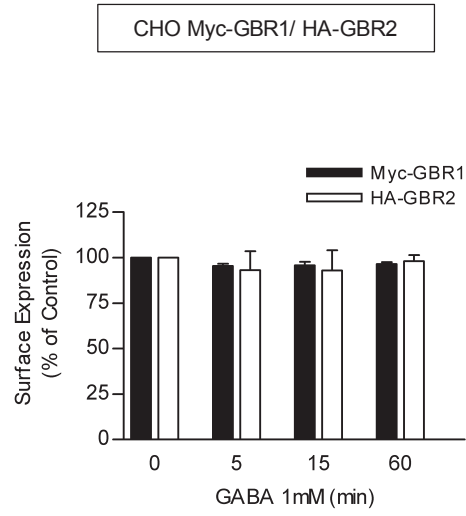


Figure S3



Article 2

Post-endocytotic deubiquitination and degradation of the GABA_B receptor by USP14

Nicolas Lahaie, Michaela Kralikova, Laurent Prézeau, Jaroslav Blahos et Michel Bouvier.
Soumission à *Journal of Biological Chemistry*, février 2014

Résumé

Les mécanismes contrôlant la stabilité à la surface cellulaire du récepteur métabotropique de l'acide γ -aminobutyrique (GABA_B) sont encore mal compris, car le récepteur n'est pas sujet à l'internalisation suite à la stimulation par un agoniste, mais est internalisé de façon constitutive et est rapidement dégradé. En quête de nouvelles protéines d'interaction régulant le destin du récepteur, nous rapportons qu'USP14 (*ubiquitin specific protease 14*) interagit directement avec la deuxième boucle intracellulaire de la sous-unité GABA_{B1}. Enquêtant sur l'ubiquitination du récepteur en utilisant le transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET), nous avons détecté l'ubiquitination du récepteur à la membrane plasmique, tant au niveau constitutif qu'en réponse au *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA). Le PMA augmente l'internalisation et accélère la dégradation du récepteur. Une surexpression d'USP14 diminue l'ubiquitination tandis qu'un traitement avec l'inhibiteur IU1 augmente l'ubiquitination du récepteur. Un co-traitement avec l'inhibiteur de l'endocytose Dynasore diminue l'effet de la surexpression d'USP14 et du traitement avec IU1, suggérant un site d'action post-endocytosique. La surexpression d'USP14 mène à une dégradation accélérée de GABA_B qui est indépendante de son activité catalytique. Nous proposons donc un modèle où l'ubiquitination à la surface cellulaire précède l'endocytose, après quoi USP14 agit comme une protéine de liaison de l'ubiquitine qui dirige le récepteur vers la dégradation lysosomale.

Contribution : J'ai contribué à l'ensemble de la conceptualisation, du design expérimental et de la génération des résultats, excepté les expériences de *Yeast two-hybrid*. J'ai écrit le manuscrit et procédé à l'ensemble du processus de révision.

Post-endocytotic deubiquitination and degradation of the GABA_B receptor by USP14

Nicolas Lahaie¹, Michaela Kralikova², Laurent Prézeau³, Jaroslav Blahos^{2#} and Michel Bouvier^{1#}

¹Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada

²Institute of Molecular Genetics, Academy of Science of the Czech Republic, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

³Institut de Génomique Fonctionnelle, University of Montpellier 1 and 2, Montpellier, France

Both contributed equally to the work.

Address correspondence to : MB; Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal (Québec) H3T 1J4, CANADA, E-mail : michel dot bouvier at umontreal dot ca

JB; Institute of Molecular Genetics, Academy of Science of the Czech Republic, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic E-mail : blahos at img dot cas dot cz

Keywords : GABA_B receptor, GPCR, ubiquitination, USP14, BRET, endocytosis

Background : GABA_B is constitutively endocytosed and has a short half-life.

Results : The GABA_B receptor is constitutively ubiquitinated. PKC promotes ubiquitination and degradation. GABA_B is de-ubiquitinated by USP14 following endocytosis.

Conclusion : USP14 promotes the lysosomal degradation of GABA_B.

Summary

Mechanisms controlling the metabotropic γ -aminobutyric acid receptor (GABA_B) cell surface stability are still poorly understood, as the receptor is not subject to agonist-promoted internalization, but is constitutively internalized and rapidly down-regulated. In search of novel interacting proteins regulating receptor fate, we report that the ubiquitin specific protease 14 (USP14) interacts directly with the GABA_{B(1)} sub-unit's second intracellular loop. Probing the receptor for ubiquitination using bioluminescence resonance energy transfer (BRET), we detected a constitutive and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced ubiquitination of the receptor at the cell surface. PMA increased internalization and accelerated receptor degradation. Overexpression of USP14 decreased ubiquitination while treatment with small molecule inhibitor IU1 increased receptor ubiquitination. Co-treatment with internalization inhibitor Dynasore blunted both USP14 overexpression and IU1 effects, suggesting a post-endocytic site of action. Overexpression of USP14 led to an accelerated degradation of GABA_B in a catalytically independent fashion. Thus, we propose a model where cell surface ubiquitination precedes endocytosis, after which USP14 acts as an ubiquitin-binding protein that target ubiquitinated receptor to lysosomal degradation.

Introduction

G protein coupled receptors (GPCR) are the largest family of cell-surface proteins in the human genome, and represent the target of more than 25% of current pharmacological agents. Regulation of GPCR activity in response to different stimuli provides cells with an important mechanism to fine tune the response to natural ligands and is thus important to take into account in drug design and therapeutic regimen. One of the GPCR that undergoes atypical regulation of its activity is the GABA_B receptor, an obligatory hetero-oligomer that is composed of two different 7TM proteins, GABA_{B(1)} and GABA_{B(2)} that provides the metabotropic response to the inhibitory neurotransmitter GABA (1).

For most GPCR, desensitization results from agonist-promoted phosphorylation by second messenger-activated and GPCR kinases (2), leading to β arrestin-promoted uncoupling from the G protein and endocytosis. In contrast, GABA_B receptor stimulation does not promote β arrestin engagement and receptor endocytosis. While two GRK isoforms (GRK4 and GRK5) (3) have been proposed to play a role in desensitization, for GRK4, this effect was found to be independent its kinase activity as its RGS domain alone is sufficient for desensitization of the receptor (4). Also in contrast with most GPCR, GABA_B activity is not correlated with the overall phosphorylation state of the receptor. Agonist-promoted protein kinase C (PKC) phosphorylation decreases receptor activity (5) while phosphorylation by adenosine monophosphate activated-kinase (AMPK) on GABA_{B(2)} serine 783 (6) and protein kinase A on GABA_{B(2)} serine 893 (7) have been linked to receptor sensitization and increased effector coupling. Finally, interaction of the receptor with members of the KCTD (potassium channel tetramerization domain containing proteins) family can also modulate receptor-effector coupling (8) adding yet another level of regulation.

Removal of agonist-desensitized receptor from the cell surface through internalization is a necessary step for receptor resensitization or degradation (9). GABA_B does not undergo agonist-promoted endocytosis (4, 5) but internalizes constitutively at a rapid rate (10), up to 50% of the receptor being removed from the cell surface in 2 hours. This phenomenon has been observed in both heterologous expression systems and primary neuron cultures (4, 11). The exact mechanism underlying constitutive internalization is not yet characterized, but it has been suggested that a direct interaction between the GABA_B receptor and the clathrin adaptor protein-2 (AP-2) complex could be involved (10). More recently, evidence has surfaced that glutamate receptor activation can control cell surface availability of GABA_B (12) through distinct mechanisms. The NMDA receptor promotes PP2A-mediated dephosphorylation of serine 783 on GABA_{B(2)} favoring the degradation over the recycling of the receptor (13). CamKII phosphorylation of serine 867 on GABA_{B(1)} promotes GABA_B endocytosis(14) in response to NMDA receptor activation. Involvement of AMPAR and mGluRs have also been suggested to have a role in glutamate mediated GABA_B down-regulation (15). None of the downstream cellular machinery linked to this process has been identified yet.

Among the mechanism controlling cell surface stability of GPCRs, ubiquitination has been increasingly shown to play an important role. Activity-dependant ubiquitination of β -arrestin has been linked to the early steps of endocytosis (16) whereas the ubiquitination state of the receptor has generally been linked to degradation (17) and in some cases to endocytosis (18). In the case

of the β 2-adrenergic receptor (β 2AR), members of the Nedd4 E3 ubiquitin ligases family have been shown to regulate receptor ubiquitination after recruitment by β -arrestin or arrestin domain-containing protein 3/4 (19, 20) while the deubiquitinases USP20 and USP33 were suggested to promote receptor recycling(21). In the case of the CXCR4 chemokine receptor, both ubiquitination by AIP4(22) and deubiquitination by USP14(23) are necessary for efficient CXCR4 degradation, in a mechanism that could suggest the importance of a ubiquitination/deubiquitination cycle. The deubiquitinase USP8 has also been shown to promote trafficking and degradation of CXCR4(24).

Using the second intracellular loop of the GABA_{B(1)} sub-unit in search of novel proteins interactions, we identified USP14 in a yeast-two hybrid screen. Considering the role of USP14 as a deubiquitinating enzyme, and the evidence suggesting that GABA_B ubiquitination could be linked to glutamate-mediated GABA_B down-regulation (15), we took advantage of a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay to measure real-time GABA_B ubiquitination in living cells (25) and assessed the role of USP14 in the de-ubiquitination and degradation of the GABA_B.

Materials and methods

Materials: pcDNA3-Myc- GABA_{B(1b)} , pcDNA3-Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, pcDNA3-HA-GABA_{B(2)} and pcDNA3-HA-GABA_{B(2)}-Rluc have been previously described (5, 26). pEYFP-Ubi and pEYFP-UbiAA were constructed as described in (25), but the human ubiquitin (Ubi) coding sequence was inserted in pEYFP-C1(Clontech) instead of pGFP²-C1. pcDNA3-USP14b and pcDNA3-USP14b-GFP were constructed by PCR from a human cDNA library and inserted in the pcDNA3 vector. Point mutation was done by PCR to create pcDNA3-USP14b-C79A and pcDNA3-USP14b-C79A-GFP. CXCR4-Rluc has been previously described in (27). pcDNA3-PAR-1-Rluc is a generous gift from Dr Terry Hébert (McGill University, Montreal, Canada).

Dynasore, chloroquine and MG132 were purchased from Sigma-Aldrich while GABA was from Calbiochem, IU1 from Cayman Chemical, coelenterazine h from Nanolight Technology and EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin from Thermo Scientific. All others chemicals were from Sigma.

Anti-Myc (9E10) was an ascyte prepared in house while anti-GFP was from Clontech. Anti-GABA_{B(2)} is a generous gift from GlaxoSmithKline(United Kingdom). Anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG secondary antibody coupled to horseradish peroxidase were from GE HealthCare Life Sciences.

Ubiquitination measure by BRET : To measure ubiquitination, a BRET-based assay monitoring the addition of ubiquitin-YFP to GABA_B subunits linked to Rluc was performed as previously described (26). Briefly, an ubiquitin mutant form of Ubi in which lysines 48 and 63, the two major sites for polyubiquitination, were mutated to alanine to avoid steric hindrance, quenching or other interference phenomena due to the presence of multiple YFP that could lead to a blunted BRET signal. BRET measurements are done as described in (29). Treatments were done directly in 6 or 12 wells-plates for the indicated time. Media was then removed, cells washed twice in PBS and resuspended in PBS. 100 000 cells were then transferred to 96-wells white plate and treated for 2 minutes with 5 μ M coelenterazine h before reading in a Berthold Mithras LB940 equipped with acceptor (530 \pm 20 nm) and donor (480 \pm 20 nm) filters.

Biotin labeling and streptavidin precipitation: Biotin labeling was modified from (10) . Cells were treated with EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (0.5 mg/mL in buffer A: 25 mM HEPES, pH 7.4, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 30 mM Glucose) at 4°C for 30 minutes, then washed 3 times with ice-cold buffer A. Cells were then either kept on ice (control) or treated with the appropriate compound at 37°C for the indicated chase time. Cells were solubilized in RIPA buffer and Biotin-labeled receptors purified by pull-down with streptavidin-sepharose beads and subjected to SDS-PAGE and Western Blotting with anti-Myc (9E10) mouse antibody. Quantification of the receptors remaining was done using a LAS-3000 from Fujifilm.

Internalization assay by ELISA: HEK293T cells were transfected with PEI and, the following day, cellswere transferred in a poly-D-Lysine coated 24 wells plate (200 000 cells per well). The following day, media was removed and cells were washed in ice-cold Buffer A. Cells were incubated with anti-Myc antibody (1:1000 in Buffer A containing 0.2% BSA) for one hour on ice,

then washed 3 times in cold Buffer A. Cells were then treated or not (vehicle) at 37°C for one hour. Following incubation, cells were washed in cold Buffer A and incubated with secondary antibody (anti-mouse IgG coupled to hrp) for 45 minutes. Cells were then washed three times and signal was measured after adding SIGMAFAST™.

Yeast two-hybrid: Sequence corresponding to the GABA_{B(1)} second intracellular loop (GB1i2, protein sequence: TKIWWVHTVFTKKEEKKEWRKTLEPWKLY) was introduced in a pGBT9 bait vector in frame with the Gal4 DNA-binding domain. The construct was screen against a commercially obtained rat brain cDNA library according to Clontech protocols (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The screening efficiency with pGBT9-GB1i2 bait was 5.1×10^6 and resulting in the identification of 24 positive colonies. Yeast-mating assays for GB1i2 binding were performed using yeast strains HF7c and Y187, with pGBT9 and pACT2 vectors. One of the positive clones, USP14, contained the cDNA coding for amino acid 239 to the stop codon and the untranslated region up to the poly A tail. The cDNA coding for the entire open reading frame was cloned from isolated rat brain RNA (reverse transcriptase, PCR amplification and TA-cloning system with blue-white selection (Invitrogen)) and sequenced.

Immunoprecipitation: IPs were done as described in (5) using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM DTT, 5 µg/mL leupeptine, 5 µg/mL soybean trypsin inhibitor, 10 µg/mL benzamidine). Anti-myc antibody was added in a 1:400 dilution. After 16 hours incubation, beads were washed 3 times with RIPA containing 350 mM of NaCl. Remaining complexes were dissolved in Laemmli buffer before being subjected to SDS-PAGE and Western blotting.

Statistical analysis: All statistical analysis were done using GraphPad Prism 5.0. Analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Dunnett or Tukey tests were used for multiple comparisons; Dunnett tests being used to compare multiple conditions to a single control, whereas Tukey tests were used to identify the difference within a group. Student *t* tests were performed for pairwise comparison.

Results

Identification of USP14 as a novel of GABA_B interactor

Using the evolutionary conserved second cytoplasmic loop of GABA_{B(1b)} as a bait in a yeast two-hybrid screen, we identified a rat cDNA encoding part of the catalytic domain of the Ubiquitin-Specific Protease 14 (USP14) (Figure 1A). The interaction between USP14 and GABA_{B(1b)} expressed alone or with GABA_{B(2)} in the context of the functional heterodimer was confirmed by co-immunoprecipitation studies in HEK293T cells co-expressing Myc-GABA_{B(1b)} alone or in combination with HA-GABA_{B(2)} and GFP-USP14b. As shown in Figure 1B, GFP-USP14b was detected by Western blot analysis following receptor immunoprecipitation. Considering that the interacting USP14 cDNA found in the yeast-two-hybrid screen encodes its catalytic domain, we tested whether the interaction was dependent on the deubiquitinase activity of USP14. For this purpose, we took advantage of a mutant form of USP14 (C79A-USP14) that is catalytically inactive (29). Immunoprecipitation revealed that both WT- and C79A-USP14 interacted to the same extent with the receptor, suggesting that USP14 deubiquitinase activity is not required for its interaction with GABA_B.

Probing GABA_B ubiquitination

To investigate the potential role of USP14 in the regulation of GABA_B ubiquitination, we first assessed whether GABA_B ubiquitination can be measured in living cells using a BRET-based ubiquitination assay (25). BRET titration curves using receptor sub-units genetically fused to Renilla Luciferase (Rluc) and a genetically engineered ubiquitin construct linking its N-terminus to an enhanced Yellow Fluorescent Protein (YFP)(25). To assess the amount of ubiquitinated receptor, an increasing amount of Ubi-YFP was co-expressed with a stable amount of either GABA_{B(1b)}-Rluc or GABA_{B(2)}-Rluc with the associated partner sub-unit. A C-terminal mutated ubiquitin missing the terminal glycine residues that cannot be conjugated to its substrate and linked to YFP (UbiAA-YFP) was used as a negative control.

As shown in Figure 2, increasing Ubi-YFP led to a hyperbolic increase of the BRET signal either GABA_{B(1b)}-Rluc (Fig 1A) or GABA_{B(2)}-Rluc (Fig 1B) when expressed in the presence of their untagged cognate partner subunit (GABA_{B(2)} and GABA_{B(1b)} respectively). The selectivity of the BRET signal is confirmed by the saturability of the signal corresponding to the occupancy of specific ubiquitination sites. Also, co-expression of UbiAA-YFP led to a modest linear increase of the BRET signal no discernible plateau, that correspond to the background signal resulting from random collisions (30). The specific signal of ubiquitination was calculated by subtracting the background BRET signal from the total signal observed. Although a similar specific signal is measured whether the GABA_{B(1b)} or GABA_{B(2)} is tagged with luciferase within the heterodimer, the expression of GABA_{B(1b)}-Rluc alone, which is retained in the ER in the absence of GABA_{B(2)}, led to a weaker specific ubiquitination signal (Figure S1) suggesting that some of the ubiquitination signal originates from plasma membrane receptors. Consistent with this notion, a larger ubiquitination BRET signal is observed when using a mutant form of the GABA_{B(1)} that can reach the plasma membrane (GABA_{B(1b)}-ASRR) in the absence of GABA_{B(2)} (31)(Figure S1). In order to study ubiquitination of the a functional heterodimer that can reach plasma membrane the GABA_{B(1b)}-Rluc/GABA_{B(2)} pair was used throughout the study.

Stimulation of the receptor with either GABA or baclofen was without effect on the ubiquitination signal (Fig3A and S2). Similarly, no effect was observed upon treatment with the GABA_B antagonist, CGP54626 indicating that neither agonist-promoted nor constitutive activation of the receptor had a direct effect on its ubiquitination level. Since GABA_B activity has long-been known to be down-regulated by PKC(32), we assess the effect of the PKC activator, PMA (phorbol-13-myristate-12-acetate), on receptor ubiquitination. Treatment with PMA led to a transient increase in the ubiquitination signal that peaked (163% ±14%) at 4 hours post-treatment and returned to basal level at 24 hours (Figure 3A). This increase was blocked by pre-treatment with the PKC inhibitor Bisindolylmaleimide I, indicating a specific PKC-mediated effect (Figure S3).

PMA promotes faster degradation and internalization of GABA_B

As ubiquitination has been linked to the degradation of several membrane proteins including a few GPCR, we assessed the effect of PMA treatment on the degradation of GABA_B using HEK293 cells co-expressing Myc-GABA_{B(1b)} and HA-GABA_{B(2)}. Cells were biotinylated at 4°C and receptor level was assessed using a streptavidin pull-down followed by Western blotting of either GABA_{B(1b)} or GABAB2. Under basal conditions, the half-life of the plasma-membrane targeted receptor was found to be 2.4 h ± 0.6 h (Figure 3B, 3D) ; the half-life observed being the same whether we monitored GABA_{B1} or GABA_{B2} immuno-reactivity (Figure S4). Treatment with PMA led to a significant (P<0.05) increase in the rate of degradation (half-life = 1.0 h ± 0.3 h), suggesting a PKC-mediated acceleration of receptor degradation (Figure 3C, 3D). To investigate whether this cell surface disappearance results from proteasomal or lysosomal degradation, we treated cells with the lysosomal acidification inhibitor chloroquine or the proteasomal inhibitor MG132. MG132 had no effect on receptor degradation while chloroquine inhibited most of the disappearance (Figure 3E, 3F).

Given that GABA_B has been shown to have a rapid rate of constitutive endocytosis that contributes to degradation (11), the decrease in receptor-half life detected could result either from an accelerated rate of internalisation or a greater targeting of endocytosed receptors to lysosomal degradation resulting in reduced recycling. To distinguish between these two possibilities, we assessed the effect of PMA on internalization. For this purpose, we labeled GABA_B heterodimer with Myc-targeted antibody at 4°C and induced constitutive internalization by switching the temperature to 37°C thus monitoring only the disappearance from the plasma membrane. Two hour after temperature switch, 24 ± 4 % of the receptor had ben internalized under basal condition (Figure 4A). Treatment with GABA did not increase the extent of internalization confirming earlier reports that the receptor does not undergo agonist-promoted internalization (4, 33). In contrast, treatment with PMA led to a significant (P<0.05) 33% increase of endocytosis suggesting that the PMA-accelerated degradation resulted at least in part from an increased internalization. Pre-treatment of cells with the cell-permeable dynamin inhibitor blunted the measured internalization.

To probe whether the ubiquitination of the receptor occurs at the cell surface or in the endosomes following internalization, we assessed the effect of a general blocker of dynamin-dependent endocytosis, Dynasore, on both receptor internalisation and ubiquitination. Dynasore significantly (P<0.01) blunted both constitutive (54% inhibition) and PMA-induced (63%

inhibition) internalization (Figure 4A). The Dynasore-mediated block in endocytosis was accompanied by a 40% increase in the basal ubiquitination, suggesting that the modification occurs before internalization of the receptor (Figure 4B). Co-treatment with both PMA and Dynasore led to an additive increase in BRET signal, indicating that the PMA-promoted increase in ubiquitination also occurs at the plasma membrane (Figure 4C).

USP14 regulates GABA_B ubiquitination and degradation

To assess the potential role of USP14 in GABA_B regulation we first assess the effect of the deubiquitinase over-expression on the ubiquitination state of the receptor. Co-expression of USP14b with the GABA_B receptor led to a 25% decrease in receptor ubiquitination whereas the catalytically inactive deubiquitinase did not affect the basal level of ubiquitination (Figure 5A), indicating that USP14 catalyzed the deubiquitination of GABA_B. Furthermore, treatment with IU1, a recently discovered inhibitor of USP14 (29), led to a significant ($P < 0.01$) time-dependent increase in GABA_B ubiquitination (Figure 5B). The observation that IU1 increased GABA_B ubiquitination in cells overexpressing or not USP14 suggests that this enzyme is responsible for the endogenous constitutive deubiquitination of the receptor. To assess whether USP14 acts as a general deubiquitination enzyme of GPCR, we tested the effect of USP14 overexpression on 3 additional receptors. As previously reported (23), USP14 reduced CXCR4 ubiquitination (Figure S5). Similarly, the ubiquitination level of the type-2 vasopressin receptor was also decreased by the enzyme whereas it did not alter PAR-1 ubiquitination suggesting some level of selectivity in its GPCR substrates.

Given the proposed roles of ubiquitination on the internalization and degradation of membrane proteins, we assess the effect of USP14 on these processes for the GABA_B. Co-expression of USP14b with GABA_B lead to a significant acceleration of the degradation rate of the receptor; reducing the half life of the receptor from 3 hours to less than 1 hour (Figure 5C,5D,5G,5H). Surprisingly, the catalytically inactive USP14-C79A accelerated receptor degradation to the same extent as the WT form of the enzyme (Figure 5E,5G,5H), suggesting that the USP14-promoted degradation is independent of its deubiquitinase activity. Consistent with this notion, treatment of cells with the USP14 inhibitor IU1 did not significantly affect degradation (Figure 5F, 5G, 5H), also suggesting that the deubiquitinase activity of USP14 does not contribute to GABA_B degradation. In contrast to the PMA treatment that increased both the degradation and the endocytosis of the receptor, neither USP14b overexpression nor IU1 treatment affect the extent of internalization (Figure S6), indicating that USP14-promote GABA_B degradation is independent of the receptor internalization rate suggesting a post-endocytic mechanism.

USP14 acts as a post-endocytosis regulator of GABA_B

To determine whether USP14 acts pre or post-endocytosis, its deubiquitination activity was tested in the presence and absence of the internalization inhibitor Dynasore. As shown in Figure 6A, treatment with dynasore led to a time-dependent decrease of the deubiquitination promoted by USP14 overexpression indicating a post-endocytosis action of USP14. Consistent with this hypothesis, the ubiquitination increase observed following USP14 inhibition with IU1 was blunted upon Dynasore co-treatment (Figure 6B).

Discussion

In the present study, we showed that GABA_B is constitutively ubiquitinated in living cells and that this post-translational modification occurs, at least in part, once the receptor has reached the cell surface. Increased ubiquitination promoted by PKC activation is accompanied by an increase in GABA_B internalization and accelerated degradation. Deubiquitination of the receptor is catalyzed post-endocytically by the deubiquitinase USP14 that contributes to the targeting of the receptor for lysosomal degradation. In addition to further our understanding of the constitutive ubiquitination and cell surface regulation of GABA_B, our study unravels a new PKC-mediated regulation of this post-translational modification and identifies USP14 as an important regulator of both receptor ubiquitination and degradation.

A role for PKC in the regulation of GABA_B had been previously suggested as PKC has been shown to phosphorylate (5) and down-regulate synaptic activity of GABA_B (32). Although the role of PKC-mediated phosphorylation of GABA_B in its ubiquitination remains to be investigated, phosphorylation of other substrates such as the gap junction protein connexin-43 (34) and the organic anion transporter-1 (35) by PKC has been shown to promote their ubiquitination, resulting in their degradation and internalization respectively. In the case of GABA_B, we found that inhibition of endocytosis led to an increased level of both constitutive and PMA-induced ubiquitination, indicating that the PKC-promoted modification occurred at the plasma membrane and preceded endocytosis. Combined with our observation that PMA treatment led to an elevation of both ubiquitination and endocytosis, these results are consistent with the findings for other membrane proteins that increased ubiquitination promotes endocytosis (36). In the case of the epidermal growth factor receptor, agonist-stimulated ubiquitination was shown to promote internalization through the recruitment of the ubiquitin binding adaptor Epsin, and AP-2 (37). In contrast, receptor ubiquitination at the plasma membrane was found to inhibit the constitutive internalization of another GPCR, PAR1, whereas agonist-promoted deubiquitination favored its endocytosis (18). It should be emphasized, however that PAR1 may represent a special case since this receptor is activated by proteolytic cleavage of its N-terminus resulting in a continuous activation that requires degradation for its inactivation. Further studies will be needed to determine whether ubiquitination directly favours internalization of GABA_B through the recruitment of endocytosis machinery elements.

The observation that stimulation of GABA_B by its agonists GABA and baclofen did not affect the extent of receptor ubiquitination contrasts with what was observed for several GPCRs such as the β 2AR (16, 19) and CXCR4 (38). In those cases, agonist-promoted β arrestin recruitment brings E3 ubiquitin ligases to the receptors, promoting ubiquitination. In contrast, GABA_B stimulation has not been found to promote β arrestin recruitment and internalization (4, 33), nor promote receptor down-regulation (11) consistent with the lack of agonist-stimulated ubiquitination observed. The process leading to the constitutive ubiquitination of GABA_B and the identity of the E3 ligase involved remains to be investigated. However, our data clearly identify USP14 as a deubiquitinase that regulates the ubiquitination state of GABA_B. This action of USP14 was blocked by an inactivating mutation of its catalytic domain, indicating that this diminution is due to deubiquitination of the receptor and not to a decrease in *de novo* receptor ubiquitination. The

USP-14 deubiquitination was significantly blunted by inhibition of the endocytotic process by Dynosore indicating that the deubiquitination occurred following the internalization of the receptor. This is consistent with the observation that USP14 overexpression led to an accelerated rate of GABA_B lysosomal degradation. Such a role for USP14 in the post-endocytic processing of GPCRs has been observed for the CXCR4. Indeed, knock-down of USP14 expression was found to block receptor degradation following stimulation with its agonist CXCL12 (23). Another deubiquitinase, USP8, was also found to promote the agonist-stimulated degradation of CXCR4 through its interaction with the endosomal sorting machinery (24), suggesting a general role of deubiquitinating enzymes in post-endocytic GPCR sorting.

In contrast to its proposed role of deubiquitination-promoted degradation of CXCR4 (23), the USP14-accelerated rate of degradation of GABA_B was found to be independent of its catalytic activity in our study, as the inactive enzyme showed a similar ability to decrease the receptor's half-life as its wild type counterpart. This result suggests that USP14 action on the GABA_B receptor stability derives from a direct action from its interaction with the receptor and is not a by-product of the deubiquitination. Such a non-catalytic action of USP14 has been proposed for its role on the activation of the 20S proteasome. Indeed direct interaction between USP14 and the ubiquitin chain was found to promote the opening of the proteasome, leading to the degradation of the deubiquitinase cargo (39).

Taken together, our results suggest a novel mechanism controlling GABA_B cell surface expression that involves receptor ubiquitination and the binding of USP14 to promote receptor degradation. The proposed model (Figure 7) shows cell surface ubiquitination of the GABA_B receptor occurring constitutively or promoted by PMA. Upon endocytosis, USP14 acts as a catalytically-independent ubiquitin-binding protein to promote endosomal sorting of highly ubiquitinated GABA_B toward lysosomal degradation. In such a model, non-ubiquitinated receptor would not bind to USP14 and would be targeted toward the recycling pathway allowing reinsertion of the receptor in the plasma membrane leading to the resensitization of the cells to GABA stimulation. Interestingly, glutamate has been shown to promote internalization (14) and down-regulation of GABA_B (40), that involves a balance between receptor recycling and degradation (41) in which ubiquitination plays an important roles, mirroring multiple elements from our proposed model. Further studies are needed to examine the possible links between glutamate-mediated down-regulation and USP14-promoted degradation of GABA_B.

The proposed role of USP14 in receptor regulation may have important physiological consequences. Indeed, a transgenic mouse model with an invalidated USP14 gene (USP14 knock-out) also known as the ataxia mice, shows profound defects in synaptic transmission (42). These defects have been shown to result in part from an increased GABA_A cell surface expression and activity that is due to altered endosomal sorting and decreased receptor degradation(43), suggesting a similar role of USP14 on GABA_A and GABA_B. Also, the ataxia mice show a reduction in the size of the releasable vesicle pool that results in altered neurotransmitter release (44). The GABA_B receptor being directly involved in regulating vesicle priming at the release site (45), it is tempting to speculate that that USP14 knock-down promotes increased level of synaptic GABA_B receptor through reduced degradation, leading to an amplified GABA_B activity and reduced releasable vesicle priming. Consistent with this hypothesis, the decreased size of the

releasable vesicle pool was rescued by expression of the catalytically inactive USP14 mutant (46), mirroring our finding of a catalytic-independent role of USP14.

In conclusion, our study reveals a new PKC-mediated regulatory mechanism controlling GABA_B ubiquitination, endocytosis and degradation and identifies USP14 as a deubiquitinating enzyme that regulates the post-endocytic ubiquitination state and degradation of the GABA_B with potential implications for synaptic transmission.

Acknowledgments

These studies were supported by the Canadian Institutes of Health and Research (CIHR) (MOP 10501) and the Czech Science Foundation (GACR P303/12/2408). N.L. was the recipient of a Canadian Graduate Scholarship from the CIHR. MB holds the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. The authors are thankful to Dr. Monique Lagace for her expert assistance throughout these studies and her critical reading of the manuscript.

References

1. White, J. H., Wise, a, Main, M. J., Green, a, Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, a a, Emson, P., Foord, S. M., and Marshall, F. H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**, 679–82
2. 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
3. Kanaide, M., and Uezono, Y. (2007) Desensitization of GABAB receptor signaling by formation of protein complexes of GABAB2 subunit with GRK4 or GRK5. *J. Cell. ...* **245**, 237–245
4. Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chénier, S., and Bouvier, M. (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* **22**, 3816–24
5. Pontier, S. M., Lahaie, N., Gingham, R., St-Gelais, F., Bonin, H., Bell, D. J., Flynn, H., Trudeau, L.-E., McIlhinney, J., White, J. H., and Bouvier, M. (2006) Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *EMBO J.* **25**, 2698–709
6. Kuramoto, N., Wilkins, M. E., Fairfax, B. P., Revilla-Sanchez, R., Terunuma, M., Tamaki, K., Iemata, M., Warren, N., Couve, A., Calver, A., Horvath, Z., Freeman, K., Carling, D., Huang, L., Gonzales, C., Cooper, E., Smart, T. G., Pangalos, M. N., and Moss, S. J. (2007) Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron* **53**, 233–47
7. Couve, A, Thomas, P., Calver, A R., Hirst, W. D., Pangalos, M. N., Walsh, F. S., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2002) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nat. Neurosci.* **5**, 415–24
8. Schwenk, J., Metz, M., Zolles, G., Turecek, R., Fritzius, T., Bildl, W., Tarusawa, E., Kulik, A., Unger, A., Ivankova, K., Seddik, R., Tiao, J. Y., Rajalu, M., Trojanova, J., Rohde, V., Gassmann, M., Schulte, U., Fakler, B., and Bettler, B. (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* **465**, 231–5
9. Hanyaloglu, A. C., and von Zastrow, M. (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**, 537–68
10. Grampp, T., Sauter, K., Markovic, B., and Benke, D. (2007) Gamma-aminobutyric acid type B receptors are constitutively internalized via the clathrin-dependent pathway and targeted to lysosomes for degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 24157–65
11. Grampp, T., Notz, V., Broll, I., Fischer, N., and Benke, D. (2008) Constitutive, agonist-accelerated, recycling and lysosomal degradation of GABA(B) receptors in cortical neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**, 628–37

12. Vargas, K. J., Terunuma, M., Tello, J. a, Pangalos, M. N., Moss, S. J., and Couve, A. (2008) The availability of surface GABA B receptors is independent of gamma-aminobutyric acid but controlled by glutamate in central neurons. *J. Biol. Chem.* **283**, 24641–8
13. Terunuma, M., Vargas, K. J., Wilkins, M. E., Ram`virez, O. A., Jaureguiberry-Bravo, M., Pangalos, M. N., Smart, T. G., Moss, S. J., and Couve, A. (2010) Prolonged activation of NMDA receptors promotes dephosphorylation and alters postendocytic sorting of GABAB receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13918
14. Guetg, N., Aziz, S. A., Holbro, N., Turecek, R., Rose, T., Seddik, R., Gassmann, M., Moes, S., Jenoe, P., Oertner, T. G., Casanova, E., and Bettler, B. (2010) NMDA receptor-dependent GABAB receptor internalization via CaMKII phosphorylation of serine 867 in GABAB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13924–13929
15. Maier, P. J., Marin, I., Grampp, T., Sommer, A., and Benke, D. (2010) Sustained glutamate receptor activation downregulates GABA(B) receptors by shifting the balance from recycling to lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.* **285**, 35606-35614
16. 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**, 1307–13
17. Sarker, S., Xiao, K., and Shenoy, S. K. (2011) A tale of two sites: How ubiquitination of a G protein-coupled receptor is coupled to its lysosomal trafficking from distinct receptor domains. *Commun. Integr. Biol.* **4**, 528–31
18. Wolfe, B. L., Marchese, A., and Trejo, J. (2007) Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. *J. Cell Biol.* **177**, 905–16
19. Shenoy, S. K., Xiao, K., Venkataramanan, V., Snyder, P. M., Freedman, N. J., and Weissman, A. M. (2008) Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 22166–76
20. Nabhan, J. F., Pan, H., and Lu, Q. (2010) Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO Rep.* **11**, 605–11
21. Berthouze, M., Venkataramanan, V., Li, Y., and Shenoy, S. K. (2009) The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J.* **28**, 1684–96
22. Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J. H., Stenmark, H., and Benovic, J. L. (2003) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev. Cell* **5**, 709–22
23. Mines, M. a, Goodwin, J. S., Limbird, L. E., Cui, F.-F., and Fan, G.-H. (2009) Deubiquitination of CXCR4 by USP14 is critical for both CXCL12-induced CXCR4 degradation and chemotaxis but not ERK ativation. *J. Biol. Chem.* **284**, 5742–52

24. Berlin, I., Higginbotham, K. M., Dise, R. S., Sierra, M. I., and Nash, P. D. (2010) The deubiquitinating enzyme USP8 promotes trafficking and degradation of the chemokine receptor 4 at the sorting endosome. *J. Biol. Chem.* **285**, 37895–908
25. Perroy, J., Pontier, S., Charest, P., Aubry, M., and Bouvier, M. (2004) Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat. Methods* **1**, 203–208
26. Villemure, J.-F., Adam, L., Bevan, N. J., Gearing, K., Chénier, S., and Bouvier, M. (2005) Subcellular distribution of GABA(B) receptor homo- and hetero-dimers. *Biochem. J.* **388**, 47–55
27. Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbé-Jullié, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 34666–73
28. Breton, B., Lagacé, M., and Bouvier, M. (2010) Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the alpha2A-adrenergic receptor, Galphai1beta1gamma2, and GRK2. *FASEB J.* **24**, 4733–43
29. Lee, B.-H., Lee, M. J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Chen, P.-C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gygi, S. P., Wilson, S. M., King, R. W., and Finley, D. (2010) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* **467**, 179–84
30. 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**, 44925–31
31. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001) Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14649–54
32. Dutar, P., and Nicoll, R. A. (1988) Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* **1**, 585–91
33. Fairfax, B. P., Pitcher, J. a, Scott, M. G. H., Calver, A. R., Pangalos, M. N., Moss, S. J., and Couve, A. (2004) Phosphorylation and chronic agonist treatment atypically modulate GABAB receptor cell surface stability. *J. Biol. Chem.* **279**, 12565–73
34. Leithe, E., and Rivedal, E. (2004) Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J. Biol. Chem.* **279**, 50089–96
35. Li, S., Zhang, Q., and You, G. (2013) Three ubiquitination sites of organic anion transporter-1 synergistically mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Mol. Pharmacol.* **84**, 139–46
36. Haglund, K., and Dikic, I. (2012) The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J. Cell Sci.* **125**, 265–75

37. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2760–5
38. Marchese, a, and Benovic, J. L. (2001) Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J. Biol. Chem.* **276**, 45509–12
39. Peth, A., Besche, H. C., and Goldberg, A. L. (2009) Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol. Cell* **36**, 794–804
40. Maier, P. J., Marin, I., Grampp, T., Sommer, A., and Benke, D. (2010) Sustained glutamate receptor activation down-regulates GABAB receptors by shifting the balance from recycling to lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.* **285**, 35606–14
41. Kuramoto, N., Ito, M., Saito, Y., Niihara, H., Tanaka, N., Yamada, K.-I., Yamamura, Y., Iwasaki, K., Onishi, Y., and Ogita, K. (2013) Dephosphorylation of endogenous GABA(B) receptor R2 subunit and AMPK α subunits which were measured by in vitro method using transfer membrane. *Neurochem. Int.* **62**, 137–44
42. Wilson, S. M., Bhattacharyya, B., Rachel, R. a, Coppola, V., Tessarollo, L., Householder, D. B., Fletcher, C. F., Miller, R. J., Copeland, N. G., and Jenkins, N. a (2002) Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nat. Genet.* **32**, 420–5
43. Lappe-Siefke, C., Loebrich, S., Hevers, W., Waidmann, O. B., Schweizer, M., Fehr, S., Fritschy, J.-M., Dikic, I., Eilers, J., Wilson, S. M., and Kneussel, M. (2009) The ataxia (axJ) mutation causes abnormal GABAA receptor turnover in mice. *PLoS Genet.* **5**, e1000631
44. Bhattacharyya, B. J., Wilson, S. M., Jung, H., and Miller, R. J. (2012) Altered neurotransmitter release machinery in mice deficient for the deubiquitinating enzyme Usp14. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C698–708
45. Sakaba, T., and Neher, E. (2003) Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* **424**, 775–8
46. Walters, B. J., Hallengren, J. J., Theile, C. S., Ploegh, H. L., Wilson, S. M., and Dobrunz, L. E. (2013) A catalytic independent function of the deubiquitinating enzyme USP14 regulates hippocampal short-term synaptic plasticity and vesicle number. *J. Physiol.*

FIGURE 1. GABA_B interacts with USP14 through its GABA_{B1} sub-unit. *A*, Schematic representation of the GABA_{B(1)} second intracellular loop used as bait and the USP14 region recovered in a rat brain cDNA yeast two-hybrid screening. *B*, HEK293T cells expressing a combination of Myc-GABA_{B(1b)}, HA-GABA_{B(2)}, GFP-USP14b and/or GFP-USP14b-C79A solubilized and immunoprecipitated (IP) using an anti-myc antibody. Total (input, 5% of IP) and IP samples were separated on SDS-PAGE and proteins detected by Western Blotting (WB) using the indicated antibodies (anti-myc for GABA_{B(1b)}, anti GABA_{B(2)} for GABA_{B(2)} and anti-GFP for USP14). The results shown are representative of three independent experiments.

FIGURE 2. BRET titration curves of GABA_B heterodimer with MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP. BRET signal, total fluorescence and total luminescence were measured in HEK293T cells transfected with constant amount of Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc and HA-GABA_{B(2)} (*A*) or Myc-GABA_{B(1b)} and HA-GABA_{B(2)}-Rluc (*B*), and increasing amount of either MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP. The data obtained in two independent experiments were pooled and used to generate the curves. The specific ubiquitination BRET curves were obtained by subtracting the UbiAA-YFP curve from the MonoUbi-YFP curve.

FIGURE 3. PMA increases ubiquitination and accelerates lysosome-mediated degradation of GABA_B. *A*, HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, HA-GABA_{B(2)} and either MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP were treated for the indicated time with either vehicle, 1 mM GABA or 1 μ M PMA. UbiAA-YFP signal was subtracted from MonoUbi-YFP signal. The results are presented as the mean \pm SEM of at least five independent experiments performed in quadruplicates. *B-D*, HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)} and HA-GABA_{B(2)} were labeled with EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin and either kept on ice (control) or switched at 37°C with vehicle (*B*) or 100 nM PMA (*C*) for the indicated time. After cell solubilization, biotin-labeled receptors were purified by pull-down with streptavidin-sepharose beads and detected with anti-Myc (9E10) mouse antibody. Receptors remaining after the chase period were quantified and are plotted in *D*. The results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. *E-F*, As described for *B-C*, but the temperature switch at 37°C was done for only two hours in the presence of vehicle, 200 μ M chloroquine or 5 μ g/mL MG132. The results (*D,F*) are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The results shown (*B,C,E*) are representative of at least 3 independent experiments.

(* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001)

FIGURE 4. Internalization inhibitor Dynasore blocks PMA induced internalization and promote constitutive and PMA induced ubiquitination. *A*, HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc and HA-GABA_{B(2)} were labeled with anti-Myc 9E10 antibody for one hour on ice. Internalization was then induced at 37°C for two hours in the presence of vehicle, 1 mM GABA, 1 μM PMA and/or 50 μM Dynasore, while control cells were kept on ice. Receptor amount still at the cell surface were measured by ELISA. The results are presented as the mean ± SEM of at least four independent experiments performed in quadruplicates. *B-C*, HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, HA-GABA_{B(2)} and either MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP were treated or not (vehicle) for two hours with 50 μM Dynasore (*B and C*) and/or 1 μM PMA (*C*). UbiAA-YFP signal was subtracted from MonoUbi-YFP signal. The results are presented as the mean ± SEM of at least three to five independent experiments performed in quadruplicates. Inset shows the PMA-induced BRET increase and was calculated by subtracting the PMA treated-BRET signal with the control counterpart. (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001)

FIGURE 5. USP14 deubiquitinates GABA_B and accelerates its degradation rate. *A*, HEK293T cells were transfected with Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, HA-GABA_{B(2)}, either MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP along with pcDNA3, USP14 or USP14-C79A. BRET signals were measured and the specific BRET signal calculated. *B*, HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, HA-GABA_{B(2)}, MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP and either pcDNA3 or USP14 were treated for three or sixteen hours with 100 μM IU1, and the specific BRET signal calculated. *C-H*, HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}, HA-GABA_{B(2)} and either pcDNA3 (*C,F*), USP14 (*D*) or USP14-C79A (*E*) were labeled with EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin and treated with either vehicle (*C-E*) or 100 μMIU1 (*F*) for the indicated time as described in figure 3. The Receptors remaining after the chase period were quantified (*G*) and half-life calculated (*H*).The results (*A,B,G,H*) are presented as the mean ± SEM of at least three independent experiments performed in triplicates. The results shown (*C-F*) are representative of 3 independent experiments. (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001)

FIGURE 6. USP14 deubiquitination is decreased by internalization inhibitor Dynasore. *A*, HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}, HA-GABA_{B(2)}, MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP and either pcDNA3 or USP14 were treated for two or sixteen hours with vehicle or 50 μM Dynasore and specific BRET signal calculated. Inset shows the percentage of inhibition of USP14 and calculated as the USP14 signal minus pcDNA3 signal divided by pcDNA3 signal. The results are presented as the mean ± SEM of at least three independent experiments performed in triplicates.

B, HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, HA-GABA_{B(2)} and either MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP were treated for two or sixteen hours with vehicle or 50 μ M Dynasore. Inset shows the percentage of IU1 induced BRET and is calculated by subtracting vehicle from IU1 treated condition and dividing by vehicle condition. The results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in triplicates. (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001)

FIGURE 7. Proposed model of GABAB ubiquitination and USP14 mediated post-endocytosis degradation. Cell surface GABA_B receptors undergo constitutive or PKC-mediated ubiquitination and constitutively internalizes. Non-ubiquitinated receptors do not effectively engage USP14 and are sorted toward recycling (1), while ubiquitinated receptors bind USP14 and engage its ubiquitin-binding domain, targeting receptors toward lysosomal degradation (2). USP14 deubiquitinates the receptors during trafficking, allowing ubiquitin recycling.

FIGURE S1. BRET titration curves of GABA_B monomer sub-units with MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP. BRET signal, total fluorescence and total luminescence were measured in HEK293T cells transfected with constant amount of Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc or Myc-GABA_{B(1b)}-ASRR-Rluc (*A*), or HA-GABA_{B(2)}-Rluc (*B*) and increasing amount of either MonoUbi-YFP or Ubi-YFP. The data points obtained in two independent experiments were pooled and used to generate the curves.

FIGURE S2. GABA_B agonists and antagonist show no modulation of ubiquitination. HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, HA-GABA_{B(2)} and either MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP were treated for 2 hours with vehicle, 1 mM GABA, 100 μM Baclofen or 10 μM CGP54626. UbiAA-YFP signal was subtracted from MonoUbi-YFP signal to give the specific ubiquitination signal. The results presented are the mean ± SEM of at least three independent experiments performed in triplicates.

FIGURE S3. PMA induced ubiquitination is inhibited by PKC inhibitor Bisindolylmaleimide I. HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, HA-GABA_{B(2)} and either MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP were pre-incubated for 30 minutes with either vehicle or 5 μM before being treated for 2 hours with vehicle or 1 μM PMA. Specific ubiquitination signal was calculated. The results are presented as the mean ± SEM of at least three independent experiments performed in triplicates. (** P<0.01)

FIGURE S4. Both sub-units of GABA_B heterodimer show similar half-life at the cell surface. HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B1b} and HA-GABA_{B(2)} were labeled with EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin and either kept on ice (Ctl) or switched at 37°C with vehicle for the indicated time. After cell solubilization, biotin-labeled receptors were purified by pull-down with streptavidin-sepharose beads and detected with anti-Myc (9E10) mouse antibody (*A*, GABA_{B1b}) or anti-GABA_{B(2)} rabbit antibody (*B*, GABA_{B(2)}). Receptors remaining after the chase period were quantified and are plotted in *C*. Curves are presented as the mean ± SEM of three independent experiments.

FIGURE S5. USP14 shows selectivity in its deubiquitination activity on GPCRs. Specific BRET signal was measured on HEK293T cells expressing either Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc and HA-GABA_{B(2)}, CXCR4-RLuc, V2R-RLuc or Par1-Rluc, along with MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP, and either pcDNA3 or USP14. Inset shows the percentage of USP14 inhibition: USP14 minus pcDNA3 divided by the pcDNA3 for each condition. The results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in triplicates. (*) P<0.001)**

FIGURE S6. USP14 does not modulate GABA_B internalization. HEK293T cells expressing Myc-GABA_{B(1b)}-Rluc, HA-GABA_{B(2)} and either pcDNA3 or USP14 were labeled with anti-Myc 9E10 antibody for one hour on ice. Internalization was induced by temperature switch to 37°C for two hours in the presence of vehicle or 100 μ M IU1 (IU1 treatment: cells were transfected with pcDNA3). Control cells were kept on ice. Amount of receptor still at the cell surface were measured by ELISA. The results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in quadruplicates.

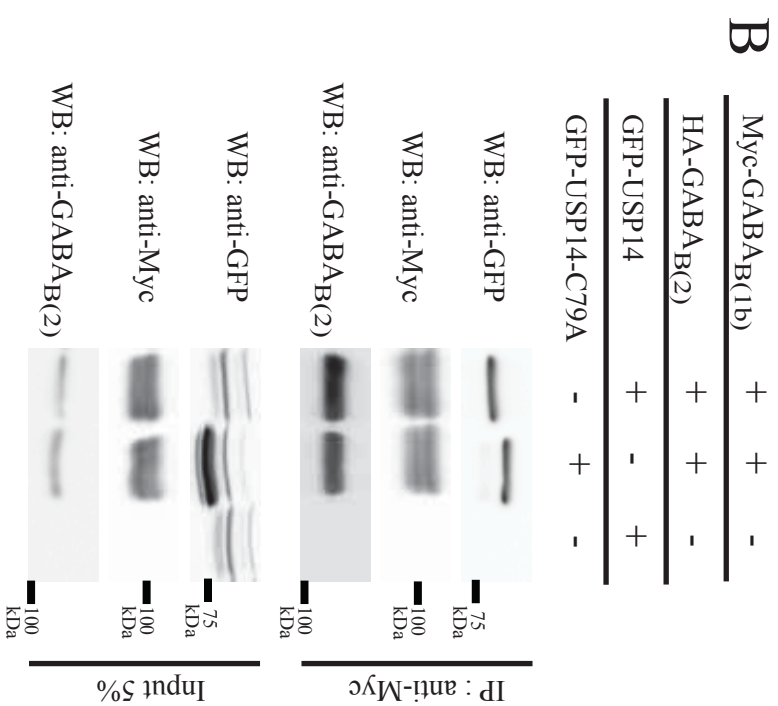
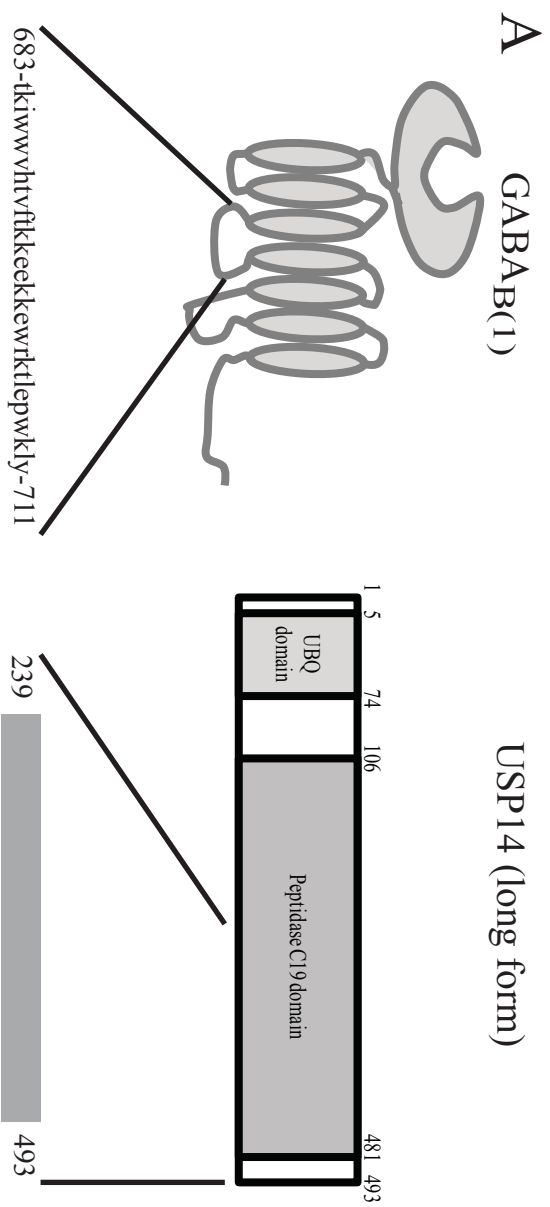


Figure 1

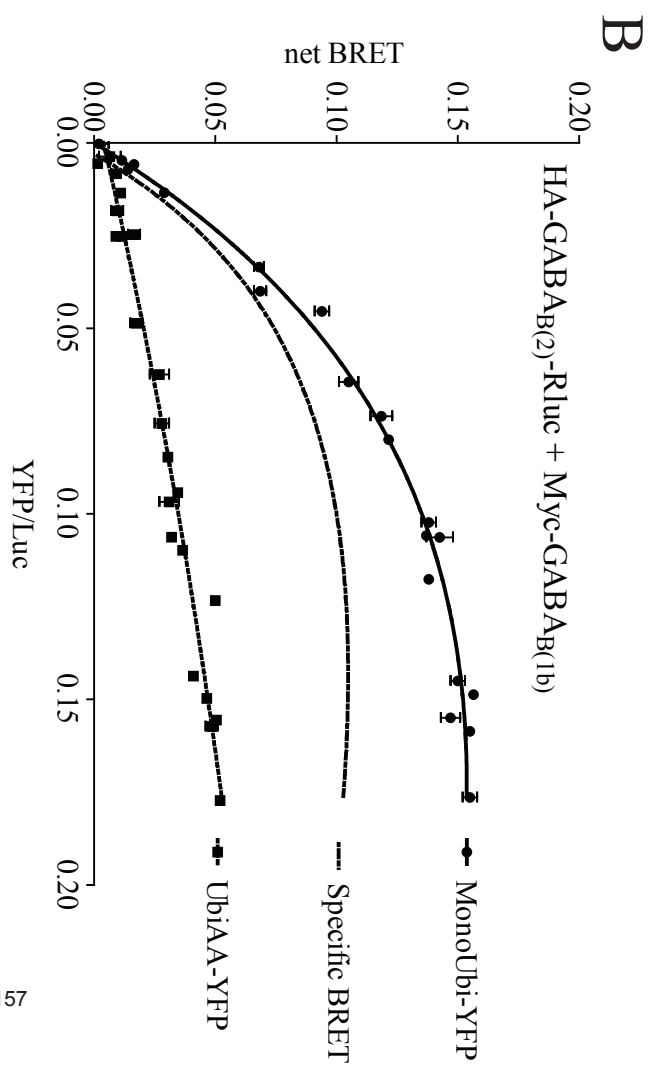
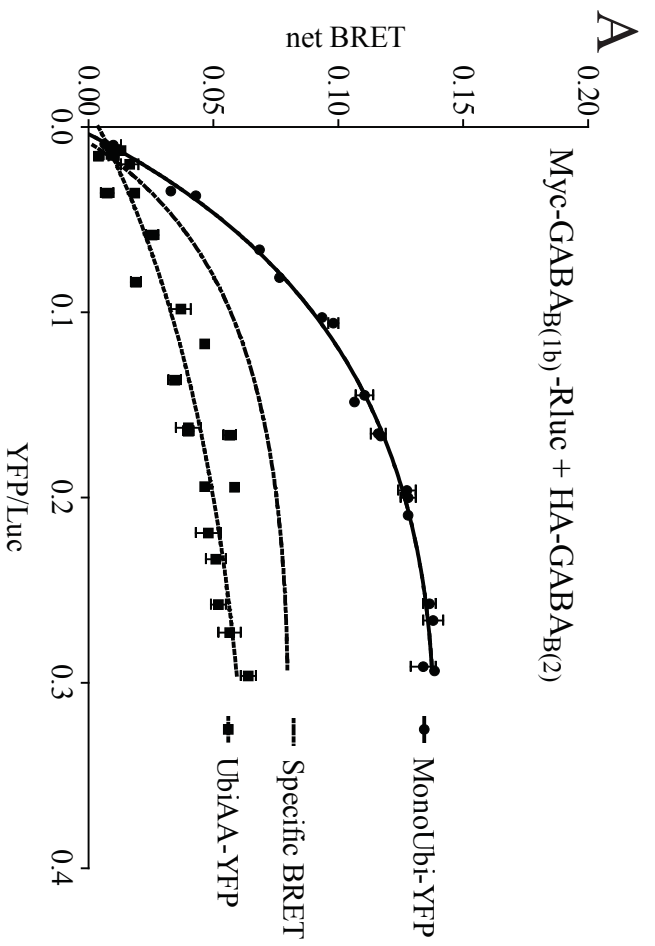


Figure 2

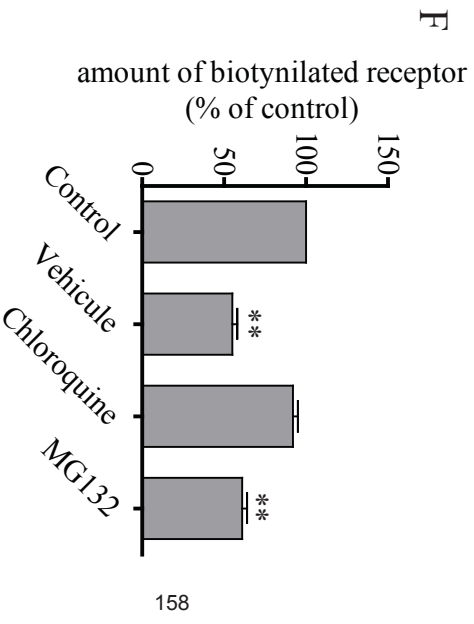
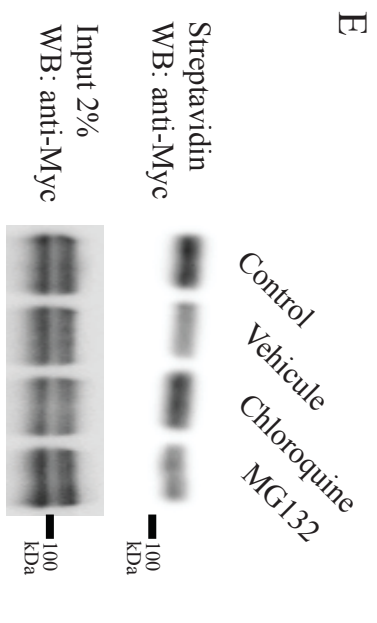
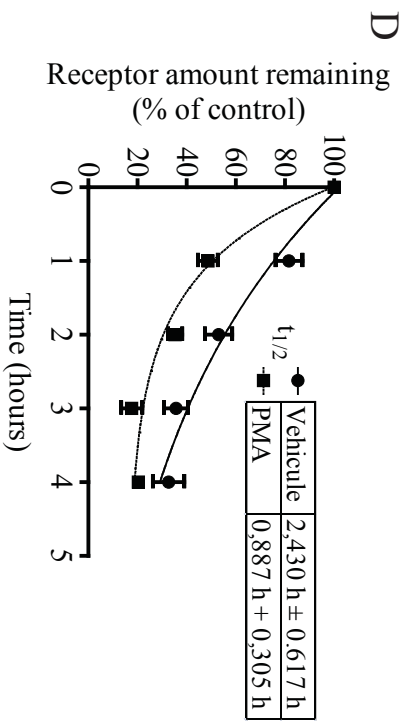
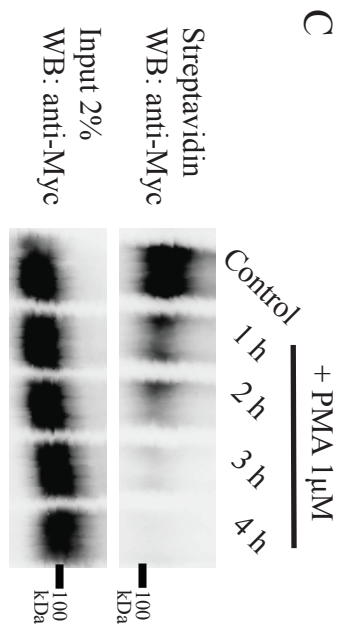
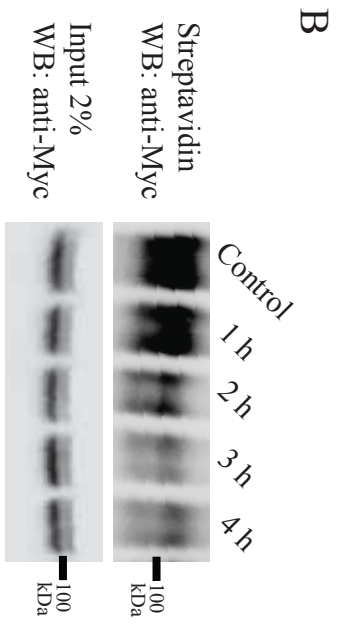
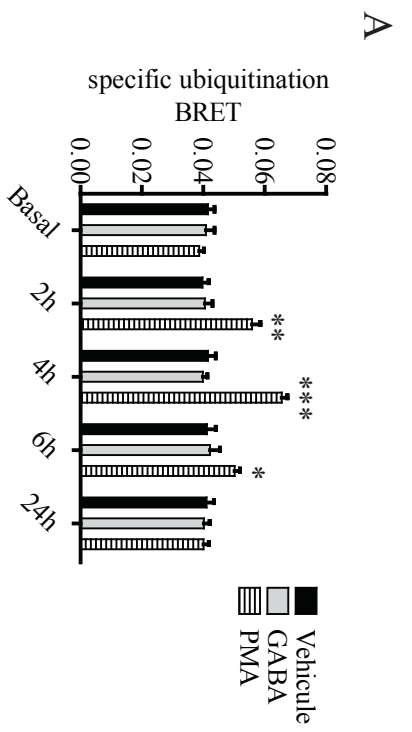
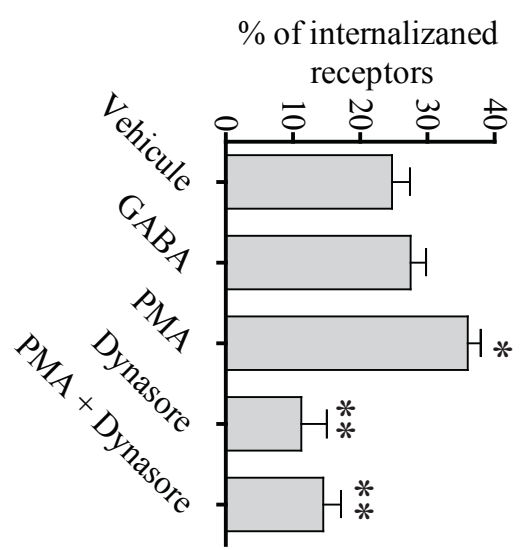
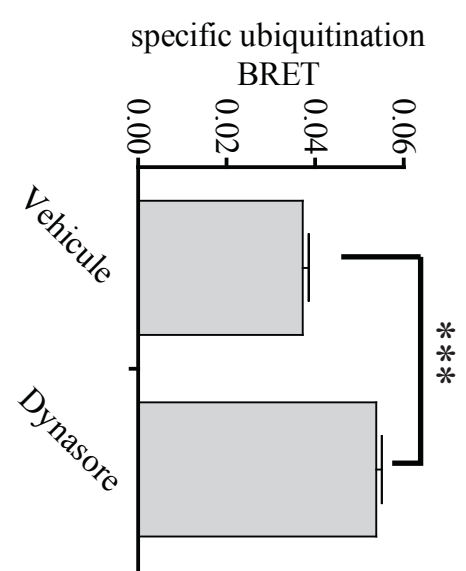


Figure 3

A



B



C

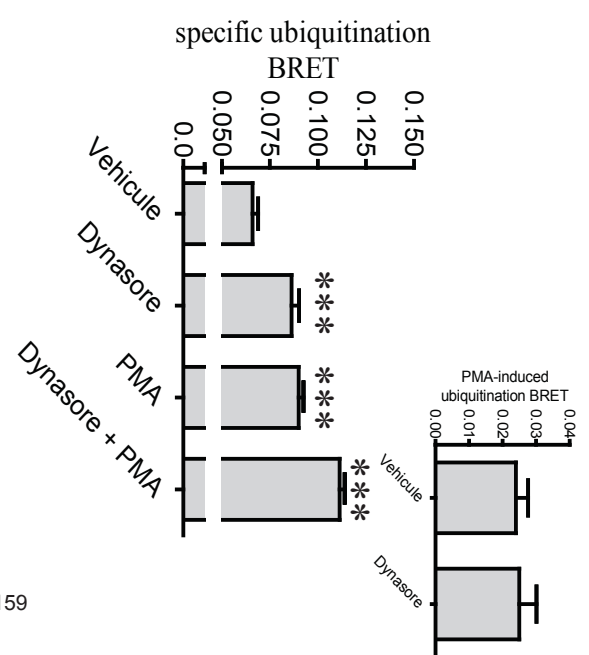


Figure 4

Figure 5

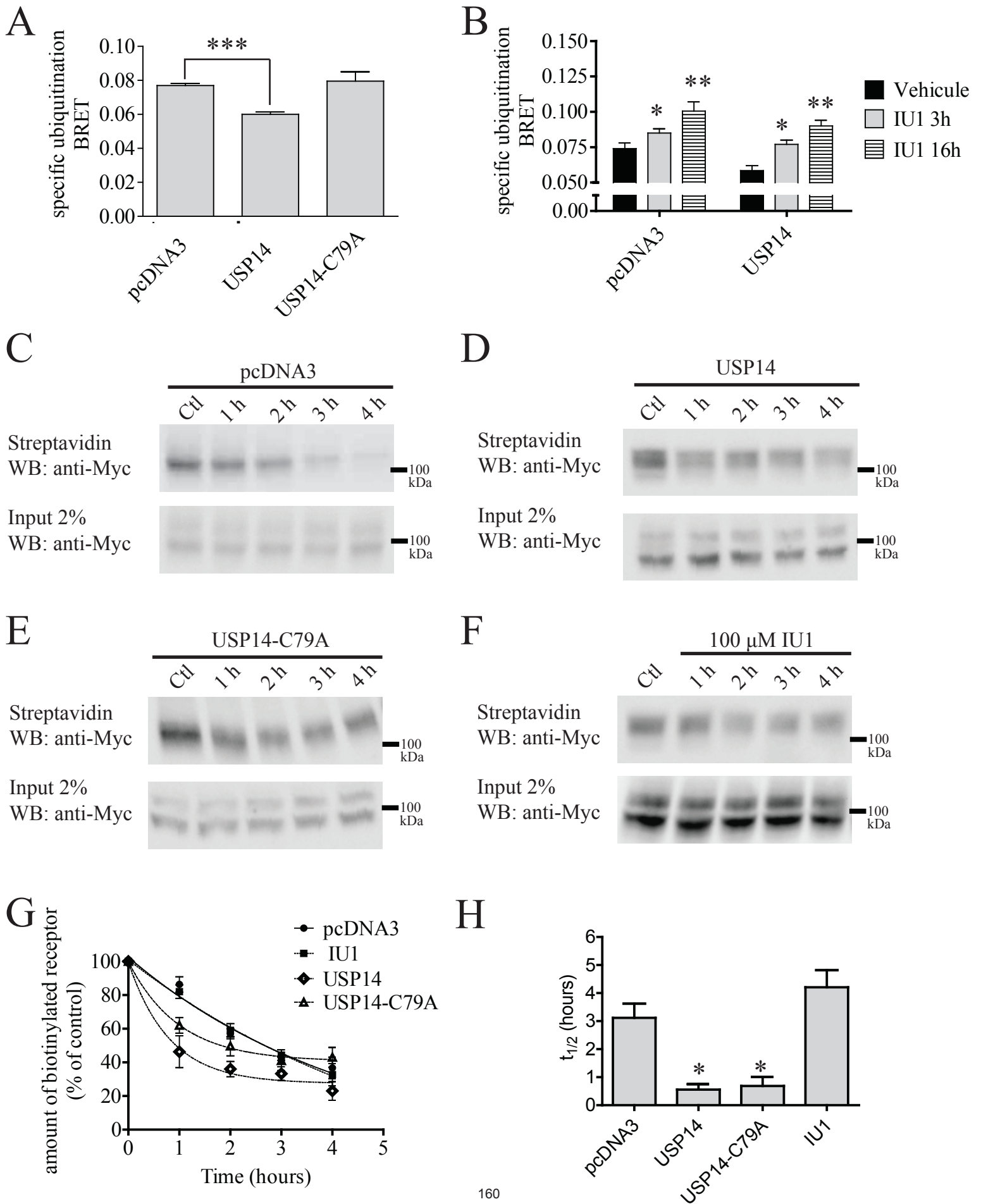
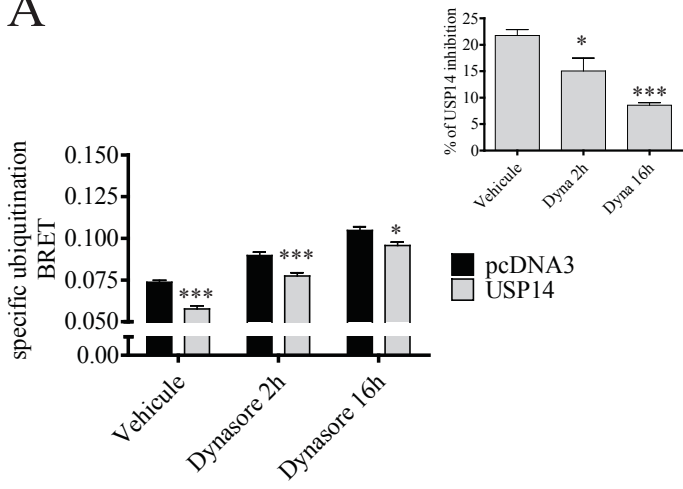


Figure 6

A



B

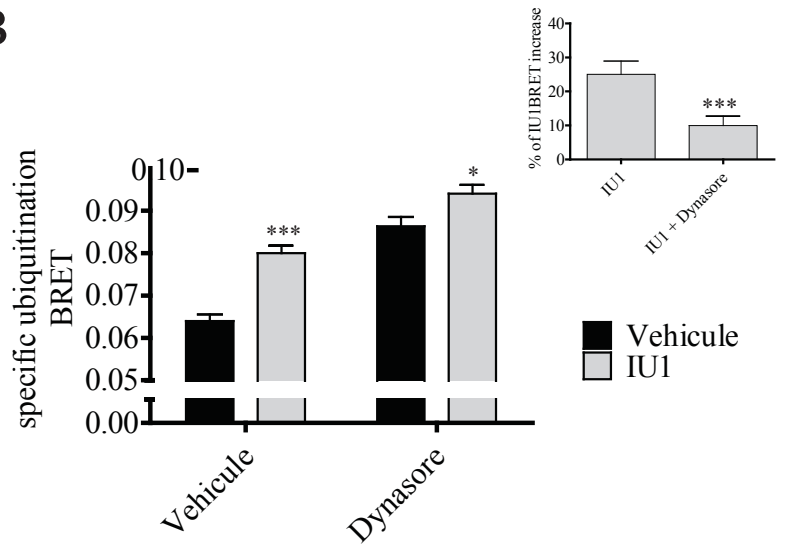
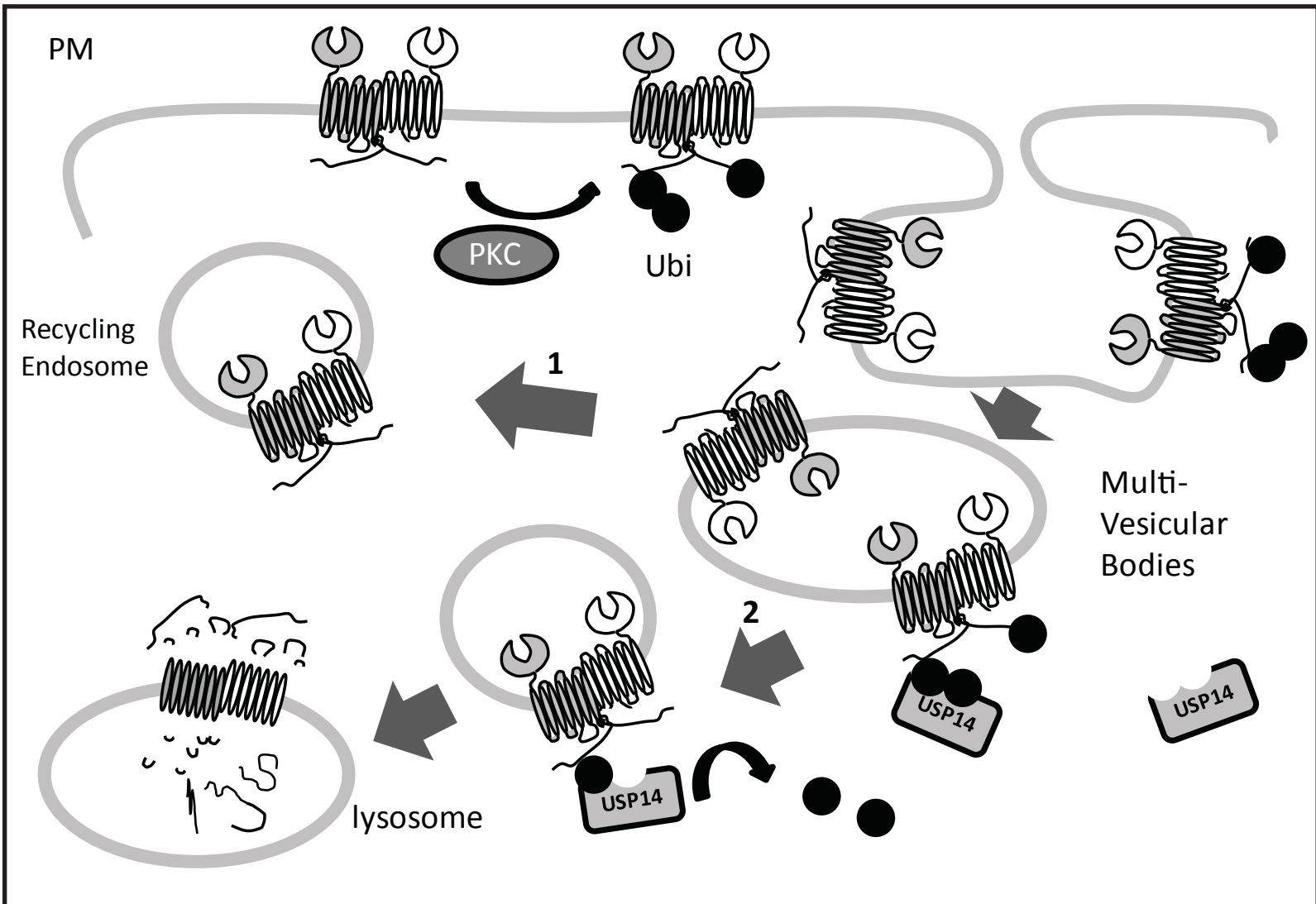


Figure 7



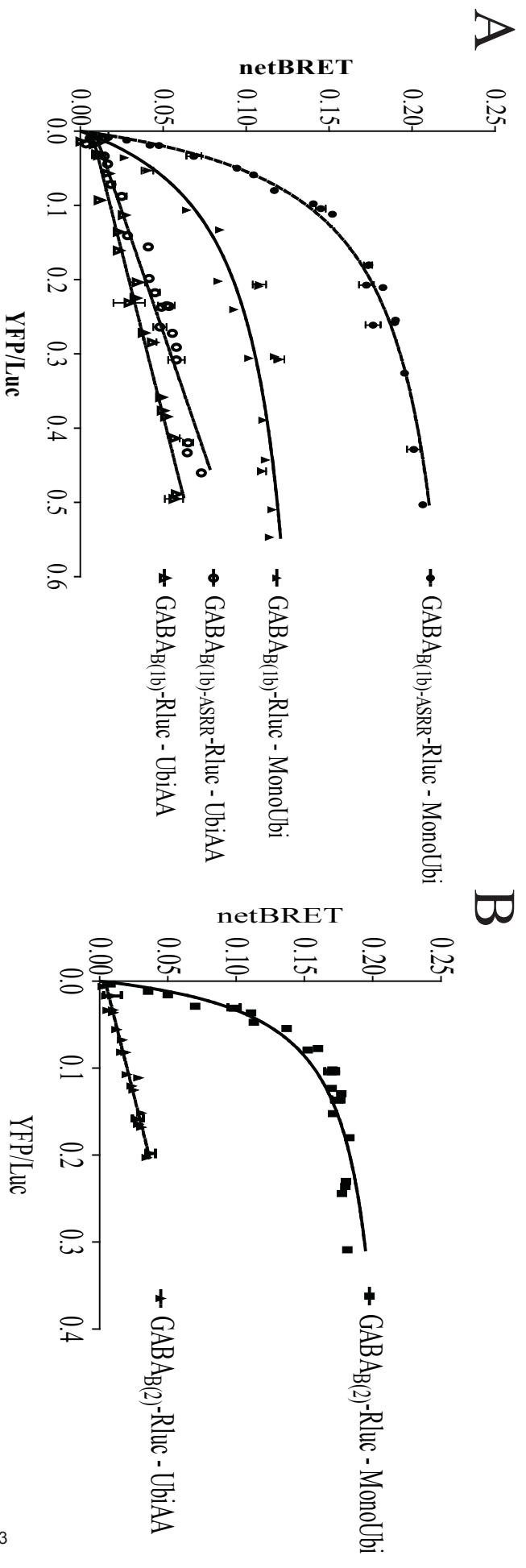


Figure S1

Figure S2

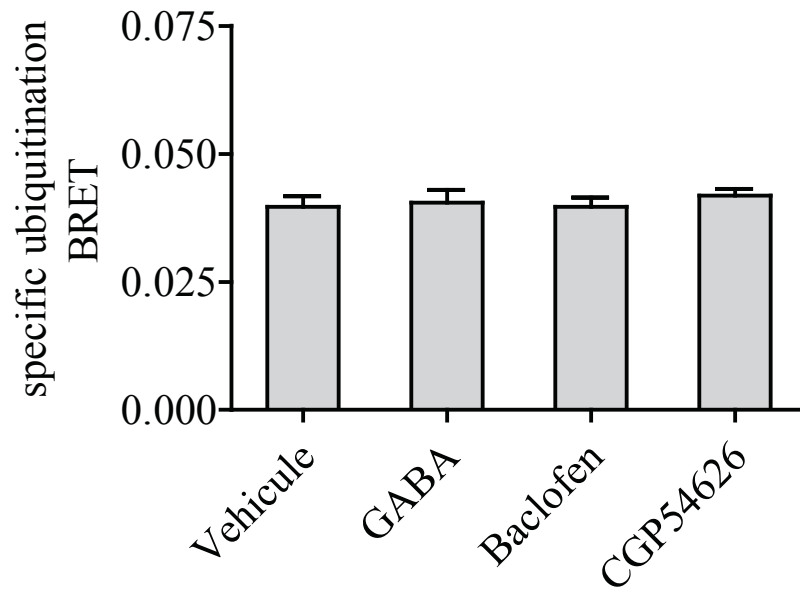


Figure S3

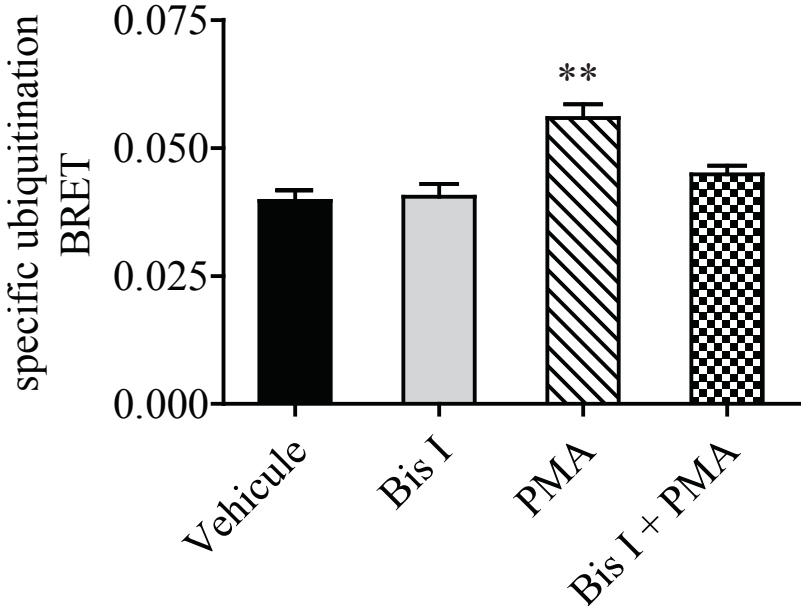


Figure S4

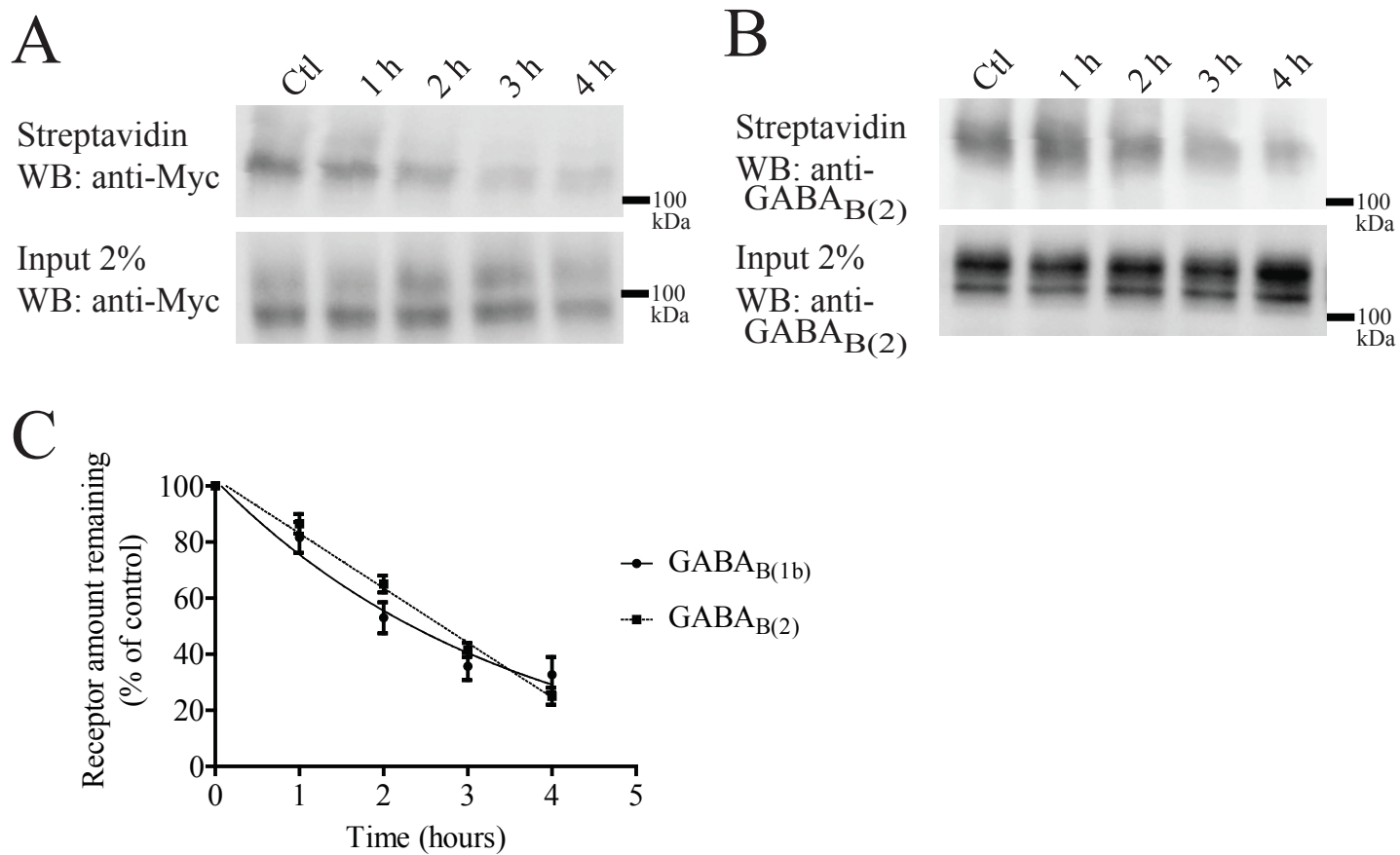


Figure S5

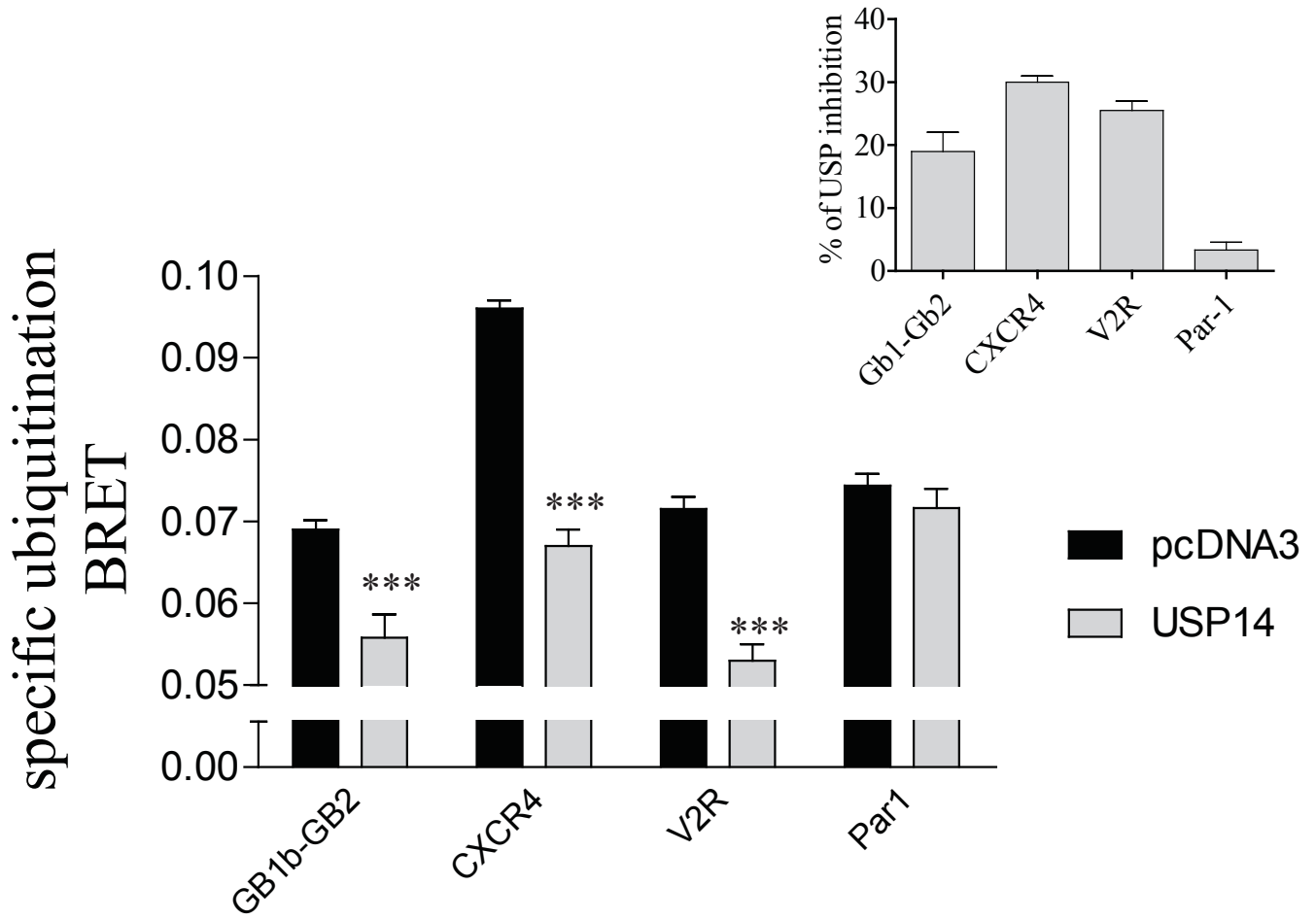
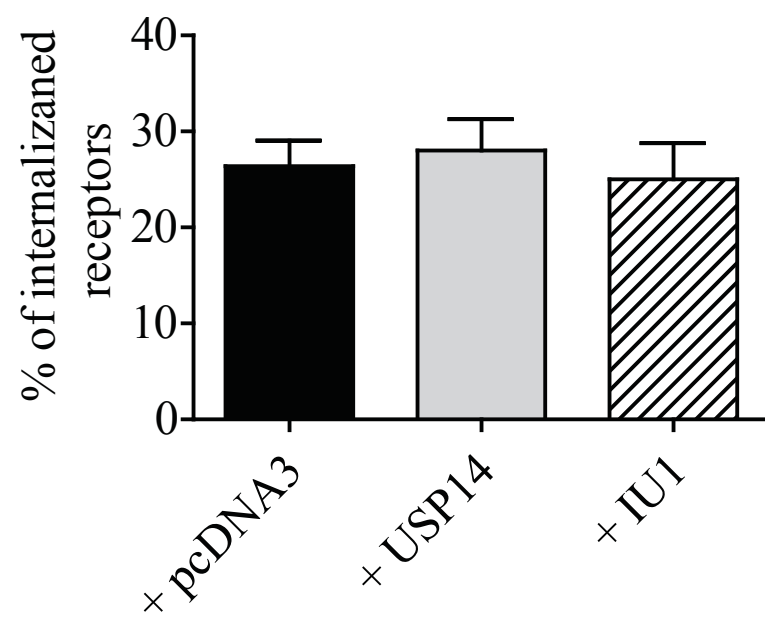


Figure S6



Article 3

Grb2 interacts with the GABA_B receptor and regulates its cell surface stability

Nicolas Lahaie, Ashley Brady, Jaroslav Blahos, Laurent Prézeau et Michel Bouvier. En préparation pour *Journal of Biological Chemistry*.

Résumé

Le récepteur métabotropique de l'acide γ -aminobutyrique (GABA_B) est responsable de la composante lente de la régulation GABAergique de l'activité neuronale. La quantité de GABA_B à la synapse est contrôlée par le trafic vers la membrane et une forte internalisation, autant constitutive qu'induite par le glutamate. Utilisant des méthodes de *GST-pulldown* et de BRET (transfert d'énergie de résonance par bioluminescence), nous avons identifié Grb2 (protéine interagissant avec le récepteur d'hormone de croissance 2) comme une nouvelle protéine d'interaction de GABA_B en mesure de réguler la stabilité à la surface cellulaire de ce dernier. Le site d'interaction a été localisé dans la séquence PEST (riche en proline-glutamate-serine-thréonine) de GABA_{B1} (GB1), qui contient des motifs de liaison consensus aux domaines SH3 (homologue à Src 3). Grb2 interagit avec GABA_{B1} exprimé seul ou coexprimé avec GABA_{B2} (GB2). L'interaction avec l'hétérodimère GABA_B ciblé à la membrane est modulée par une stimulation avec l'agoniste, confirmant la nature fonctionnelle du complexe ternaire. L'association de GABA_B à Grb2 diminue l'endocytose constitutive, résultant en une augmentation de la densité de récepteur à la membrane. Nos résultats suggèrent un nouveau rôle de Grb2 dans le contrôle de la signalisation de GABA_B par la régulation de sa stabilité à la membrane plasmique.

Contribution : J'ai contribué à l'ensemble de la conceptualisation, du design expérimental et de la génération des résultats, excepté les expériences de *pulldown* par GST. J'ai écrit le manuscrit et procédé à l'ensemble du processus de révision.

Grb2 interacts with the GABA_B receptor and regulates its cell surface stability

Nicolas Lahaie¹, Ashley Brady³, Zdenka Syrova², Jaroslav Blahos², Laurent Prézeau³ and Michel Bouvier¹

¹Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada

²Institute of Molecular Genetics, Academy of Science of the Czech Republic, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

³Institut de Génomique Fonctionnelle, University of Montpellier 1 and 2, Montpellier, France

Address correspondence to : MB; Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal (Québec) H3T 1J4, CANADA, E-mail : michel dot bouvier at umontreal dot ca

Keywords : GABA_B receptor, GPCR, Grb2, endocytosis, PEST sequence

Summary

The metabotropic γ -aminobutyric acid (GABA) receptor (GABA_B) is responsible for the slow component of GABAergic regulation of synaptic plasticity. The amount of GABA_B at the synapse is tightly regulated by the control of both forward trafficking and strong constitutive as well as glutamate-promoted endocytosis. Using both GST-pulldown and bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based assays, we identified growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) as a novel GABA_B interacting protein that regulates its cell surface stability. The interaction site was located within the PEST (proline-glutamate-serine-threonine rich) sequence of the GABA_{B1} sub-unit (GB1) which contain consensus Src homology 3 (SH3) domain binding motifs. Grb2 was found to interact with both GB1 expressed alone or co-expressed with the GABA_{B2} sub-unit (GB2). The interaction with the cell-surface targeted GABA_B heterodimer was modulated by agonist treatment confirming the functional nature of the ternary complex. The association of GABA_B with Grb2 decreased the constitutive endocytosis resulting in an increased steady-state cell surface receptor density. Taken together, our results suggest a novel role for Grb2 in controlling GABA_B signalling through the regulation of its cell surface stability.

Introduction

γ -amino-butyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system and mediate neuronal excitability by activating both ionotropic and metabotropic receptors. The GABA_B receptor, an obligatory hetero-oligomer formed by two seven-transmembrane G protein coupled receptor (GPCR) sub-units, is responsible for both the pre-synaptic and post-synaptic metabotropic signalling mediated by GABA (1–4). Oligomerization between GABA_{B1} (GB1) and GABA_{B2} (GB2) occurs through interfaces that are present in the extracellular and transmembrane domains (5) as well as their cytoplasmic carboxyl-tails (6). GB1 is responsible for agonist binding through its Venus flytrap extracellular domain and transactivates GB2, which possesses the guanine nucleotide-exchange factor (GEF) activity to trigger G protein signaling (7). Correct assembly of a functional oligomer is necessary for plasma membrane delivery, as the GB1 sub-unit expressed alone is retained in the endoplasmic reticulum (ER) through COPI-mediated retrograde transport involving a carboxy-tail R-S-R-R retention signal (8). Oligomerization of the GB1 and GB2 sub-units involves the formation of a coiled coil structure which masks the retention signal, allowing ER exit and forward trafficking (6). A di-leucine motif located at the start of the GB1 coiled coil sequence has also been shown to inhibit cell surface expression through interaction with the msec7-1 protein in the Golgi network (9). Co-association of the receptor with sub-units of the ionotropic GABA_A receptor have also been suggested to promote cell surface targeting (10). Interactions with the transcription factor CHOP (11) and PDZ-domains containing protein MPDZ (12) have also been shown to modulate cell surface density of the receptor. The carboxyl-tail of both receptors are also responsible for interactions with other signaling proteins including related transcriptions factors ATF4 and ATFx (13), RNA-binding protein Marlin-1 (14) and regulatory protein 14-3-3 (15), however their roles in receptor trafficking remain poorly characterized.

GABA_B shows atypical desensitization processes and contrary to most GPCR, does not undergo agonist-promoted internalization (16, 17). Steady-state regulation of GABA_B cell surface density is therefore dependent on an equilibrium between cell surface targeting and constitutive endocytosis (18). The constitutive endocytosis of GABA_B has been found to be rapid, with 20-40% of the cell surface receptor being internalized in 2 hours (18, 19), suggesting an important role for this process in the control of cell responsiveness to GABA stimulation. Although not sensitive to the activation state of the receptor, endocytosis can be potentiated by glutamate-mediated CaMKII phosphorylation of the GB1 c-tail (20). The phosphorylation state of the receptor also influences the recycling of the endocytosed receptor since dephosphorylation of serine 783 on the GB2 c-tail by protein phosphatase 2A (21) was found to inhibit recycling. Phosphorylation of this site by AMP-activated Kinase (AMPK) promotes receptor coupling to Kir3.1 channels (22) indicating a reciprocal effect of a phosphorylation/dephosphorylation cycles

on the activity of the receptor. Receptor activity has also been suggested to be regulated by phosphorylation of the c-tails by cAMP-dependent protein kinase (PKA) (23) and protein kinase C (PKC) (16), as well as through a direct interaction of the GB2 c-tails with the KCTD family of proteins (24). The carboxy-tails of both sub-units are thus of utmost importance in the regulation of receptor trafficking and activity. Despite our increasing understanding of the mechanisms controlling the regulated endocytosis of GABA_B, very little is known about the basic machinery regulating its constitutive endocytosis.

In search of novel proteins regulating GABA_B cell surface stability, and given the role of the carboxyl tail in the receptor trafficking, we generated GST-tagged GB1 c-tail constructs and performed pull-down experiments on solubilised mouse brain extracts. Mass spectrometry analysis of the pulled down proteins identified the growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) as one of the major interacting proteins. Grb2 is a SH2 and SH3 domains-containing scaffolding protein that bind to proteins harbouring phosphorylated tyrosine(s) (25) and a P-x-x-P minimal consensus sequence (26), respectively. This scaffolding protein was first identified as a regulator of the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling, as it is recruited to a phosphorylated receptor through its SH2 domain (27) and in turn recruits the Ras-GEF, Sos, with one of its SH3 domain to activate the downstream Ras and MAP Kinase signalling cascades (28). Grb2 is also implicated in EGFR internalization through the recruitment of the Cbl E3 ubiquitin ligase by one of the Grb2 SH3 domains (29). Ubiquitination of EGFR allows the recruitment of ubiquitin-interacting motifs containing proteins such as epsin and Esp15, which can link the receptor to the AP-2 complex thus promoting clathrin-mediated internalization (30).

In light of the classical roles of Grb2 and the presence in the GB1 c-tail of P-x-x-P sequences within a PEST sequence classically involved in controlling protein stability (31), we characterized Grb2 interaction with GABA_B and assessed its potential role in controlling receptor activity and cell surface stability.

Materials and Methods

Materials: : pcDNA3-Myc-GB1b) , pcDNA3-Myc-GB1b-Rluc, pcDNA3-HA-GB2, pcDNA3-HA-GB2-Rluc have been previously described in (16, 32). pcDNA3-Myc-GB1b_{ASRR}-Rluc was constructed by mutating the Arg codon by PCR. pcDNA3-Myc-GB1b_{ΔPEST}-Rluc and pcDNA3-Myc-GB1b_{ASRR-ΔPEST}-Rluc were constructed by mutating the sequence using PCR. pGEX-GST-Tev was bought commercially. pGEX-GST-Tev-HA-GB1(875-961) was constructed by cloning the c-terminus of GB1a by PCR and insertion into the pGEX-GST-Tev vector. pGEX-GST-Tev-GB1(917-961) was constructed by cloning the sequence from amino acid 917 to the terminating codon of GB1a by PCR and insertion into pGEX-GST-Tev. pcDNA3-Grb2 were constructed by obtaining Grb2 by PCR from a rat brain cDNA bank and inserting into pcDNA3. pcDNA3-YFP-Grb2 was constructed by N-terminally inserting a YFP in frame before the initiating codon of Grb2 in pcDNA3-Grb2. All plasmids were sequenced.

Dynasore, Baclofen and SIGMAFASTTM peroxidase assay were purchased from Sigma-Aldrich. coelenterazine h is from Nanolight Technology. All other chemicals were from Sigma-Aldrich.

Antibodies : Anti-Grb2 is from AbCam. Anti-GST is from Sigma-Aldrich. Anti-Myc 9E10 ascytes and anti-HA 12Ca5 ascytes are prepared in house. Anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase is from GE HealthCare Life Sciences.

GST-pulldown: GST-pulldown are done as described in (16). Briefly, purified GST-Tev-GB1 constructs were incubated with mouse brain solubilised in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, 5 µg/mL leupeptine, 5 µg/mL soybean trypsin inhibitor and 10 µg/mL benzamidine) for one hour and were pull-downed using sepharose-glutathione beads. Beads were washed three times with lysis buffer and binding proteins were separated by addition of Laemmli buffer. Samples were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for Western blotting.

Grb2 interaction by BRET: BRET measurements are done as described in (33). Treatments were done directly in 6 or 12 wells-plates for the indicated time. Media was then removed, cells washed twice in PBS and resuspended in PBS. 100 000 cells were then transferred to 96 wells white plate and treated for 2 minutes with 5 µM coelenterazine h before reading in a Berthold Mithras LB940 equipped with acceptor (530 ± 20 nm) and donor (480 ± 20 nm) filters. In case of stimulation with baclofen, cells were treated for the amount of time indicated substrated by the 2 minutes of coelenterazine h treatment.

Constitutive internalization assay by ELISA: HEK293T cells were transfected with PEI and the following day, cells were transferred to a poly-D-Lysine coated 24 wells plate (200 000 cells per well). The following day, media was removed and cells were

washed in ice-cold Buffer A(25 mM HEPES, pH 7.4, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 30 mM Glucose). Cells were incubated with anti-Myc antibody (1:1000 dilution in Buffer A containing 0.2% BSA) for one hour on ice and then washed 3 times in cold Buffer A. Cells were put back at 37°C for two hours. Following incubation, cells were washed in cold Buffer A and incubated with secondary antibody (anti-Mouse IgG coupled to horseradish peroxydase – GE) for 45 minutes. Cells were then washed three times and signal was measured after adding SIGMAFAST™.

Cell surface ELISA: HEK293T cells were transfected with PEI and the following day cells were transferred to a poly-D-Lysine coated 24 wells plate (200 000 cells per well). The day after, cells were treated with either vehicle or 50 µM Dynasore for two hours, after which the media was removed and cells were washed with ice-cold PBS. Cells were then fixed with 3% PFA (in PBS) for 30 minutes on ice, and thoroughly washed with PBS.). Cells were incubated with anti-Myc antibody (1:1000 dilution in Buffer A containing 0.2% BSA) for one hour with light agitation. Antibodies were removed and cells washed 3 times in PBS. Cells were then incubated with PBS containing the secondary antibody (anti-Mouse IgG coupled with horseradish peroxidase – GE) for 45 minutes. Cells were then washed three times with PBS and signal was measured after adding SIGMAFAST™.

Statistical analysis: All statistical analysis were done using GraphPad Prism 5.0. Analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Dunnett or Tukey tests were used for multiple comparisons; Dunnett tests being used to compare multiple conditions to a single control, whereas Tukey tests were used to identify the difference within a group. Student *t* tests were performed for pairwise comparison.

Results

Grb2 as a GABA_{B1} interacting protein

The c-termini of GABA_B receptor sub-units have proven to be fertile regions for interacting proteins. We produced a GST-tagged GB1 c-terminus to probe solubilised mouse brain extracts in search of novel interacting proteins. After purifications, samples were run on a 2D SDS-PAGE and we identified the SH2 and SH3-domains containing protein Grb2 as the predominant interacting protein. The interaction was probed using both a full-length GB1 c-terminus and a shortened version containing the proline-rich regions (Figure 1A). A representative GST-pulldown is shown in Figure 1B, where Grb2 can interact with both constructs, suggesting the interaction occurs in the distal part of the c-tail containing the proline-rich motifs.

To confirm this interaction in living cells, we expressed full-length GB1b tagged with *Renilla* Luciferase (Rluc) at its c-terminus and Grb2 N-terminally tagged with a yellow fluorescent protein (YFP-Grb2) in HEK293 cells and probed the interaction using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). Hyperbolic BRET titration curves revealed a strong constitutive interaction between Grb2 and the wild-type GB1b sub-unit (Figure 1C). In contrast, when co-expressed with YFP-Grb2, GB2 c-terminally tagged to Rluc resulted in a marginal non-specific linear BRET signal, consistent with the lack of P-x-x-P sequence in GB2. Since GB1 is usually retained in the ER when expressed without GB2, we assessed whether this interaction could be restricted to the ER by mutating the GB1 retention site from R-S-R-R to A-S-R-R, which allows robust plasma membrane targeting of GB1 (Figure 4A) (34). The maximal BRET signal (BRET_{max}) obtained was similar to the one observed with wild-type GB1, suggesting that Grb2 can interact with GB1b both in the ER and at the plasma membrane.

To determine if Grb2 interacted only with GB1 alone or could form a ternary complex with the functional GB1-GB2 heterodimer, the BRET between GB1-Rluc and YFP-Grb2 was assessed in the presence of non-tagged GB2 that associate with GB1 and promotes its targeting to the plasma membrane (Figure 4A). As shown in Figure 1C, a saturable BRET comparable to the one observed between YFP-Grb2 and GB1-Rluc alone was observed. Consistent with the formation of a complex between YFP-Grb2 and the GABA_B heterodimer, increasing amount of non-tagged GB1 promoted a specific BRET signal between GB2-Rluc and YFP-Grb2 (Figure 1D) that contrast with the lack of BRET observed between these two partners in the absence of GB1.

To further investigate whether Grb2 can interact with the functional GABA_B heterodimer at the cell surface, we assessed the effect of agonist stimulation on the Grb2-GABA_B interaction. For this purpose, we stimulated HEK293T cells expressing GB2-Rluc, non-tagged GB1b and YFP-Grb2. We used GB2-Rluc instead of GB1b-Rluc to lower

'background' signal due to constitutive GB1b-Grb2 signal arising from monomeric GB1b. As a negative control, we used GB2-Rluc without expressing non-tagged GB1b and, as expected the BRET signal was similar to background measurements and was not modulated by baclofen, a specific agonist of the GABA_B receptor (Figure 2). The specific BRET signal observed between GB2-Rluc and YFP-Grb2 in the presence of non-tagged GB1, was significantly ($P < 0,05$) increased in a time dependent manner following baclofen stimulation. These results indicate that Grb2 interaction with the GABA_B heterodimer is influenced by the activity state of the receptor confirming its association with a cell surface functional receptor.

To determine whether the interaction of Grb2 with the GABA_B heterodimer could influence its activity, the effect of Grb2 overexpression was assessed on the GABA_B-mediated inhibition of the forskolin-stimulated cAMP production. As shown in Figure S1, Grb2 did not affect the extent of cAMP inhibition promoted by the GABA_B agonist, baclofen. Similarly, no effect of Grb2 was observed on the agonist-stimulated calcium mobilisation or MAPK activation (data not shown) indicating that Grb2 association with the receptor does not influence its canonical signalling activity.

Grb2 interacts through the PEST sequence and modulate cell surface expression

The GB1 c-terminus contains multiple P-x-x-P sequences that correspond to minimal SH3 binding domains. Two such overlapping sequences are present within the PEST domain and are highlighted in Figure 3A. Interestingly, the arrangement of these sequences also leads to the creation of two overlapping consensus Grb2 binding site of x-P-p-x-P (35). To assess the role of this region for Grb2 interaction, we mutated each residues of the entire PEST sequence (amino acids 938 to 949) to alanine to obtain a GB1b $_{\Delta}$ PEST mutant. Expression of either the ER-retained GB1b $_{\Delta}$ PEST-Rluc or the ASRR plasma membrane-targeted mutant form (GB1b $_{ASRR-\Delta}$ PEST-Rluc) led to an entire loss of the Grb2 interaction, as measured by BRET (Figure 3B). Coexpression of the non-tagged GB2 with GB1b $_{\Delta}$ PEST-Rluc did not restore any BRET signal with YFP-Grb2, demonstrating that the only Grb2 interaction site in the functional heterodimer resides in the GB1 PEST sequence. Mutation of the PEST sequence did not affect the interaction between the GABA_B sub-units as indicated by the similar BRET observed between GB2-YFP and GB1-RLuc harbouring or not the Δ PEST mutation (Figure S2). This indicates that the loss of Grb2 interaction was not the result of a perturbed hetero-dimerization due to modifications of the coiled-coil region. In addition, these data suggest that the PEST sequence does not play a role in GABA_B heterodimerization.

Despite the lack of effect of the Δ PEST mutation on the heterodimerization, the mutagenesis of this motif led to a significant reduction of the cell surface expression of GB1 as assessed by ELISA. Such Δ PEST-mediated decrease of GB1-Rluc cell surface expression was observed for the WT GB1 expressed alone ($73 \pm 12\%$ decrease, $P < 0,05$),

co-expressed with GB2 ($24 \pm 3\%$ decrease, $P < 0,05$) and for the cell surface-targeted GB1b_{ASRR}-Rluc mutant form ($21 \pm 2\%$ decrease, $P < 0,05$). This loss of cell surface expression did not result from a lower total expression of the receptor since similar luciferase signals were detected for the constructs harbouring or not the Δ PEST mutations (Figure S3). These results therefore indicate that the PEST domain plays a role in the control of GABA_B cell surface steady-state level.

Grb2 decrease constitutive internalization of GABA_B

To investigate the potential role of Grb2 in the altered cell surface expression resulting from the Δ PEST mutation, we assessed the effect of increasing amount of Grb2 in presence of a stable amount of receptor. Cell surface expression of GB1b-Rluc expressed alone, which is quite low due to its ER retention signal, increased by $125 \pm 42\%$ ($P < 0,05$) with Grb2 overexpression (Figure 4B) whereas cell surface expression of the membrane-targeted GB1b_{ASRR}-Rluc was increased by $65 \pm 7\%$ ($P < 0,05$) at the maximal Grb2 expression (Figure 4C). Even though the cell surface expression of GB1 within the GABA_B heterodimer is already very robust (Figure 4A), Grb2 overexpression further increased it by $20 \pm 3\%$ ($P < 0,05$) (Figure 4D). In contrast, Grb2 had no significant effect on the cell surface expression of any of the constructs harbouring the Δ PEST mutation (Figure 4B-D) indicating that this effect necessitates a direct interaction with Grb2. Also consistent with this notion, cell surface expression of GB2 expressed alone was not modulated by Grb2 overexpression (Figure S4).

Grb2 mediated modulation of cell surface expression could be due to either increased forward trafficking from the ER or decreased internalization of the cell surface pool of receptors. We assessed the constitutive internalization of the GABA_B heterodimer by labeling cell surface GB1 with an anti-Myc antibody at 4°C in cell co-expressing GB2 and by inducing constitutive internalization by a temperature switch to 37°C for 2 hours. The remaining cell surface receptors were then detected by ELISA and the endocytosis expressed as percentage of signal loss. The GABA_B heterodimer showed a constitutive internalization of $27 \pm 3\%$ after two hours, consistent with earlier reports (17, 18). The GB1b _{Δ PEST}-GB2 dimer was also constitutively endocytosed with a loss of surface receptor ($35 \pm 2\%$) that was greater ($P < 0,05$) than that observed for the wild-type heterodimer indicating a potential role the Grb2 binding domain in the endocytosis. Consistent with this hypothesis, overexpression of Grb2 led to a 22% decrease ($P < 0,05$) of the wild-type heterodimer internalization, while it did not significantly affect the internalization of the Δ PEST mutant containing heterodimer (Figure 5A). Also supporting a role for the binding of Grb2 to the PEST domain of GB1 in the constitutive endocytosis of GABA_B, inhibition of the internalization with the cell-permeable inhibitor of dynamin I, Dynasore, restored the cell surface expressions of the Δ PEST mutant forms

for both GB1b_{ASRR} and GB1b containing heterodimer confirming that the reduction in cell-surface receptor expression resulted from increased endocytosis.

Taken together, these results strongly suggest a role for the PEST sequence and Grb2 in GABA_B receptor cell surface stability and constitutive internalization.

Discussion

In the present study, we identified Grb2 as a novel interacting partner of GB1 in a GST-pulldown screen of solubilised rat brains and confirmed the interaction in living cells using BRET. The interaction could be observed for both the wild-type GB1b retained in the endoplasmic reticulum, or the retention site mutant GB1b_{ASRR} targeted to the cell surface, suggesting that the interaction is not dependent on cellular localization and can occur at different steps of the trafficking of GB1b.

Grb2 can form a ternary complex with the functional GABA_B heterodimer, as shown by the GB1-dependent interaction between GB2-Rluc and YFP-Grb2 and the observation that baclofen can increase the measured BRET in a time-dependent manner. The nature of this increase could be rationalized as either a bigger level of association between the two partners or a conformational rearrangement between the already interacting proteins. Considering that Grb2 binding inhibit constitutive endocytosis and that agonist-stimulation does not mediate internalization, it would suggest that the agonist-induced change in BRET does not reflect additional recruitment of Grb2 to the receptor complex, favoring the conformational rearrangement hypothesis. While Grb2 does not seem to be involved in the early stages of canonical signaling, the scaffolding protein could recruit signaling partners to the activated receptor. Interestingly, Grb2 interacts with proteins involved in GABA_B-mediated transactivation of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) (36). The most likely candidate for interaction would be the focal adhesion kinase 1 (FAK1), as its activation is upstream of IGF1R activation and is a known interacting partner of Grb2 (37). Furthermore, FAK1 has been suggested to inhibit internalization of the matrix metalloprotease MT1 by promoting phosphorylation of endophilin A2 (38). Further studies will be needed to address this potential role of Grb2 in the recruitment of GABA_B accessory proteins.

The observation that Grb2 blunts GABA_B constitutive endocytosis is unexpected considering the classical role of Grb2 in promoting internalization of its receptors partners. In the case of the EGFR, Grb2 recruitment to an activated receptor promotes E3 ubiquitin ligase Cbl ubiquitination of the receptor and promote epsin-dependent internalization (29). This was not the case for the GABA_B receptor, as the extent of ubiquitination was not affected by either the Δ PEST mutation or Grb2 overexpression (Figure S5). Grb2 has also been shown to promote endocytosis by recruiting dynamin-1 to the β 2AR in insulin-promoted receptor endocytosis (39). In both mechanisms of Grb2-mediated internalization, the scaffolding protein is recruited to its receptor partner through its SH2 domain, whereas recruitment to the GABA_B heterodimer is through one of its SH3 domains. Consistent with the observation of increased GABA_B endocytosis in the absence of Grb2 binding, SH3-domain binding of Grb2 to the dopamine D4 receptor is implicated in D4 cell surface stability, as mutation of its binding sequence promote high constitutive endocytosis (40). This suggests that the availability of the different

Grb2 SH2 or SH3 domains leads to differential recruitment of accessory proteins implicated in receptor endocytosis.

While our observations support a role for Grb2 in increasing cell surface expression of GABA_B through inhibition of its constitutive endocytosis, a contribution toward forward trafficking of the receptor cannot be discounted, especially considering that Grb2 can interact with the ER-retained form of GB1. The Grb2 binding site on GB1 overlap the binding sequence of the GABA_A receptor γ 2S sub-unit, which also promote cell surface expression of GABA_B (10). This binding motif is proximal to the R-X-R retention site located at the end of the coiled-coil region, which has been shown to be important to bypass ER-retention (6), although formation of any coiled-coil interaction is not sufficient to promote cell surface targeting by itself, as only the GB2 sub-unit is able to both form the coiled-coil structure and promote cell surface expression (5). Other proteins interacting through a coiled-coil interaction with GB1, such as Marlin-1 and ATF4 do not promote forward trafficking (14, 41), suggesting that the coiled-coil interaction formed in those cases is structurally distinct from the one observed with GB2. Consistent with this notion, it has been suggested that the conformation of the retention site and its distance from the plasma membrane are important for ER retention (42), and binding of proteins to the proximal PEST sequence could play a role in disrupting this important conformation, possibly suggesting a mechanism by which Grb2 could modulate forward trafficking.

Overexpression of Grb2 led to an increase in the small, but detectable amount of wild-type GB1b at the cell surface in absence of GB2. While most studies agree that both GB1 and GB2 are necessary to form a functional GABA_B receptor, it has been observed that GB1 can signal in the absence of GB2. In GB2-null mice, a small subset of neurons express cell-surface GB1 that can respond to baclofen and show G_i protein dependent signaling (43) and signaling to the MAP Kinase pathway has been suggested for GB1 expressed alone in HEK293 cells (44). Considering its ability to promote cell surface expression of GB1 expressed alone, Grb2 could potentially play in a role in GB2-independent GABA_B signaling, although future studies are needed to validate this hypothesis.

The exact mechanism by which Grb2 can promote cell surface stability has not yet been characterized. It is interesting to note that the GABA_A γ 2S sub-unit binds the same region of GB1b, modulate cell-surface expression, and unexpectedly, also allows agonist-mediated internalization of GABA_B (10). This observation is inconsistent with multiple reports suggesting GABA_B does not internalize following agonist stimulation, even in neurons where γ 2S would be coexpressed, and thus would seem to be an exception to normal receptor regulation. Nevertheless, combined with our results, this suggests that the PEST sequence of GB1 and its interacting partners, including Grb2, are important in regulating GABA_B cell surface stability. Whether this regulation of cell surface density

by both constitutive and induced endocytosis could influence the synaptic activity of GABA_B remains to be further investigated.

Acknowledgments

N.L. was the recipient of a Canadian Graduate Scholarship from the CIHR. M.B. Holds the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. This study was supported by the Canadian institutes of health and research (FRN-10501) and the Czech science foundation (GACR P303/12/2408). The authors are thankful to Dr. Monique Lagacé for her expert assistance throughout these studies and her critical reading of the manuscript.

References

1. White, J. H., Wise, a, Main, M. J., Green, a, Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, a a, Emson, P., Foord, S. M., and Marshall, F. H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**, 679–82
2. Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W. J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L. Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Branchek, T. A., and Gerald, C. (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**, 674–9
3. Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, a, Shigemoto, R., Karschin, a, and Bettler, B. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**, 683–7
4. Kuner, R., Köhr, G., Grünewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., and Kornau, H. C. (1999) Role of Heteromer Formation in GABAB Receptor Function. *Science* (80-.). **283**, 74–77
5. Pagano, a, Rovelli, G., Mosbacher, J., Lohmann, T., Duthey, B., Stauffer, D., Ristig, D., Schuler, V., Meigel, I., Lampert, C., Stein, T., Prezeau, L., Blahos, J., Pin, J., Froestl, W., Kuhn, R., Heid, J., Kaupmann, K., and Bettler, B. (2001) C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J. Neurosci.* **21**, 1189–202
6. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97–106
7. Pin, J.-P., Kniazeff, J., Binet, V., Liu, J., Maurel, D., Galvez, T., Duthey, B., Havlickova, M., Blahos, J., Prézeau, L., and Rondard, P. (2004) Activation mechanism of the heterodimeric GABA(B) receptor. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1565–72
8. Brock, C., Boudier, L., and Maurel, D. (2005) Assembly-dependent surface targeting of the heterodimeric GABAB receptor is controlled by COPI but not 14-3-3. *Mol. Biol. ...* **16**, 5572–5578
9. Restituito, S., Couve, A., Bawagan, H., Jourdain, S., Pangalos, M. N., Calver, A. R., Freeman, K. B., and Moss, S. J. (2005) Multiple motifs regulate the trafficking of GABA(B) receptors at distinct checkpoints within the secretory pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 747–56

10. Balasubramanian, S., Teissère, J. A., Raju, D. V, and Hall, R. A. (2004) Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB receptors regulates GABAB receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **279**, 18840–50
11. Sauter, K., Grampp, T., Fritschy, J.-M., Kaupmann, K., Bettler, B., Mohler, H., and Benke, D. (2005) Subtype-selective interaction with the transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) regulates cell surface expression of GABA(B) receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 33566–72
12. Balasubramanian, S., Fam, S. R., and Hall, R. A. (2007) GABAB receptor association with the PDZ scaffold Mupp1 alters receptor stability and function. *J. Biol. Chem.* **282**, 4162–71
13. White, J. H., McIlhinney, R. A., Wise, A., Ciruela, F., Chan, W. Y., Emson, P. C., Billinton, A., and Marshall, F. H. (2000) The GABAB receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13967–72
14. Couve, A., Restituto, S., Brandon, J. M., Charles, K. J., Bawagan, H., Freeman, K. B., Pangalos, M. N., Calver, A. R., and Moss, S. J. (2004) Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 13934–43
15. 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**, 317–28
16. Pontier, S. M., Lahaie, N., Ginham, R., St-Gelais, F., Bonin, H., Bell, D. J., Flynn, H., Trudeau, L.-E., McIlhinney, J., White, J. H., and Bouvier, M. (2006) Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *EMBO J.* **25**, 2698–709
17. Fairfax, B. P., Pitcher, J. a, Scott, M. G. H., Calver, A. R., Pangalos, M. N., Moss, S. J., and Couve, A. (2004) Phosphorylation and chronic agonist treatment atypically modulate GABAB receptor cell surface stability. *J. Biol. Chem.* **279**, 12565–73
18. Grampp, T., Sauter, K., Markovic, B., and Benke, D. (2007) Gamma-aminobutyric acid type B receptors are constitutively internalized via the clathrin-dependent pathway and targeted to lysosomes for degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 24157–65
19. Grampp, T., Notz, V., Broll, I., Fischer, N., and Benke, D. (2008) Constitutive, agonist-accelerated, recycling and lysosomal degradation of GABA(B) receptors in cortical neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**, 628–37
20. Guetg, N., Aziz, S. A., Holbro, N., Turecek, R., Rose, T., Seddik, R., Gassmann, M., Moes, S., Jenoe, P., Oertner, T. G., Casanova, E., and Bettler, B. (2010)

NMDA receptor-dependent GABAB receptor internalization via CaMKII phosphorylation of serine 867 in GABAB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13924–13929

21. Terunuma, M., Vargas, K. J., Wilkins, M. E., Ramirez, O. A., Jaureguiberry-Bravo, M., Pangalos, M. N., Smart, T. G., Moss, S. J., and Couve, A. (2010) Prolonged activation of NMDA receptors promotes dephosphorylation and alters postendocytic sorting of GABAB receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13918
22. Kuramoto, N., Wilkins, M. E., Fairfax, B. P., Revilla-Sanchez, R., Terunuma, M., Tamaki, K., Iemata, M., Warren, N., Couve, A., Calver, A., Horvath, Z., Freeman, K., Carling, D., Huang, L., Gonzales, C., Cooper, E., Smart, T. G., Pangalos, M. N., and Moss, S. J. (2007) Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron* **53**, 233–47
23. Couve, a, Thomas, P., Calver, a R., Hirst, W. D., Pangalos, M. N., Walsh, F. S., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2002) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nat. Neurosci.* **5**, 415–24
24. Schwenk, J., Metz, M., Zolles, G., Turecek, R., Fritzius, T., Bildl, W., Tarusawa, E., Kulik, A., Unger, A., Ivankova, K., Seddik, R., Tiao, J. Y., Rajalu, M., Trojanova, J., Rohde, V., Gassmann, M., Schulte, U., Fakler, B., and Bettler, B. (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* **465**, 231–5
25. Pawson, T., Gish, G. D., and Nash, P. (2001) SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* **11**, 504–11
26. Saksela, K., and Permi, P. (2012) SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett.* **586**, 2609–14
27. Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431–42
28. Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993) A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* **73**, 179–91
29. Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., and Sorkin, A. (2003) Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol. Biol. Cell* **14**, 858–70

30. Benmerah, A., Gagnon, J., Bègue, B., Mégarbané, B., Dautry-Varsat, A., and Cerf-Bensussan, N. (1995) The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *J. Cell Biol.* **131**, 1831–8
31. Marchal, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Urban-Grimal, D. (2000) Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* **275**, 23608–14
32. Villemure, J.-F., Adam, L., Bevan, N. J., Gearing, K., Chénier, S., and Bouvier, M. (2005) Subcellular distribution of GABA(B) receptor homo- and hetero-dimers. *Biochem. J.* **388**, 47–55
33. Breton, B., Lagacé, M., and Bouvier, M. (2010) Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the alpha2A-adrenergic receptor, Galphai1beta1gamma2, and GRK2. *FASEB J.* **24**, 4733–43
34. Calver, a R., Robbins, M. J., Cosio, C., Rice, S. Q., Babbs, a J., Hirst, W. D., Boyfield, I., Wood, M. D., Russell, R. B., Price, G. W., Couve, a, Moss, S. J., and Pangalos, M. N. (2001) The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J. Neurosci.* **21**, 1203–10
35. Yang, S. S., Van Aelst, L., and Bar-Sagi, D. (1995) Differential interactions of human Sos1 and Sos2 with Grb2. *J. Biol. Chem.* **270**, 18212–5
36. Tu, H., Xu, C., Zhang, W., Liu, Q., Rondard, P., Pin, J.-P., and Liu, J. (2010) GABAB receptor activation protects neurons from apoptosis via IGF-1 receptor transactivation. *J. Neurosci.* **30**, 749–59
37. Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786–91
38. Wu, X., Gan, B., Yoo, Y., and Guan, J.-L. (2005) FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Dev. Cell* **9**, 185–96
39. 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**, 33035–41
40. Oldenhof, J., Vickery, R., Anafi, M., Oak, J., Ray, A., Schoots, O., Pawson, T., von Zastrow, M., and Van Tol, H. H. (1998) SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. *Biochemistry* **37**, 15726–36

41. Vernon, E., Meyer, G., Pickard, L., Dev, K., Molnar, E., Collingridge, G. L., and Henley, J. M. (2001) GABA(B) receptors couple directly to the transcription factor ATF4. *Mol. Cell. Neurosci.* **17**, 637–45
42. Gassmann, M., Haller, C., Stoll, Y., Abdel Aziz, S., Biermann, B., Mosbacher, J., Kaupmann, K., and Bettler, B. (2005) The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function. *Mol. Pharmacol.* **68**, 137–44
43. Gassmann, M., Shaban, H., Vigot, R., Sansig, G., Haller, C., Barbieri, S., Humeau, Y., Schuler, V., Müller, M., Kinzel, B., Klebs, K., Schmutz, M., Froestl, W., Heid, J., Kelly, P. H., Gentry, C., Jatou, A.-L., Van der Putten, H., Mombereau, C., Lecourtier, L., Mosbacher, J., Cryan, J. F., Fritschy, J.-M., Lüthi, A., Kaupmann, K., and Bettler, B. (2004) Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J. Neurosci.* **24**, 6086–97
44. Richer, M., David, M., Villeneuve, L. R., Trieu, P., Ethier, N., Pétrin, D., Mamarbachi, A. M., and Hébert, T. E. (2009) GABA-B(1) receptors are coupled to the ERK1/2 MAP kinase pathway in the absence of GABA-B(2) subunits. *J. Mol. Neurosci.* **38**, 67–79

FIGURE 1: GB1 can interact with Grb2 *in vitro* and *in vivo*. *A*, Schematic representation of the GST-tagged constructs of the GB1 c-tail used. **B**) Solubilised mouse brain was subjected to purified GST (lane 1), GST-GB1(875-961) (lane 2) or GST-GB1(917-961) (lane 3) and pull-downed. Total input (5%) and pull-downed samples were separated on SDS-PAGE and proteins detected using the indicated antibodies (anti-Grb2 (top panel) and anti-GST (lower panel)). *C*, HEK293 cells were transfected with stable amount of Myc-GB1-Rluc (\blacktriangle), Myc-GB1b_{ASRR}-Rluc (\blacksquare), Myc-GB1b-Rluc + HA-GB2 (∇) or HA-GB2-Rluc (\circ) with increasing amount of YFP-Grb2. The data points obtained in two independent experiments were pooled and used to generate the curves. **D**) HEK293 cells transfected with stable amount of HA-GB2-Rluc and YFP-Grb2 were co-expressed with increasing amount of non-tagged Myc-GB1b. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments

Figure 2: Baclofen treatment promotes BRET increase in Grb2-GABA_B complex. BRET signal was measured in HEK293 cells transfected with HA-GB2-Rluc, YFP-Grb2 and either pcDNA3 or non-tagged Myc-GB1b after treatment with vehicle (basal) or 100 μ M Baclofen for the indicated time. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates. (*P<0,05)

Figure 3: GB1 PEST sequence contains the Grb2 interaction site. *A*, Schematic representation of the wild type GB1b-Rluc construct and the GB1b Δ PEST-Rluc constructs. *B*, BRET signal was measured in HEK293 cells transfected with Myc-GB1-Rluc, Myc-GB1b_{ASRR}-Rluc, Myc-GB1b-Rluc+ HA-GB2 or their mutated Δ PEST counterparts. Luciferase and YFP values were similar for all conditions. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. (* : P<0,05)

Figure 4: Grb2 modulate GABA_B receptor plasma membrane expression. *A*, HEK293 cells transfected with Myc-GB1b-Rluc, Myc-GB1b_{ASRR}-Rluc, Myc-GB1b-Rluc+ HA-GB2 or their Δ PEST counterparts were subjected to cell surface ELISA using anti-myc 9E10 antibody. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments performed in quadruplicates. *B-D*, HEK293 cells transfected with Myc-GB1-Rluc (*B*), Myc-GB1b_{ASRR}-Rluc (*C*), Myc-GB1b-Rluc+ HA-GB2(*D*) or their Δ PEST counterparts were co-transfected with increasing amount of non-tagged Grb2 and subjected to cell surface ELISA using anti-myc 9E10 antibody. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. (*: P<0,05)

Figure 5: Grb2 decreases GABA_B receptor constitutive internalization. *A*, HEK293 cells expressing HA-GB2 and either Myc-GB1b-Rluc or Myc-GB1b Δ PEST-Rluc were labeled with anti-Myc 9E10 antibody for one hour on ice. Internalization was induced by temperature switch to 37°C for two hours. Receptor amount remaining at the cell surface were measured by ELISA. The results are presented as a mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in quadruplicates. *B*, HEK293 cells transfected with

Myc-GB1-Rluc, Myc-GB1b_{ASRR}-Rluc, Myc-GB1b-Rluc+ HA-GB2 or their Δ PEST counterparts were treated with either vehicle or 50 μ M Dynasore for two hours, after which they were subjected to cell surface ELISA using anti-myc 9E10 antibody. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments performed in quadruplicates. (*P<0,05)

Figure S1: **Grb2 does not modulate GABA_B mediated cyclise inhibition.** HEK293 cells transfected with Myc-GB1b, HA-GB2, GFP²-EPAC-Rluc2 and either empty vector(pcDNA3) or Grb2 were treated with either vehicle (basal), 10 μ M Forskolin or 10 μ M Forskolin + 100 μ M Baclofen for 5 minutes before BRET signal was measured. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicates.

Figure S2: **PEST sequence mutation does not affect GB1b-GB2 interaction.** HEK293 cells were transfected with HA-GB2-YFP and either Myc-GB1b-Rluc or Myc-GB1 Δ PEST-Rluc and were subjected to BRET measurement. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates.

Figure S3: **PEST mutation does not affect total level of expression of GABA_B.** HEK293 cells transfected with Myc-GB1-Rluc, Myc-GB1b_{ASRR}-Rluc, Myc-GB1b-Rluc + HA-GB2 or their Δ PEST were read for total luminescence. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates.

Figure S4: **Grb2 does not promote GB2 cell surface expression.** HEK293 cells transfected with HA-GB2 were co-transfected with increasing amount of non-tagged Grb2 and subjected to cell surface ELISA using anti-HA 12Ca5 antibody. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments.

Figure S5: **Grb2 and the PEST sequence are not implicated in GABA_B ubiquitination.** *A*, HEK293 cells expressing the indicated wild type (WT) or Δ PEST GABA_B sub-units and either MonoUbi-YFP or UbiAA-YFP were measured for BRET signal. UbiAA-YFP signal was subtracted from MonoUbi-YFP signal to obtain the specific ubiquitination BRET. The results are presented as a mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in quadruplicates. *B*, HEK293 cells expressing the indicated GABA_B sub-units and either empty vector (pcDNA3) or non-tagged Grb2 were measured for BRET signal. The results are presented as a mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in quadruplicates.

Figure 1

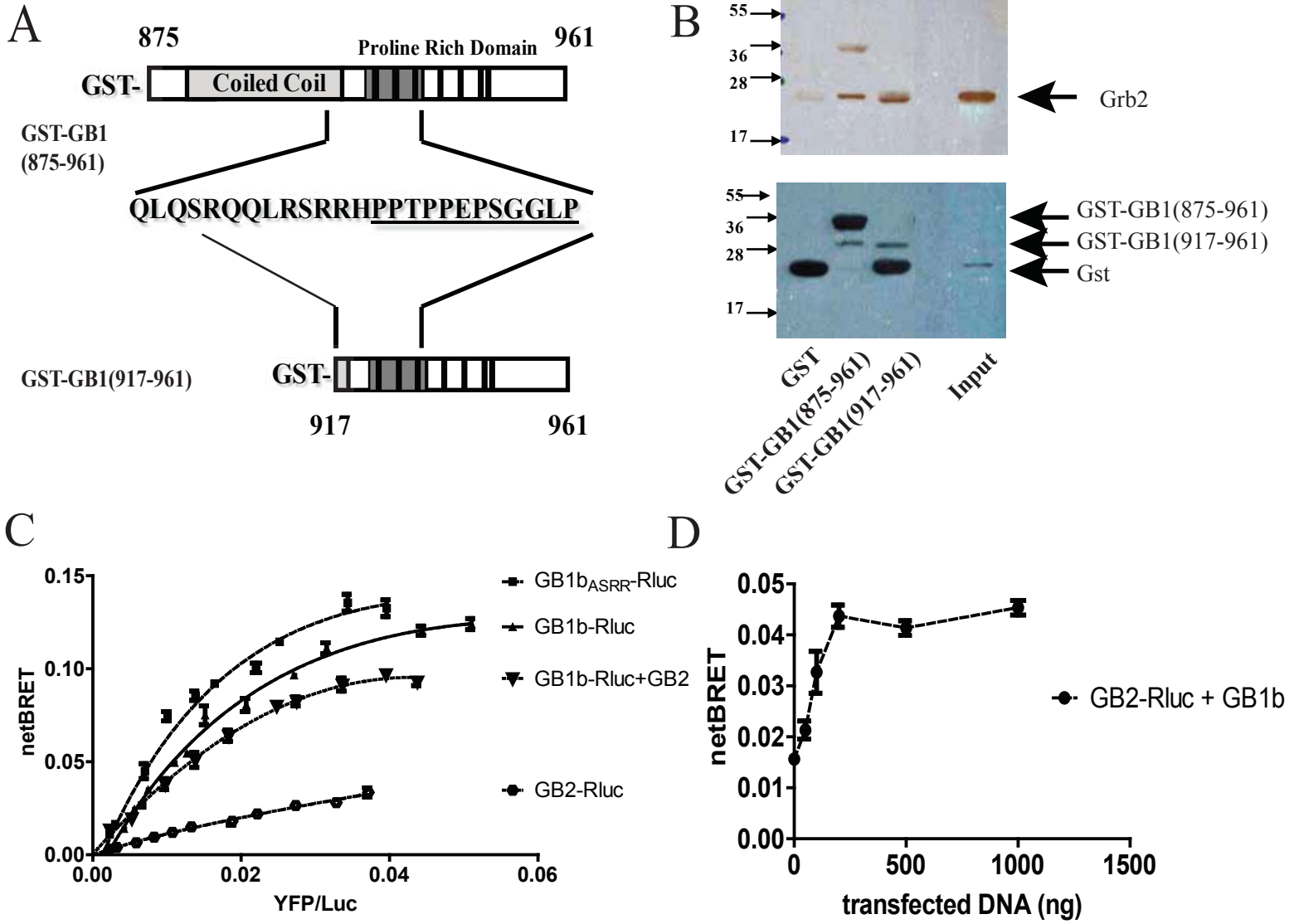
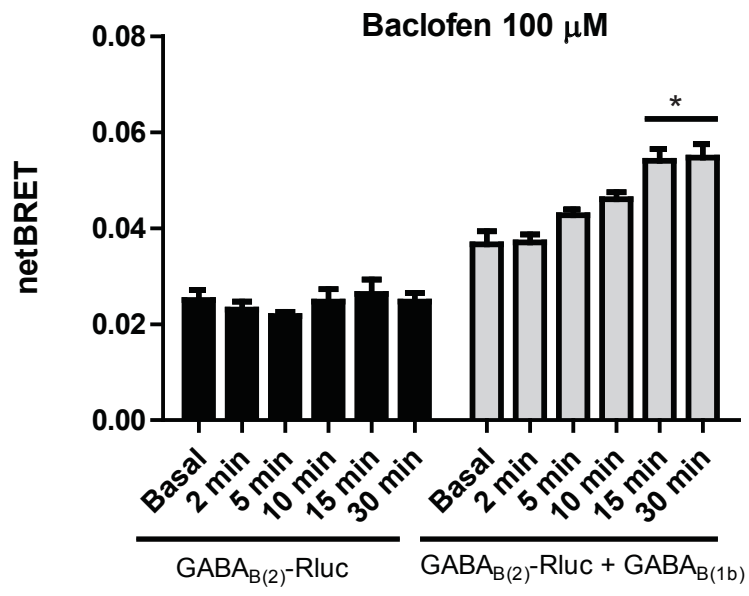


Figure 2



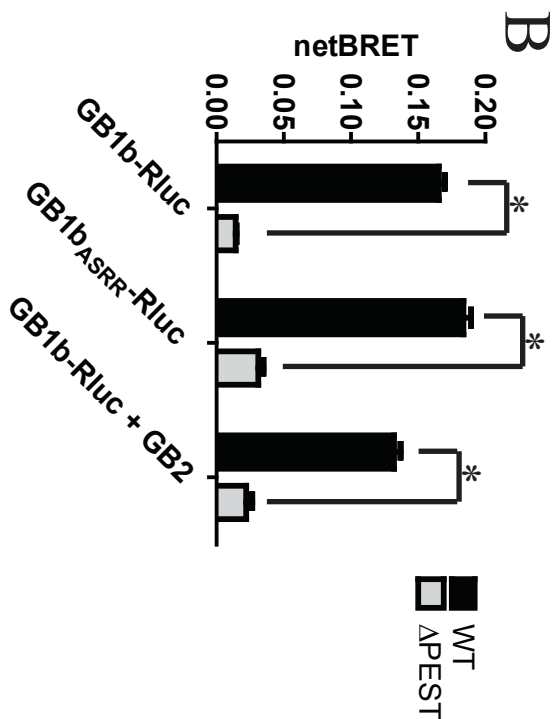
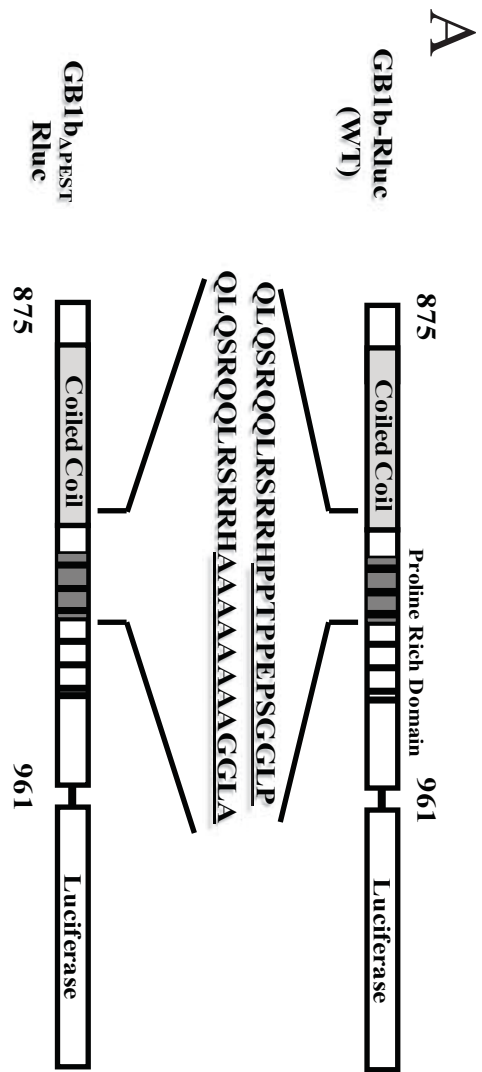


Figure 3

Figure 4

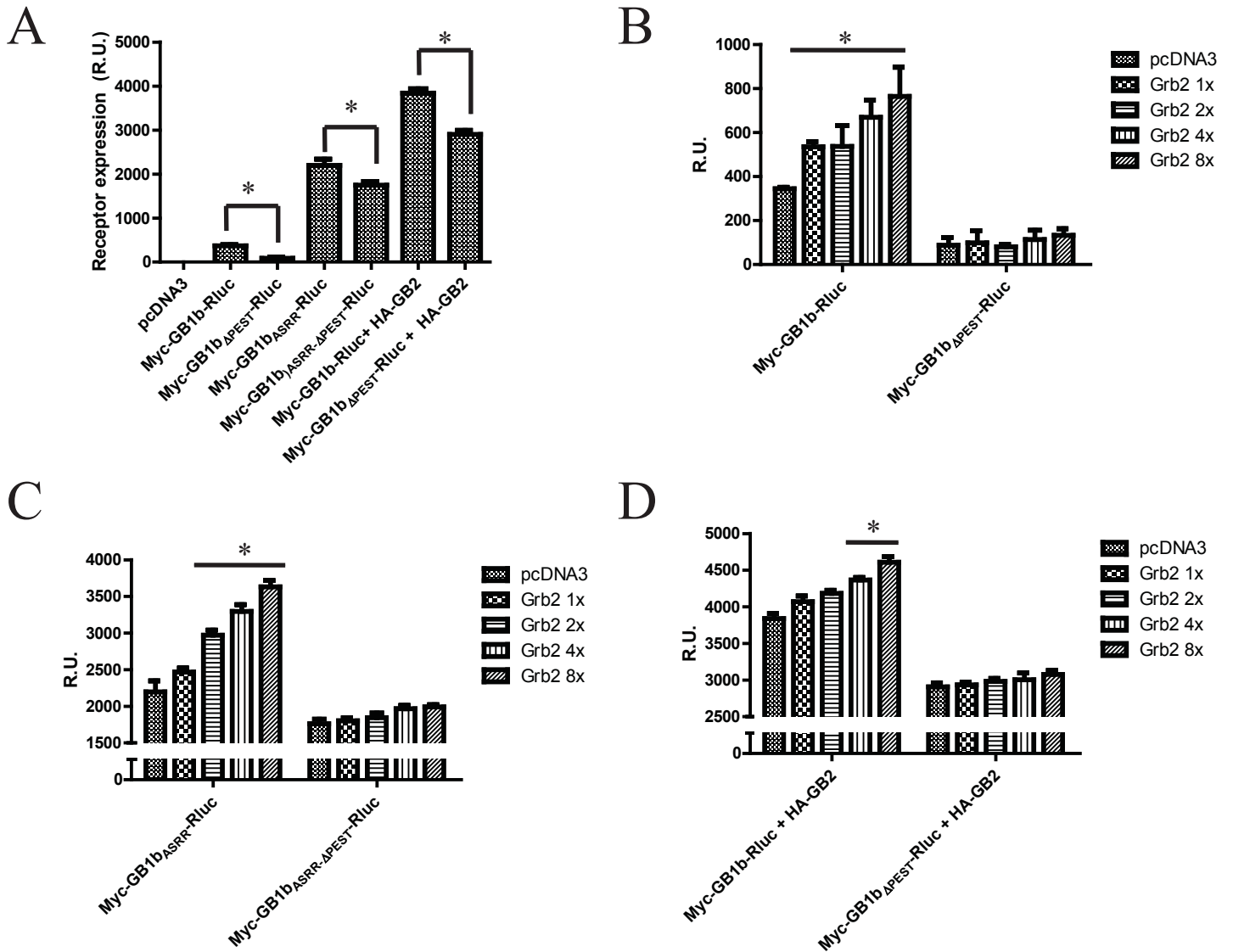


Figure 5

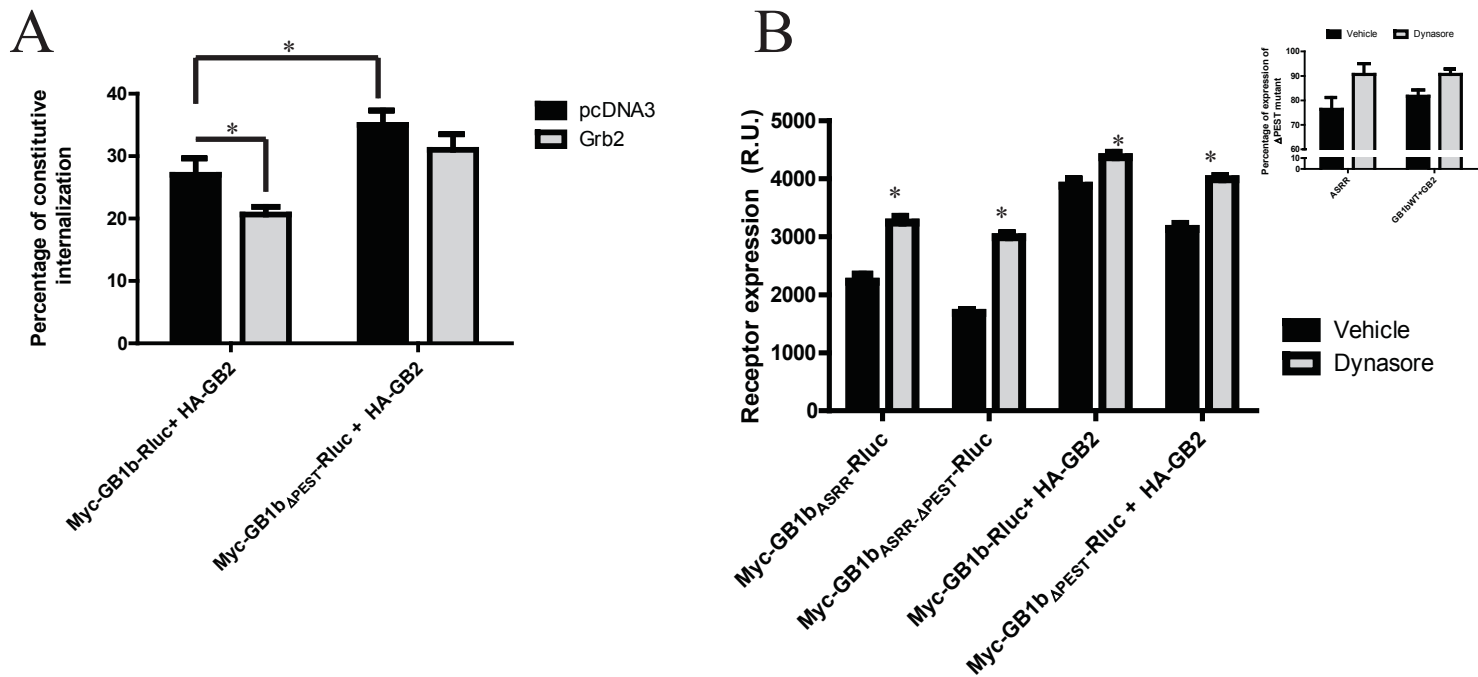


Figure S1

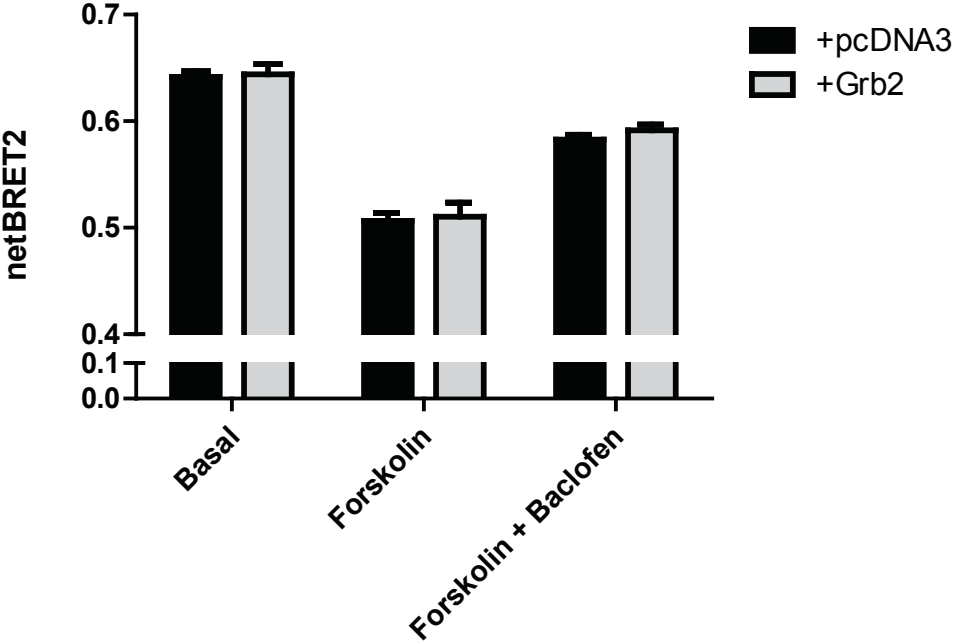


Figure S2

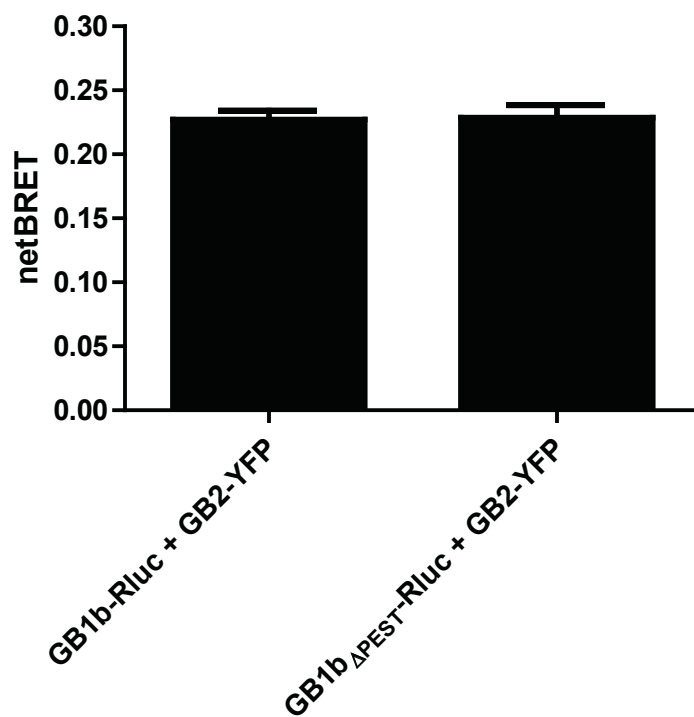


Figure S3

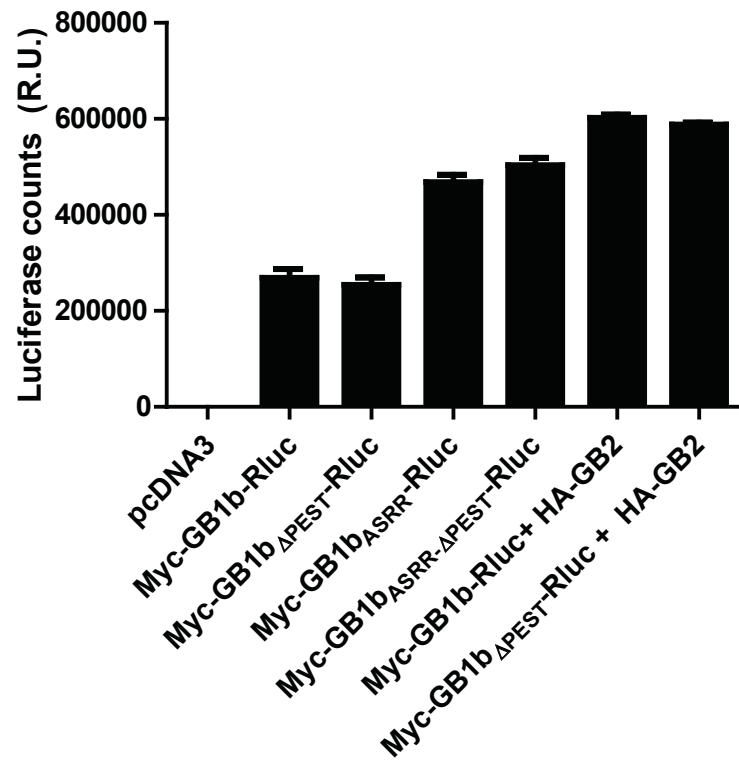


Figure S4

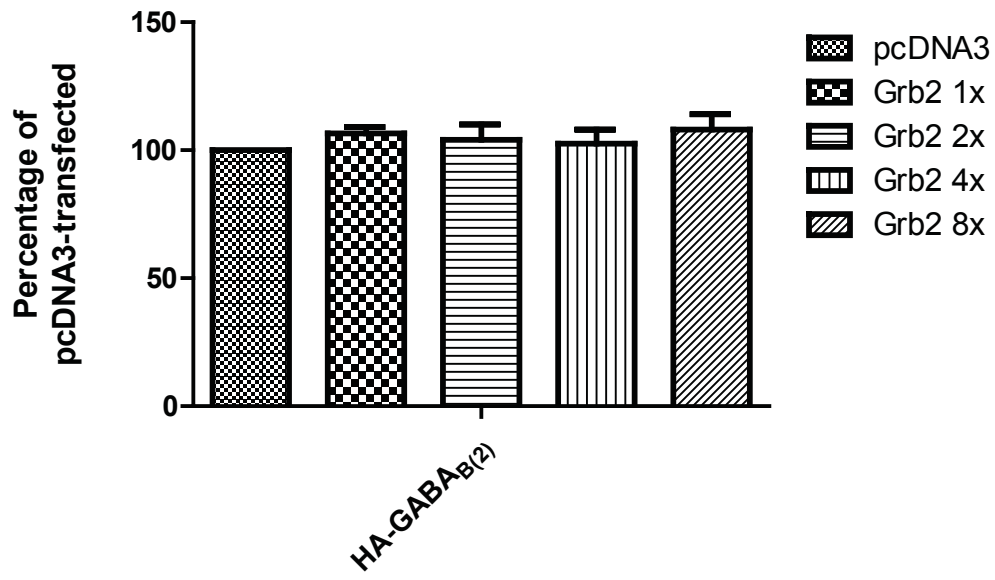
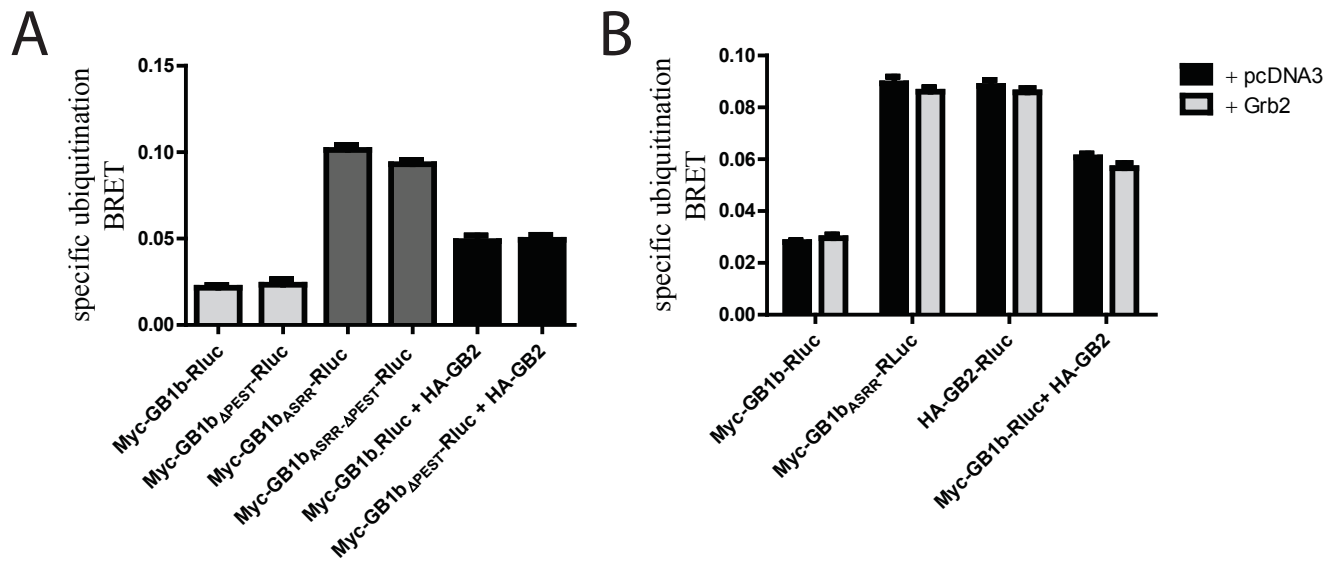


Figure S5



Discussion

Discussion générale

Le contrôle de la signalisation cellulaire liée au récepteur GABA_B a été démontré comme étant anormal pour un RCPG. Une étude des protéines d'interaction du récepteur est essentielle pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires régulant la disponibilité du récepteur et son état d'activation potentiel autant au niveau basal qu'en réponse à divers stimuli.

Les publications soumises dans cette thèse nous ont permis d'élucider diverses interactions protéiques contrôlant l'activation et l'expression à la surface du récepteur GABA_B. Premièrement, nous avons déterminé un mécanisme de désensibilisation du récepteur impliquant l'activation de PKC et l'interaction avec la protéine NSF, où l'interaction de cette dernière est importante pour l'activation de PKC, et où l'activation de PKC contrôle par la suite l'association entre NSF et le récepteur. Deuxièmement, nous avons observé le rôle d'USP14, indépendant de son activité de déubiquitination, dans la dégradation lysosomale du récepteur GABA_B. Finalement, nous avons caractérisé la liaison de la protéine Grb2 au récepteur en identifiant sa région d'interaction et son rôle dans la stabilisation du récepteur à la membrane plasmique.

La désensibilisation de GABA_B : implication de NSF et PKC

Après avoir découvert l'interaction de NSF à GABA_{B2} par la méthode de complémentation chez la levure, des expériences de liaison *in vitro* avec une protéine GST-fusionnée avec le domaine carboxyl-terminal de GABA_{B2} nous ont permis de confirmer cette interaction. Nous avons identifié NSF comme une protéine interagissant avec les deux sous-unités du récepteur, étant aussi en mesure de lier la queue carboxyl-terminale de GABA_{B1}. Ces expériences dans des conditions contrôlées nous ont permis de déterminer que la liaison de NSF aux sous-unités GABA_B est dépendante de son état de liaison et d'activité d'hydrolyse de l'ATP. Dans son rôle classique dans le mécanisme de fusion membranaire, NSF nécessite la liaison de l'ATP pour lier son substrat (231). C'est donc pour cela que nous avons bloqué

cette hydrolyse en complétant l'ATP avec de l'EDTA, ou en utilisant simplement un analogue non hydrolysable, l'ATP γ S. L'inhibition de l'activité catalytique par le NEM inhibe aussi l'interaction avec les queues carboxyl-terminales du récepteur, bien que le NEM soit une molécule non spécifique qui pourrait modifier plusieurs éléments du système. Ces résultats suggèrent que l'activité catalytique de NSF est essentielle à sa liaison avec GABA_B et que le mode de liaison observé est comparable à la liaison de NSF aux SNARE, où il est en mesure d'activer le désassemblage du complexe, laissant présager un rôle similaire sur GABA_B.

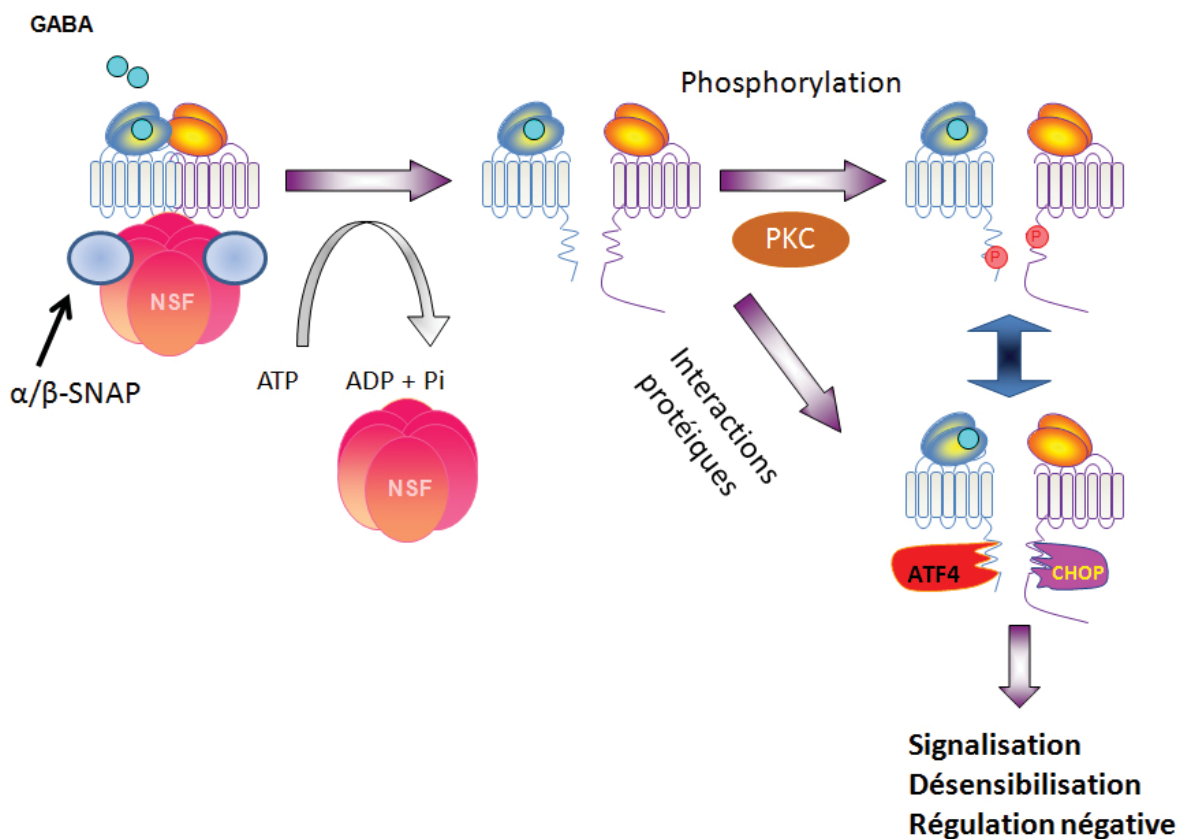


Figure 21 : Mécanisme d'action proposée pour le désassemblage du domaine *coiled-coil* de GABA_B par NSF et α/β -SNAP. L'ouverture du *coiled-coil* permettrait l'accès à des sites de phosphorylation et/ou à des sites d'interactions protéiques, par exemple ceux d'ATF4 et de CHOP.

Le modèle que nous proposons (voir figure 21) est donc que le récepteur à l'état basal est pré-associé à la protéine G et NSF. La stimulation par l'agoniste active le récepteur,

permettant l'activation $\beta\gamma$ -dépendante de PKC, qui vient phosphoryler différentes composantes du complexe, incluant le récepteur lui-même. Cette phosphorylation active NSF/SNAP, ce qui favorise le désassemblage de la structure *coiled-coil*. Le *coiled-coil* séparé devient une cible potentielle d'interaction pour plusieurs protéines, incluant 14-3-3 ζ , qui s'insère et bloque le réassemblage de la structure et maintient le récepteur dans un état désensibilisé (332). Cette ouverture pourrait aussi permettre la régulation de voies de signalisation secondaires, par exemple par le recrutement d'ATF4 ou CHOP, permettant la régulation de la transcription (289), ou de Marlin-1, permettant le transport de l'ARNm ou sa traduction locale à la synapse (330, 331). Il a été suggéré que l'activation de GABA_B pouvait réguler positivement (289) ou négativement (326) l'activité transcriptionnelle d'ATF4, activité classiquement liée à celle de CHOP dans l'induction de l'apoptose (342). Considérant que GABA_B possède un rôle anti-apoptotique (290), une hypothèse serait que l'ouverture du *coiled-coil* permet la séquestration d'ATF4 et de CHOP, inhibant ainsi leur activité transcriptionnelle pro-apoptotique.

Plusieurs expériences nous permettent de soutenir un modèle où NSF désassemble la structure *coiled-coil* du récepteur GABA_B, tel que présenté à la figure 21. Les expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules CHO nous ont permis de déterminer que NSF était en mesure de lier autant les sous-unités de façon indépendante que lorsqu'elles sont assemblées sous forme d'hétérodimère. Cela suggère que NSF lie le récepteur d'une façon différente des autres protéines d'interactions du domaine *coiled-coil*, telles ATF4 (326), Marlin-1 (330), 14-3-3 (294) et CHOP (300), car celles-ci sont typiquement compétitives à l'interaction GABA_{B1}-GABA_{B2}. Cette liaison conjointe aux deux sous-unités, pouvant être mesurée à la membrane plasmique et étant modulée par la stimulation du récepteur, s'ajoute aux évidences biochimiques sur l'importance de l'ATP dans la liaison pour supporter un modèle où NSF agit sur GABA_B dans un mécanisme similaire à ce qu'on observe sur les SNARE. Dans ce modèle, l'hexamère NSF se lie autour d'une structure *coiled-coil* comme un baril, permettant de désassembler la structure superhélicale (233).

Les résultats présentés en annexe 1 suggèrent l'identité des séquences d'interaction de NSF sur chacune des sous-unités du récepteur GABA_B. La figure 22 représente une vision schématique du *coiled-coil* GABA_{B1}-GABA_{B2}, montrant la localisation prédite des acides

aminés impliqués dans l'interaction. Des études de mutations des résidus extérieurs au zipper de leucines suggèrent que les acides aminés D806, K807 et D808 de GABA_{B2} sont importants pour la liaison de NSF. Des études de délétions séquentielles sur la queue de GABA_{B1} suggèrent que la région des acides aminés 886-903 est essentielle à liaison de NSF (Figures 3-4 de l'annexe 1). Il est intéressant de constater que les acides aminés E892, K893 et E894 sont situés dans la région d'interaction de NSF à GABA_{B1}. Dans la structure tridimensionnelle du *coiled-coil*, ces trois résidus occupent les positions miroirs des résidus D806, K807 et D808 de GABA_{B2}, ce qui peut suggérer une symétrie entre les sites de liaisons sur les deux sous-unités du récepteur, considérant les propriétés similaires du glutamate et de l'aspartate. Les résidus identifiés sur GABA_{B2} et suggérés sur GABA_{B1} sont localisés sur le *coiled-coil* de façon à projeter leurs chaînes latérales vers l'extérieur, supportant un rôle avec une protéine pouvant lier le *coiled-coil*, et la symétrie observée concorde avec la structure de baril symétrique formé par l'hexamère NSF, qui créerait alors des sites d'interactions miroirs. Supportant cette hypothèse, les sites de liaison de NSF sur d'autres récepteurs possèdent une certaine similarité à celui observé sur GABA_{B2}, possédant généralement des résidus chargés positivement essentiels à la liaison. Sur la sous-unité $\beta 1$ du récepteur GABA_A, NSF interagit avec une région (acides aminés 395-415) possédant 8 résidus basiques (arginines et lysines) (343) et sur la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA, la séquence de 11 acides aminés impliqués dans l'interaction à NSF contient elle aussi 4 résidus basiques (239). Dans le cas des interactions de NSF à des RCPG, on ne semble pas retrouver des séquences de ce type, laissant présager un mode de liaison possiblement différent (163, 241, 243, 344).

Les résultats en annexe (Figure 5) démontrent aussi la liaison *in vitro* de la queue carboxyl-terminale de GABA_{B2} aux protéines α et β -SNAP purifiées dans un essai de *GST-pulldown*. Considérant le rôle classique des SNAP comme cofacteurs importants de l'activité ATPasique de NSF dans le désassemblage des SNARE (230), ce résultat soutient le modèle où NSF agit sur GABA_B de façon à désassembler la structure *coiled-coil*. Similairement, α/β -SNAP interagissent aussi avec la protéine PICK1 et sont essentiels au désassemblage du complexe entre cette dernière et le récepteur AMPA qui implique la protéine NSF (239). Des expériences supplémentaires ont été tentées pour soutenir le modèle de désassemblage du

coiled-coil de GABA_B, mais des limitations techniques n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluants. Il reste donc à valider l'hypothèse du désassemblage expérimentalement.

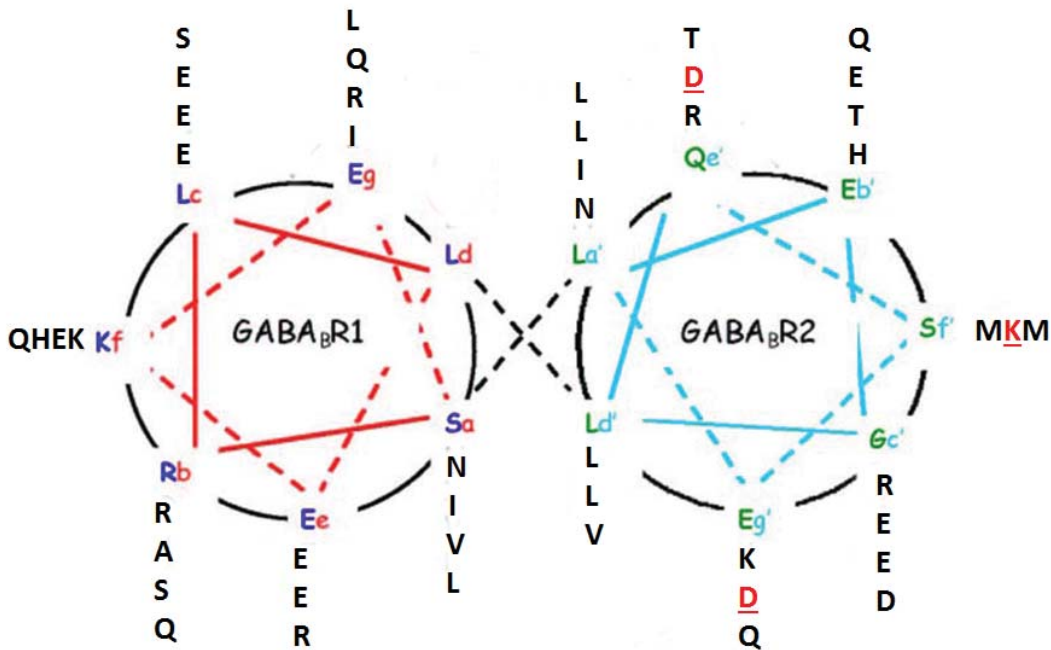


Figure 22 : Représentation schématique du *coiled-coil* entre GABA_{B1} et GABA_{B2}. Les résidus en rouge sont ceux ayant été identifiés comme site d'interaction entre GABA_{B2} et NSF. Adapté des résultats de (345) et de figures non-publiées de la Dre Stéphanie Pontier.

Modulation de l'interaction entre NSF et GABA_B

L'interaction entre NSF et ses substrats semble pouvoir être modulée par plusieurs types de modifications post-traductionnelles de la protéine. La S-nitrosylation de trois résidus cystéine sur NSF inhibe son activité, ce qui la bloque sur son substrat (234, 346). Cet effet est observable autant au niveau des complexes SNARE que sur l'interaction avec le récepteur AMPA. NSF possède aussi plusieurs sites de phosphorylations étant en mesure de réguler son activité. La phosphorylation de la sérine 237 par PKC inhibe la liaison de NSF au complexe SNARE (347), tandis que la phosphorylation de la sérine 460 et de la thréonine 461 par PKC ϵ augmente l'activité ATPasique de NSF, ce qui promeut sa dissociation du récepteur

GABA_A (348) . Sachant que PKC est intimement lié au mécanisme de régulation de l'interaction NSF-GABA_B, il est intéressant de spéculer sur l'importance de ses sites dans le rôle de NSF sur GABA_B. Nous n'avons pas été en mesure de détecter de phosphorylation de NSF par marquage métabolique (données non publiées), ce qui suggère que la dissociation de NSF du récepteur GABA_B n'est pas médiée par la phosphorylation de NSF. Cela dit, il est possible que cette phosphorylation soit présente, mais temporaire, et que nous n'ayons pas été en mesure de l'observer dans nos conditions expérimentales. Il est aussi possible que la phosphorylation de NSF par PKC ne soit pas impliquée dans la régulation de GABA_B. L'utilisation de mutants de NSF ne pouvant pas être phosphorylés permettrait d'évaluer la contribution de ces sites à la régulation du récepteur.

Nous avons cependant été en mesure de détecter une phosphorylation PKC-dépendante du récepteur en réponse à une stimulation au PMA ou au GABA. Cela pourrait suggérer que la phosphorylation de la protéine cible de NSF pourrait réguler la liaison et/ou l'activité de celle-ci. Il est connu que SNAP25, un SNARE, peut être phosphorylé par PKC, mais dans ce cas, cette phosphorylation ne semble pas moduler l'interaction avec NSF (349). Les cofacteurs SNAP peuvent aussi être phosphorylés, entre autres par PKA, modulant leur capacité à lier NSF et accélérer son activité ATPasique, ce qui pourrait faire d'eux une autre cible de régulation du complexe NSF-GABA_B (350). Nous n'avons cependant pas évalué la phosphorylation des SNAP dans la régulation de GABA_B à ce jour, mais considérant leur liaison à GABA_B, il est possible que leur phosphorylation soit importante dans la régulation du complexe NSF-GABA_B.

NSF peut aussi être phosphorylée sur la tyrosine 83 par les kinases Fes et Fer, ce qui bloque l'interaction avec les SNAP, inhibant de facto l'activité ATPasique (351). Les phosphatases PTP1B et PTP-MEG2 sont en mesure d'activer NSF en déphosphorylant ce site, permettant la liaison des SNAP (352). CaMKII est aussi impliquée dans la phosphorylation de NSF, mais le site de phosphorylation n'est pas encore connu, et aucun rôle n'y a été découvert à ce jour (350). Il est intéressant de constater que le récepteur GABA_B peut lui-même être régulé par CaMKII au niveau de son internalisation (314), et qu'il est aussi en mesure d'activer des voies d'activation impliquant des tyrosines kinases de type solubles (290), ce qui peut laisser présager d'autres éléments de régulation du complexe NSF-GABA_B que nous

n'avons pas encore évalués. Cela laisse présager un mode de régulation complexe de l'interaction où plusieurs voies de signalisation, dépendantes ou indépendantes de l'activité du récepteur GABA_B, permettent de contrôler le niveau de désensibilisation du récepteur.

L'activation de PKC par GABA_B est sensible à l'interaction de ce dernier avec NSF, car l'utilisation d'un peptide bloqueur (Pep27) de l'interaction mène à une perte de l'activation de PKC. Ce résultat suggère donc une boucle de rétroaction, où NSF est nécessaire pour activer PKC, et où PKC vient ensuite «activer» NSF à son tour pour désensibiliser le récepteur. Il est cependant difficile de proposer un modèle moléculaire précis de ce mécanisme d'activation. Il est fortement suggéré dans la littérature que l'activation de PKC par les protéines G $\alpha_{i/o}$, protéines G activées par GABA_B, passe par le dimère $\beta\gamma$ (353), contrairement à l'activation classique de PKC qui est médiée par la protéine G α_q . Il est connu que la partie proximale de la membrane de la queue carboxyl-terminale de GABA_{B2} contribue au couplage du récepteur à la protéine G hétérotrimérique, possiblement par l'entremise d'interaction avec le dimère $\beta\gamma$ (354). Il est donc possible que la présence de NSF stabilise une conformation active du récepteur qui permet une interaction optimale entre la queue carboxyl-terminale de GABA_{B2} et la protéine G, permettant l'activation des voies $\beta\gamma$ -dépendantes. En absence de NSF, la queue carboxyl-terminale de GABA_{B2} serait dans une conformation suboptimale, et l'activation des voies de signalisation $\beta\gamma$ serait donc affectée. Dans le cas d'un récepteur désensibilisé par PKC, la perte de l'interaction, combinée à la phosphorylation du récepteur, pourrait expliquer la perte d'activité du récepteur sur l'ensemble des voies de signalisation dépendantes de la protéine G.

Il reste bien sûr à découvrir le rôle précis de PKC dans ce mécanisme, ainsi que l'implication des SNAP. Il serait intéressant de mesurer la phosphorylation de la sérine 460 et de la thréonine 461 de NSF, celles-ci étant phosphorylées par PKC ϵ et ayant un rôle similaire à celui observé. Des anticorps spécifiques à ce site de double phosphorylation ont été créés, ce qui devrait permettre une méthode de détection plus sensible qu'un marquage métabolique (348). De plus, ce mécanisme a été observé dans le cadre de l'interaction GABA_A-NSF, ce qui pourrait laisser présager un rôle plus vaste de PKC (ou plus spécifiquement PKC ϵ) dans la régulation générale des voies de signalisation GABAergiques, étant en mesure de contrôler l'association de NSF aux deux types de récepteurs du GABA. Dans les deux cas, la

dissociation de NSF entraîne une régulation à la baisse du signal, induisant la désensibilisation de GABA_B et l'internalisation de GABA_A.

Dans le cadre du modèle que l'on propose, on constate que certains stimuli pourraient donc stabiliser l'interaction du récepteur avec NSF, ce qui devrait bloquer ou retarder la désensibilisation. La S-nitrosylation et la phosphorylation de la tyrosine 83 seraient deux mécanismes qui pourraient stabiliser l'interaction NSF-GABA_B, bloquant l'activité ATPasique. À noter que la synthèse d'oxyde nitrique par la nNOS est stimulée par le récepteur GABA_A (355), ce qui pourrait permettre une sensibilisation du récepteur GABA_B co-activé en parallèle. Un mécanisme de régulation croisée entre les deux voies de signalisation permettrait à GABA_B d'être actif plus longtemps avant d'être désensibilisé, amplifiant la réponse neuronale au GABA.

De plus, il serait intéressant de tester de possibles différences au niveau de la régulation du récepteur selon sa localisation pré ou post-synaptique. Considérant les différentes voies de signalisation activées, on pourrait s'attendre à une désensibilisation qui est distincte. De plus amples expériences seront toutefois nécessaires afin de bien comprendre comment ce phénomène est modulé par la localisation synaptique.

Autres rôles possibles de NSF

Il faut aussi noter qu'avec l'ensemble des autres protéines qui interagissent de façon compétitive au niveau du *coiled-coil* des sous-unités GABA_B (ATF4, CHOP, Marlin-1)(289, 300, 330), une autre hypothèse serait que NSF est nécessaire pour désassembler ces complexes, pouvant ainsi permettre à l'hétérodimère de former le domaine *coiled-coil* GABA_{B1}-GABA_{B2} favorisant leur transport à la membrane. En ce sens, on note que la majorité de ces interactions ont été détectées dans le RE, et que NSF est aussi en mesure d'interagir avec les sous-unités à ce niveau. Cela s'avérerait une hypothèse intéressante que NSF soit en mesure de contrôler la formation du *coiled-coil* autant que son désassemblage. Il est cependant difficile de suggérer quel serait le stimulus qui initierait l'activité de NSF pour promouvoir cette action, surtout au sein du RE. Néanmoins, on observe qu'une stimulation à la membrane du récepteur mène à une perte quasi complète de l'interaction avec NSF, incluant les récepteurs retenus dans le réticulum. Cela pourrait donc suggérer un mécanisme où

l'activation à la membrane plasmique stimule l'activité de NSF sur un complexe GABA_{B1}-interacteur intracellulaire, permettant à GABA_{B1} de dimériser avec GABA_{B2} et favorisant un trafic des réserves intracellulaires vers la membrane, augmentant la densité à la surface. Dans ce cadre, l'élément limitant le trafic serait la formation du *coiled-coil* spécifique GABA_{B1}-GABA_{B2}. Il faut noter que ce modèle est purement spéculatif, car nous n'avons jamais testé la présence de NSF dans un complexe ternaire d'une sous-unité GABA_B et un partenaire d'interaction intracellulaire.

Contrôle de la densité à la membrane plasmique par l'internalisation

L'étude du rôle de NSF sur les récepteurs membranaires semble suggérer une implication au niveau de la stabilité membranaire des récepteurs, de l'internalisation et du recyclage. En effet, autant sur le récepteur AMPA (356) que GABA_A (343, 357), NSF possède un site d'interaction compétitive au complexe AP-2, complexe de recrutement de la clathrine et promoteur de l'internalisation. Dans les deux cas, ces interactions sont modulées par PKC (238, 348). Il a été suggéré que GABA_B pouvait interagir avec AP-2 (303), et nous avons été en mesure de mesurer l'interaction entre GABA_{B2} et AP2 en BRET (Figure 6 de l'annexe 1). Cette interaction est beaucoup plus forte lorsque le site d'interaction GABA_{B2}-NSF est muté, suggérant que la perte de l'interaction avec NSF permet une interaction plus forte à AP-2. Dans le même sens, la surexpression de NSF mène à une diminution du signal entre AP-2 et le récepteur de type sauvage, mais n'a pas d'effet sur le récepteur mutant ne pouvant plus lier NSF. De plus, la surexpression de NSF mène effectivement à une diminution de l'internalisation constitutive de l'hétérodimère (Figure 7 de l'annexe 1). Cela semble donc contradictoire avec nos résultats qui suggèrent que la stimulation du récepteur par le GABA mène à une dissociation de NSF, mais ne mène pas à une internalisation du récepteur. Il est possible que l'action de dissociation induite par le GABA n'ait pas le même effet que l'absence d'interaction initiale. En ce sens, le récepteur désensibilisé a perdu son interaction avec NSF, tandis qu'un récepteur qui n'interagit pas avec NSF au départ (par inhibition par pep27) est actif, mais n'est pas en mesure d'être désensibilisé, suggérant que le potentiel d'activation du récepteur n'est pas dépendant de son interaction à NSF, mais sa propension à être inactivé peut l'être. Pour expliquer l'absence d'internalisation promue par l'agoniste, nous pourrions suggérer que l'action de NSF sur le récepteur ne le rend pas propice

à l'interaction avec AP-2, ou qu'il nécessite potentiellement un facteur supplémentaire absent dans nos conditions. En ce sens, il serait intéressant de tester le rôle de NSF sur l'internalisation de GABA_B induite par le glutamate (323), permettant ainsi de mesurer l'action de NSF sur un signal d'internalisation plus fort et inductible.

NSF a aussi été impliqué dans un rôle de contrôle de la diffusion latérale du récepteur AMPA au sein des neurones (358, 359). La localisation membranaire précise est d'une importance capitale pour les récepteurs neuronaux. Un récepteur ionotropique doit être à la synapse pour pouvoir permettre l'entrée d'ions et moduler le potentiel membranaire. C'est pourquoi plusieurs de ces récepteurs sont ancrés à cet endroit par des interactions avec des protéines PDZ, qui vont souvent elles-mêmes être liées au cytosquelette (360). Il est suggéré que le rôle de NSF à ce niveau est de désassembler le complexe PICK1-GluR2, ce qui permet l'interaction avec les protéines PDZ ABP ou GRIP, qui stabilise alors le récepteur à la synapse (237). Le récepteur GABA_B diffuse très lentement dans les neurones, ce qui suggère qu'il peut aussi être associé au cytosquelette. Il a été proposé qu'une région de la queue carboxyl-terminale de GABA_{B2} contrôle cette stabilité (361). Il est intéressant de noter que cette région a été suggérée comme région d'interaction avec la β -filamine, une protéine associée au cytosquelette d'actine (335). Une hypothèse serait donc que l'interaction de NSF au récepteur serait en mesure de contrôler sa localisation membranaire, possiblement par son attachement au cytosquelette. Il n'est pas encore clair si ce rôle serait dû à l'action directe de NSF ou seulement par sa compétition avec d'autres protéines d'interaction, incluant la β -filamine.

L'ensemble des hypothèses avancées précédemment repose sur l'action de NSF en tant que modulateur de l'activité du récepteur, mais il est possible de voir la situation de façon inverse, où le récepteur module l'activité de NSF pour avoir un effet cellulaire. NSF est une composante essentielle de la cellule, étant nécessaire pour le processus de fusion membranaire et donc pour l'ensemble des processus de transport vésiculaire. Le récepteur GABA_B est quant à lui connu pour inhiber la relâche de neurotransmetteur à la membrane présynaptique, un processus qui repose sur la fusion contrôlée de membranes. L'action connue de GABA_B repose sur deux effets distincts : l'inhibition des canaux calciques dépendants du voltage par le dimère $\beta\gamma$, bloquant ainsi l'entrée de calcium nécessaire à la fusion membranaire, ainsi que l'inhibition de l'arrimage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique par diminution

de la quantité d'AMPC (287). On peut cependant envisager que GABA_B pourrait aussi directement moduler NSF et les SNAP pour contrôler les processus de fusion et d'arrimage des vésicules. Un premier mécanisme hypothétique serait que GABA_B pourrait séquestrer NSF, l'empêchant d'aller agir sur les complexes SNARE. Cela nécessiterait que la quantité de NSF présente à la synapse soit limitante. Sachant que l'interaction de NSF au complexe cis-SNARE peut être inhibée par la phosphorylation de sa sérine 237 par PKC, l'activation du récepteur et subséquentment de PKC pourrait inhiber la liaison aux SNARE, bloquant là aussi l'arrimage des vésicules. Il sera intéressant d'étudier plus en détail ces possibilités pour établir le spectre de régulation du couple NSF-GABA_B.

USP14 comme protéine d'interaction de GABA_B: déubiquitination et dégradation

Le deuxième manuscrit soumis dans cette thèse traite des mécanismes liés à la dégradation du récepteur GABA_B. À l'aide d'un criblage par complémentation chez la levure, nous avons identifié la déubiquitinase USP14 comme protéine d'interaction de la deuxième boucle intracellulaire de GABA_{B1}.

Il avait précédemment été suggéré que le récepteur GABA_B peut être ubiquitiné, et que cette ubiquitination est impliquée dans sa régulation négative par le glutamate (362). En effet, une stimulation neuronale soutenue en glutamate diminue fortement la quantité de récepteurs GABA_B, et cet effet est partiellement bloqué par PYR-41, un inhibiteur de la seule enzyme de conjugaison E1 de l'ubiquitine chez l'humain (363), suggérant que ce processus de régulation négative nécessite l'apport de voies d'ubiquitination. De plus, des peptides ubiquitinés des deux sous-unités ont été récemment découverts dans un criblage protéomique de cerveaux de rat (207). Ce criblage a déterminé que les lysines 887 et 905 de GABA_{B1}, et 771 et 801 de GABA_{B2} pouvaient être des substrats d'ubiquitination. La lysine 771 de GABA_{B2} a aussi été identifiée comme un substrat de l'ubiquitine ligase E3 Hrd1 dans les processus d'ERAD, suggérant un rôle physiologique à cette ubiquitination (338). Sachant que le contrôle de la densité de récepteur à la surface est primordial au bon fonctionnement des neurones et que le récepteur semble sujet à l'ubiquitination, nous nous sommes intéressés à la régulation possible du récepteur GABA_B par l'ubiquitination, ainsi que par la déubiquitinase USP14.

Nous avons utilisé une technique développée au laboratoire permettant de mesurer l'ubiquitination par BRET (205). Nous avons constaté qu'à l'état basal, autant les deux sous-unités monomériques que le récepteur hétérodimérique sont fortement ubiquitinés. Cette ubiquitination est amplifiée par l'activation de PKC, mais pas par le GABA. Considérant l'absence de régulation négative induite par l'activation par le GABA (301, 303), ce constat n'est pas surprenant. En effet, bien que l'activation soutenue du récepteur GABA_B semble induire une certaine diminution de la quantité de récepteur à très long terme (301), aucune accélération de l'internalisation n'est induite par l'agoniste. Cependant, nous démontrons que l'activation de PKC a comme effet d'accélérer la dégradation du récepteur et d'augmenter son internalisation. Il est déjà connu que PKC est en mesure de réguler négativement le récepteur (364), incluant par la phosphorylation et la désensibilisation (302), il est donc tentant de spéculer que cette phosphorylation pourrait induire l'ubiquitination, car il a aussi souvent été démontré que la phosphorylation par PKC d'un substrat pouvait induire son ubiquitination (365, 366).

Nous pouvons aussi spéculer sur le rôle de l'ubiquitination dans le processus d'internalisation. L'ubiquitination de la β -arrestine en réponse à l'activation de plusieurs RCPG (209), et l'ubiquitination directe de plusieurs RTK, incluant l'EGFR, sont des étapes importantes de l'internalisation dans ces situations respectives (197). Considérant l'absence de recrutement de la β -arrestine par GABA_B, un mécanisme possible de recrutement de la machinerie d'endocytose serait par le biais de l'ubiquitination et le recrutement des protéines de la famille epsin/Eps15. Les protéines de la famille epsin/Eps15 sont des protéines d'échafaudage étant en mesure de lier l'ubiquitine et de recruter le complexe d'internalisation AP-2 (367). Cette hypothèse est supportée par l'augmentation de l'ubiquitination observée suite à un traitement avec le Dynasore, inhibant l'internalisation. Cela démontre qu'une partie de l'ubiquitination du récepteur est en amont de l'endocytose. De plus, la stimulation au PMA induit l'ubiquitination du récepteur prend place en amont de l'internalisation. Il est donc facile d'imaginer qu'une augmentation de l'ubiquitination de GABA_B à la surface augmente ses chances de recruter l'epsin, lui permettant d'être recruté aux puits de clathrines.

Une question que nous n'avons pas abordée expérimentalement, mais qui sera importante, est le type d'ubiquitination que subit le récepteur. En effet, la détection par le

BRET ne permet pas de déterminer si nous observons de la monoubiquitination, de la multimonoubiquitination ou différentes formes de polyubiquitination. Considérant l'étude de «l'ubiquitome» du cerveau de rat, quatre sites potentiels d'ubiquitination de GABA_B ont été identifiés, suggérant une multiubiquitination du récepteur. Ce type d'étude de protéomique ne permet toutefois pas de différencier la monoubiquitination de la polyubiquitination, il est donc possible que le récepteur subisse une forme plus complexe d'ubiquitination. Il sera intéressant de tenter d'identifier le type d'ubiquitination observée, car cela pourrait permettre d'associer différents effecteurs par le type de chaîne d'ubiquitine pouvant être liées. Il a aussi été démontré que les lysines 767 et 771 de la sous-unité GABA_{B2} étaient polyubiquitinées sur la lysine 48, polyubiquitination généralement associée à la dégradation protéasomale, dans le processus d'ERAD (338), mais il n'est pas clair que cette ubiquitination est extrapolable à ce que nous mesurons à la membrane plasmique. En effet, il semble que l'ubiquitine ligase E3 Hrd1 soit responsable de l'ubiquitination liée à l'ERAD, et Hrd1 est une protéine résidente du RE (368). Cependant, il semble que certaines protéines impliquées dans le contrôle de qualité du repliement et l'ERAD soient en mesure d'agir sur les protéines mal repliées une fois qu'elles ont atteint la membrane plasmique, on ne peut donc pas exclure que l'ubiquitination de GABA_B de surface soit en partie liée à ce processus (369). Nous avons entrepris des expériences nous permettant d'identifier les potentiels sites d'ubiquitination du récepteur.

Une des questions majeures que notre étude soulève et qui devra être étudiée est l'identité de l'ubiquitine ligase E3 responsable de l'ubiquitination de GABA_B. Considérant qu'il existe plus de 600 ligases E3 différentes, l'identification exacte risque d'être complexe. Dans les différents criblages à haut débit effectués à ce jour sur GABA_B, aucune ligase E3 n'a été détectée. Il est possible que ce recrutement s'opère via une protéine d'échafaudage, expliquant l'absence dans les criblages. Néanmoins, il sera intéressant d'identifier la ou les ligases E3 impliquées, permettant possiblement de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'ubiquitination et les possibles stimuli précis pouvant la stimuler. Il faut soulever la possibilité que l'ubiquitination constitutive soit effectuée par une ligase distincte de l'ubiquitination dépendante de PKC, ce qui invoquerait ainsi au moins deux mécanismes distincts.

L'endocytose promue par l'ubiquitination a souvent été liée à de la monoubiquitination ou de la multimonoubiquitination, et plus récemment à de la polyubiquitination sur la lysine 63 (370). La polyubiquitination semble plutôt être importante dans le triage endosomal, entre autres au niveau de la liaison des différents complexes ESCRT (167). Nous n'avons pas évalué si le récepteur GABA_B interagissait avec cette machinerie dans le cadre de sa dégradation, mais il s'agirait d'une hypothèse logique, qui nous permettrait en plus de directement lier son ubiquitination à sa dégradation. Nos résultats semblent suggérer un tel lien, car l'augmentation de l'ubiquitination par PKC est corrélée à une augmentation de la dégradation. Un mécanisme similaire à ce que nous observons sur GABA_B a été observé sur le récepteur CXCR4, qui interagit avec USP8, et cette dernière module son triage endosomal et sa dégradation (218). Dans ce cas, l'ablation par interférence par ARN d'USP8 bloque le récepteur ubiquitiné au niveau du complexe ESCRT-0, ce qui est en accord avec les évidences que le triage endosomal lié aux complexes ESCRT nécessite la déubiquitination des substrats (371).

Nous avons constaté qu'USP14 est bel et bien en mesure de déubiquitiner GABA_B, et que cette action se fait suite à l'endocytose du récepteur. De plus, USP14 accélère la dégradation du récepteur, et ce même en absence de son activité enzymatique. Il avait déjà été constaté que USP14 était nécessaire à la dégradation dépendante de l'agoniste du récepteur CXCR4, suggérant dans ce cas un cycle ubiquitination-déubiquitination au processus de dégradation lysosomale (217). Dans ce cas, l'expression d'USP14 avait été diminuée par interférence par ARN, et l'effet sur la dégradation avait été associé à son activité déubiquitinase. Il est donc possible que son effet sur la dégradation de CXCR4 soit indépendant de son activité catalytique, cela n'ayant pas été testé. Au sein du protéasome, USP14 est lié au processus d'activation de l'activité protéase, ce qui suggère aussi un rôle pro-dégradation, et dans ce cas aussi, l'activité catalytique de USP14 n'est pas nécessaire (195). En effet, il semble que la simple liaison de la chaîne d'ubiquitine à USP14, actif ou non, soit en mesure d'induire une augmentation de l'activité protéase du protéasome. Pris ensemble, ces évidences semblent supporter un rôle pour USP14 dans la promotion de la dégradation qui est indépendant de son activité catalytique.

Dans le but d'établir la spécificité d'USP14 sur différents RCPG, nous avons déterminé qu'elle était en mesure de déubiquitiner non seulement GABA_B et CXCR4, mais aussi le récepteur V2 de la vasopressine. Il semble donc qu'USP14 puisse avoir un rôle plus large dans la régulation des différents RCPG. Compte tenu de nos résultats sur GABA_B et le rôle connu d'USP14 dans la dégradation de CXCR4, il sera intéressant de tester cette activité sur un panel plus grand de récepteurs et d'évaluer non seulement la déubiquitination, mais aussi la dégradation de ces récepteurs.

USP14 est intimement liée à un phénotype d'ataxie observé chez les souris nommées *ataxia*, où la quantité d'USP14 est fortement diminuée par inactivation génétique (372). Plusieurs défauts neuronaux ont été observés chez les souris *ataxia*. On remarque un problème dans l'arrimage des vésicules de relâche de neurotransmetteur (373), diminuant par ainsi la plasticité synaptique et les mécanismes de mémoire à long terme (374). Ce phénotype peut être restauré en surexprimant le mutant catalytiquement inactif d'USP14 (375), suggérant qu'une partie des effets observés chez la souris ne sont pas dus à l'activité enzymatique et étant compatible avec nos résultats suggérant un rôle d'USP14 indépendant de son activité catalytique.

Il a été démontré la souris *ataxia* présente un récepteur GABA_A possédant «*turn-over*» modifié, étant moins ciblé à la dégradation, ce qui entraîne une augmentation de la densité de surface du récepteur au détriment des réserves intracellulaires (376). Tout comme dans notre étude, ces travaux ont démontré une interaction directe entre le récepteur GABA_A et USP14. En effet, un peptide bloqueur de l'interaction entre GABA_A et USP14 augmente la quantité de récepteurs observés dans des cellules HEK293, ce qui suppose qu'USP14 est impliqué dans la dégradation de GABA_A. La quantité plus élevée de GABA_A à la membrane synaptique mène à la génération de courants post-synaptiques inhibiteurs plus puissants, diminuant ainsi les chances du neurone de franchir son seuil d'activation et pouvant être impliquée dans le phénotype d'ataxie. Le rôle d'USP14 au niveau de la dégradation de GABA_B suggère un mécanisme similaire, où la quantité totale de récepteurs pourrait être affectée par l'ablation de la déubiquitinase, et pourrait contribuer au phénotype d'ataxie.

Au niveau de la plasticité synaptique, l'arrimage des vésicules à la membrane synaptique est primordial au mécanisme de relâche contrôlée de neurotransmetteur. Le

récepteur GABA_B est fortement impliqué dans cet arrimage par le contrôle de la concentration d'AMPC au niveau présynaptique (287). Les problèmes observés chez la souris *ataxia* pourraient potentiellement être expliqués par une augmentation du nombre de récepteur GABA_B à la membrane présynaptique, ce qui pourrait entraîner une diminution chronique d'AMPC ralentissant l'arrimage des vésicules à la membrane. La perte d'USP14 diminuerait le ciblage de GABA_B vers la dégradation lysosomale, augmentant ainsi la concentration de récepteur à la synapse.

Mécanisme d'action proposé pour l'ubiquitination et USP14

Notre modèle (figure 23) propose que le récepteur GABA_B puisse être ubiquitiné à la membrane plasmique de façon constitutive ou en réponse à certains stimuli, telle l'activation de PKC. Une fois ubiquitiné, le récepteur est en mesure de recruter des protéines liant l'ubiquitine, telle l'epsin. L'epsin permet de recruter le complexe pro-endocytose AP-2, qui amène le récepteur vers les puits de clathrines. Une fois internalisé, le récepteur interagit avec USP14, qui va promouvoir un triage endosomal vers les corps multivésiculaires et les complexes ESCRT. Un rôle similaire à celui observé pour USP8 dans la régulation de CXCR4 peut être envisagé, où USP14 serait essentiel à la progression de GABA_B vers le ciblage lysosomal. Nous avons observé que l'inhibition de la dégradation lysosomale bloque complètement la perte de GABA_B, démontrant que la dégradation du récepteur membranaire emprunte cette voie. Dans ce processus, USP14 serait en mesure de déubiquitiner le récepteur une fois le ciblage effectué, permettant un recyclage de l'ubiquitine monomérique. Nous observons qu'USP14 promeut la dégradation de GABA_B de façon indépendante de son activité déubiquitinase. Notre modèle suggère donc que ce ne serait pas l'activité catalytique qui serait nécessaire pour cibler le récepteur vers le triage endosomal, mais plutôt l'occupation de la poche enzymatique par une chaîne d'ubiquitine. On pourrait comparer ce rôle à celui d'USP14 au sein du protéasome, où la liaison de l'ubiquitine favorise l'activité ATPasique du complexe protéasomal (195). Dans ce contexte, l'ajout de chaînes non ancrées d'ubiquitines est suffisant pour augmenter l'activité protéasomale, et ce même en présence d'USP14 catalytiquement inactif. Cependant, l'ablation de l'ensemble du domaine catalytique bloque cet effet, suggérant que la liaison de la chaîne est nécessaire et suffisante pour induire l'activation.

Dans le modèle proposé, USP14 agirait comme une protéine de ciblage, escortant le récepteur vers sa dégradation. Il va être important de mieux comprendre comment fonctionne le triage endosomal entre le recyclage et la dégradation et le rôle qu'USP14 peut y jouer. Il a été suggéré que la déphosphorylation de la sérine 783 de GABA_{B2} favorisait la dégradation au détriment du recyclage (325), mais aucun mécanisme de triage n'a été proposé à ce niveau. Il serait intéressant de mesurer si ce site de phosphorylation est impliqué dans l'ubiquitination du récepteur et dans l'interaction potentielle avec USP14. Il sera aussi nécessaire d'intégrer ce modèle aux évidences de la régulation négative par le glutamate, pour proposer un modèle plus complet du contrôle de la densité de surface du récepteur GABA_B par l'ubiquitination, l'endocytose et le triage endosomal.

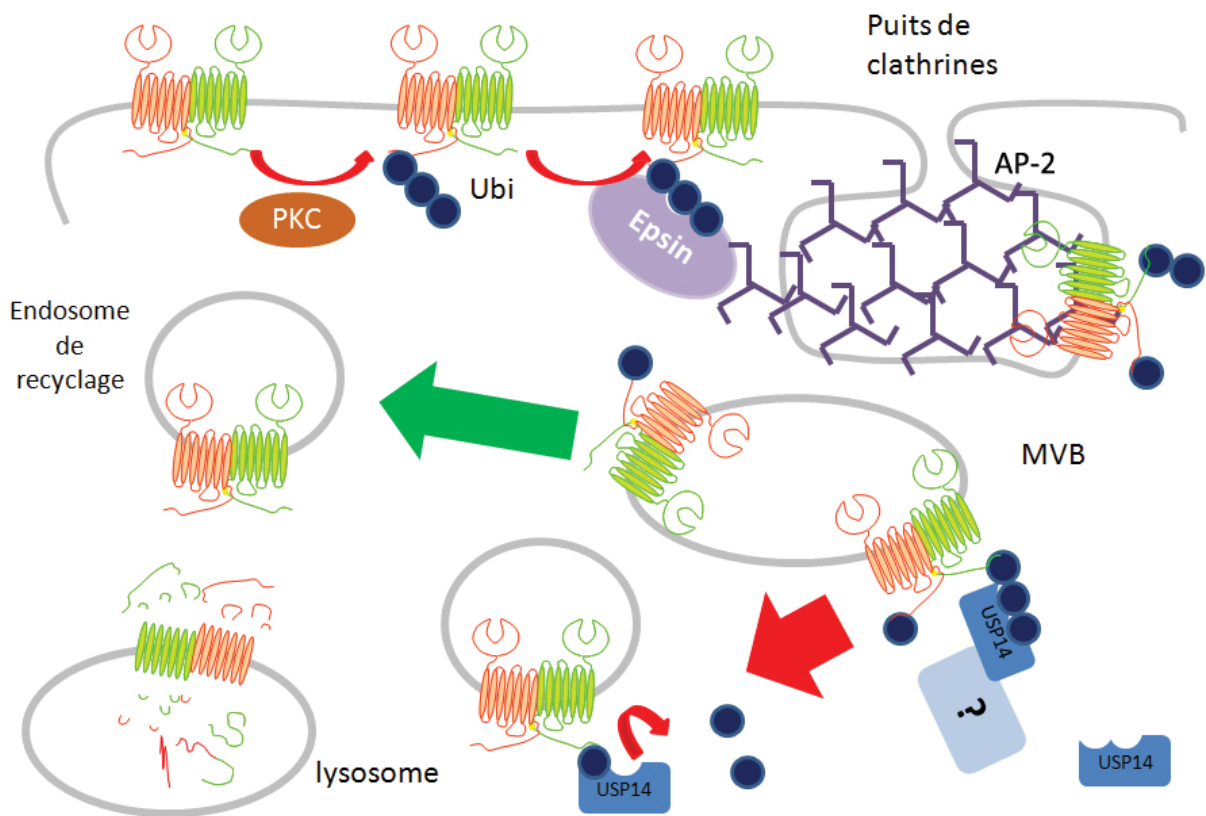


Figure 23 : Modèle proposé de la régulation de l'internalisation et de la dégradation du récepteur GABA_B par l'ubiquitination et la déubiquitinase USP14. L'activation de PKC favorise l'ubiquitination du récepteur, ce qui promeut le recrutement de l'epsin et l'internalisation par les puits de clathrine. Au niveau du triage endosomal dans les corps

multivésiculaires (MVB), la présence de chaîne d'ubiquitine favorise la liaison d'USP14 et un ciblage vers la dégradation lysosomale.

Autre rôle potentiel de l'interaction USP14-GABA_B

Bien que le rôle que nous proposons pour USP14 se situe après l'internalisation, nous avons observé une interaction avec le récepteur à des étapes en amont, soit au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique (données non publiées). Nous nous sommes attardés au rôle d'USP14 sur GABA_B, mais nous pourrions aussi suggérer que le récepteur est en mesure d'agir sur USP14 elle-même. Une hypothèse intrigante repose sur l'importance d'USP14 au sein de l'activation du protéasome. Le protéasome est essentiel à plusieurs fonctions synaptiques, incluant dans les mécanismes de plasticité synaptique dans lequel GABA_B est impliqué (377). Il a récemment été démontré que CamKII est en mesure de recruter le protéasome directement à la synapse (378), et est aussi en mesure de moduler l'activité du protéasome par phosphorylation de sa sous-unité Rpt6 (379). CamKII est aussi recrutée au récepteur GABA_B par l'activation des récepteurs NMDA (380) et USP14 est impliqué dans l'activation du protéasome en liant les substrats ubiquitinés (195, 381). On peut donc imaginer un mécanisme où le recrutement du protéasome au récepteur GABA_B par CaMKII serait en mesure de moduler l'activité du protéasome en permettant une interaction directe entre USP14 ancrée au récepteur et le protéasome, ayant ainsi un effet sur la plasticité synaptique. Inversement, il est aussi possible que le recrutement du protéasome directement sur le récepteur puisse promouvoir la dégradation de certaines protéines membres du «signalosome» du récepteur. En ce sens, il serait possible d'observer l'effet de l'activation de CamKII sur l'interaction USP14-GABA_B par des études de coimmunoprécipitation ou de BRET. Il serait aussi possible d'évaluer l'activité du protéasome en réponse à l'activation du récepteur GABA_B en présence ou en absence de glutamate.

Grb2 et le trafic membranaire du récepteur GABA_B

Caractérisation de l'interaction Grb2-GABA_{B1}

La troisième étude de cette thèse porte sur la découverte d'une interaction entre la protéine d'échafaudage Grb2 et la queue carboxyl-terminale de GABA_{B1}. Les RCPG de la

famille C possèdent une très longue queue carboxyl-terminale qui est généralement riche en interactions protéiques, et le récepteur GABA_B ne fait pas exception à cette règle (382). Plusieurs protéines ont déjà été identifiées pour interagir avec chacune des sous-unités (383), mais malgré tout, des motifs de liaison consensus sont présents dans les domaines intracellulaires et n'ont pas révélés à ce jour de protéines d'interactions. Nous nous sommes intéressés à la séquence PEST présente tout juste après la région *coiled-coil* de GABA_{B1} pour plusieurs raisons : premièrement, les séquences PEST ont souvent été impliquées dans la phosphorylation, l'ubiquitination et la protéolyse des protéines les possédants (317), et deuxièmement, cette région comporte plusieurs sites consensus (P-x-x-P) de liaison à des domaines SH3.

Nous avons identifié la protéine Grb2 comme protéine d'interaction avec la partie distale du domaine carboxy-terminal, en aval du domaine *coiled-coil*. Nous avons vérifié cette interaction par BRET, et avons ainsi pu constater que l'interaction avait lieu autant au niveau du réticulum endoplasmique que de la membrane plasmique. Grb2 ne démontre aucune capacité de liaison avec GABA_{B2} seul au niveau basal, ce qui est compatible avec l'absence de séquence P-X-X-P dans les domaines intracellulaires de la sous-unité, ne permettant pas la liaison de domaines SH3. Cependant, la co-expression de GABA_{B1(b)} permet la détection d'un signal d'interaction entre GABA_{B2} et Grb2, pouvant suggérer la formation d'un complexe ternaire entre le récepteur hétérodimérique et Grb2, ce qui est aussi soutenu par la détection de l'interaction entre GABA_{B1(b)} et Grb2 lors de la co-expression de GABA_{B2}. Dans le même sens, la stimulation par l'agoniste mène à une augmentation du signal BRET Grb2-GABA_{B2}, suggérant l'association de Grb2 à un récepteur fonctionnel à la membrane plasmique. Cette augmentation du signal peut être expliquée par une augmentation de la quantité de Grb2 interagissant avec GABA_B ou à un remodelage du complexe entraînant un mouvement des protéines et une différence dans la mesure du BRET. Considérant que l'association de Grb2 au récepteur diminue son internalisation constitutive, une augmentation de l'interaction promue par l'agoniste suggère une modulation de l'internalisation par celui-ci, ce qui n'est pas observé (données non publiées et 325). Nos résultats supportent donc plutôt un changement conformationnel du complexe GABA_B-Grb2 en réponse au baclofen.

L'interaction entre Grb2 et GABA_{B1} se situe bien au niveau de la séquence PEST, car la mutation de cette séquence (Δ PEST) entraîne une perte de l'interaction avec Grb2. Ce signal ne peut être restauré par l'expression de GABA_{B2}, ce qui supporte que le site d'interaction sur GABA_{B1} est le seul de l'hétérodimère fonctionnel.

Grb2 augmente l'expression membranaire de GABA_B

La surexpression de Grb2 mène à une augmentation du transport du récepteur à la membrane plasmique. Cet effet est visible autant sur le récepteur GABA_{B1(b)} exprimé seul que sur l'hétérodimère. Nous observons que cette surexpression de Grb2 permet d'augmenter la présence de GABA_{B1(b)} de type sauvage à la membrane même en absence de GABA_{B2}, ce qui est surprenant considérant la présence du site de rétention sur la queue carboxyl-terminale. Bien que la quantité exprimée demeure faible, ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi il est possible de mesurer, dans certaines conditions, de la signalisation dépendante de GABA_{B1} en l'absence de co-expression de GABA_{B2} (262, 384). Un mécanisme possible pouvant expliquer cet effet de Grb2 repose sur la localisation de son site d'interaction, se situant près de la séquence de rétention R-S-R-R de GABA_{B1}. L'interaction avec Grb2 pourrait permettre de partiellement masquer la séquence, ce qui expliquerait la faible quantité retrouvée à la surface due à un masquage suboptimal du motif. De façon similaire, la sous-unité γ 2S du récepteur GABA_A interagit avec cette même séquence de GABA_{B1} et favorise elle aussi son transport à la membrane plasmique (1), ce qui suggère l'importance de la séquence PEST dans le trafic du récepteur vers la surface cellulaire. Considérant la proximité de la séquence PEST du domaine *coiled-coil*, il serait facile de penser qu'un simple masquage du site de rétention de GABA_{B1} est suffisant à la sortie du RE, mais cela semble peu probable, car plusieurs protéines d'interactions, incluant ATF4, Marlin-1, et 14-3-3, se lient au récepteur dans cette région, ATF4 et Marlin-1 formant même une structure *coiled-coil*, et ces différentes protéines ne favorisent pas le transport à la membrane plasmique de GABA_{B1} (2, 289, 330). Il a cependant été démontré que le site de rétention devait adopter une conformation bien précise et être localisé à une distance optimale de la membrane plasmique pour être efficace (385), et il est possible qu'en interagissant avec la séquence PEST proximale, Grb2 et γ 2S soient en mesure de moduler ces propriétés du motif. Nos données semblent cependant suggérer qu'un tel mécanisme n'est pas la cause principale de l'augmentation de la densité de récepteur à la

membrane plasmique, car l'expression membranaire du mutant du site de rétention GABA_{B1(b)}-ASRR est aussi augmentée par la surexpression de Grb2, tout comme l'est l'expression de l'hétérodimère GABA_{B1(b)}-GABA_{B2}. Cela suggère donc que Grb2 est en mesure de promouvoir l'expression membranaire de GABA_{B1} même lorsque le site de rétention n'est pas fonctionnel.

Grb2 diminue l'internalisation constitutive de GABA_B

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'augmentation de la quantité de GABA_B à la membrane plasmique en présence de Grb2 est que le récepteur subit une internalisation constitutive plus faible. La densité de récepteurs à la membrane résulte d'un équilibre entre l'apport de nouvelles protéines par fusion de vésicules (autant en provenance du RE-Golgi que du recyclage via des endosomes) et le retrait de récepteurs par internalisation. Nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de Grb2 dans l'internalisation constitutive de GABA_B, et avons constaté que la surexpression de Grb2 diminue la quantité de récepteurs internalisés. Le récepteur mutant ΔPEST, quant à lui, montre une internalisation basale plus forte, et la surexpression de Grb2 n'a aucun effet sur son endocytose. De plus, lorsque l'on bloque l'internalisation par l'utilisation du Dynasore, on remarque une augmentation significative du nombre de récepteurs à la membrane plasmique, et cet effet est plus fort pour les récepteurs mutants ΔPEST, ce qui soutient l'hypothèse qu'ils internalisent plus rapidement au niveau basal. L'ensemble des données suggère donc un rôle de Grb2 dans la régulation de l'internalisation du récepteur.

Le rôle classique de Grb2 au niveau de l'endocytose, contrairement à ce que nous avons observé pour GABA_B, est plutôt de promouvoir l'internalisation. Pour le récepteur à l'EGF, Grb2 recrute l'ubiquitine ligase E3 Cbl, qui ubiquitine le récepteur, permettant l'interaction avec les protéines Eps15 et Epsin, qui elles-mêmes recrutent le complexe AP-2, induisant l'internalisation dépendante de la clathrine (196, 197, 386). Dans le cas du récepteur GABA_B, Grb2 n'a aucune influence sur l'ubiquitination du récepteur, ce qui est supporté par l'absence de modification de l'ubiquitination lors de la mutation de la séquence PEST. Grb2 peut aussi promouvoir l'internalisation des RTK par une interaction directe avec la protéine N-WASP, qui contrôle la polymérisation de l'actine, processus nécessaire au trafic des vésicules

lors de l'internalisation (387). De plus, le recrutement de Grb2 à une phosphotyrosine du β 2AR, un RCPG, est nécessaire à l'internalisation induite par l'insuline de ce récepteur (388). Dans ce cas, il est suggéré que Grb2 est en mesure de recruter la dynamine 1 au récepteur, favorisant la fission membranaire nécessaire à l'internalisation. Dans tous ces cas, Grb2 est recrutée par l'entremise de son domaine SH2 liant une phosphotyrosine, ce qui suggère qu'elle est recrutée aux récepteurs (EGFR ou β 2AR) lorsque ceux-ci sont phosphorylés en réponse à l'activation de récepteurs (EGFR lui-même ou le récepteur à l'insuline pour le β 2AR). Dans cette situation, on s'attend à ce que le récepteur soit sujet à une régulation négative, dans laquelle Grb2 joue un rôle. Dans le cas du récepteur GABA_{B1}, Grb2 lie le récepteur par un de ses domaines SH3, et cette interaction n'est donc pas sujette à la régulation par la phosphorylation. Nos résultats concordent avec un modèle où Grb2 interagit de façon constitutive avec GABA_B, car nous mesurons une forte interaction avec le récepteur en absence de stimulation. Cependant, nous observons aussi une réponse à l'agoniste dans l'interaction Grb2-GABA_B, ce qui peut suggérer un mécanisme intermédiaire de recrutement où la stimulation peut tout de même moduler l'interaction.

La différence au niveau du recrutement de Grb2 entre l'EGFR, le β 2AR et GABA_B peut possiblement expliquer la différence au niveau des effets sur l'internalisation des différents récepteurs. Consistant avec nos observations sur GABA_B, il existe un autre exemple de recrutement de Grb2 à un RCPG via un des domaines SH3, au niveau du récepteur D4 de la dopamine, et dans ce cas, la mutation du site d'interaction à Grb2 entraîne une forte internalisation constitutive du récepteur, suggérant aussi une stabilisation du récepteur à la membrane par Grb2 (389). Au niveau de l'EGFR et du β 2AR, Grb2 interagit via son domaine SH2, ce qui laisse ses deux domaines SH3 libres pour échafauder le complexe protéique associé. Cela suggère donc que le domaine d'interaction de Grb2 au récepteur a une influence sur la régulation de l'internalisation de ce dernier, et qu'un recrutement par un des domaines SH3 provoque une stabilisation à la membrane plasmique du récepteur associé, tandis qu'un recrutement par le domaine SH2 entraîne plutôt l'endocytose.

Le mécanisme de régulation de l'internalisation de GABA_B par Grb2 doit être évalué dans le contexte d'un «turnover» très rapide du récepteur GABA_B. En effet, GABA_B possède une demi-vie très faible pour un RCPG, celle-ci étant évaluée autour de deux heures (324). Il

est encore mal compris pourquoi le récepteur possède un «turnover» aussi rapide comparé aux autres RCPG, ayant généralement une demi-vie allant de 10 à 12 heures ou plus en absence d'agoniste (390). Une explication possible est qu'en absence de mécanisme d'internalisation agoniste-dépendant, GABA_B doit internaliser rapidement, le contrôle de sa densité se faisant plutôt au niveau du triage endosomal entre le recyclage et la dégradation. En ce sens, il est possible qu'une fraction importante du récepteur puisse se trouver dans des réserves intracellulaires, permettant une modification de la densité à la surface rapidement, comme c'est le cas pour plusieurs récepteurs ionotropiques, tels GABA_A et AMPAR (391, 392) . Cependant, aucune évidence de l'existence de telles réserves de GABA_B n'a été observée à ce jour. Une autre hypothèse serait que le récepteur est propice à une forte activation constitutive, et qu'il doit être internalisé et resensibilisé de façon continue pour être sensible à une stimulation au GABA de façon optimale. Aucune étude n'a directement testé l'activité constitutive du récepteur à ce jour, mais nos données non publiées ne semblent pas suggérer un niveau basal d'activation détectable. Finalement, une dernière hypothèse repose sur la dégradation de GABA_B en réponse à l'activation des récepteurs de glutamate de type NMDA (362). Il serait possible qu'un niveau basal d'activation des voies de signalisation en aval du NMDAR induise l'internalisation et la dégradation du récepteur GABA_B en absence de stimulation. Il serait intéressant de tester différents inhibiteurs de ces voies de signalisation (telles PP2A, CaMKII, PKC) pour mesurer leurs effets sur la dégradation et l'internalisation constitutive de GABA_B.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour rendre compte du rôle de Grb2 dans la régulation de l'internalisation de GABA_B. Une première hypothèse est que Grb2 joue un rôle actif dans la stabilisation du récepteur à la membrane plasmique. On peut penser, par exemple, que Grb2 pourrait permettre le recrutement de protéines du cytosquelette, y ancrant le récepteur et le stabilisant à la membrane. Ce type de mécanisme est fréquemment retrouvé chez les protéines à domaine PDZ, par exemple dans le cas de l'interaction du récepteur AMPA aux protéines ABP et GRIP (237). Une deuxième hypothèse est plutôt que Grb2 aurait un rôle passif, par exemple en bloquant le site d'interaction d'une autre protéine promouvant l'internalisation. Par exemple, GABA_{B1} interagit avec la sous-unité γ 2S du récepteur GABA_A, qui a pour effet de promouvoir le transport à la membrane plasmique et de moduler

l'internalisation en réponse une stimulation par l'agoniste (1). Il faut noter que dans l'étude du rôle de $\gamma 2S$ sur $GABA_B$, l'internalisation constitutive n'a pas été mesurée et qu'il est possible que $\gamma 2S$ y joue un rôle encore inconnu. Le domaine d'interaction caractérisé pour $\gamma 2S$ chevauche exactement celui de Grb2, c'est-à-dire la séquence PPTPPDP allant des acides aminés 927 à 933 présents dans la séquence PEST de $GABA_{B1}$. On peut donc penser que Grb2 est en compétition avec $\gamma 2S$ pour le site d'interaction sur le récepteur. Grb2 et $\gamma 2S$ ayant tous deux la propriété de favoriser une plus forte expression à la membrane de $GABA_B$, il est possible que cette région de $GABA_{B1}$ possède un motif encore inconnu régulant l'internalisation du récepteur. Au niveau de l'endocytose, $\gamma 2S$ et Grb2 semblent plutôt avoir des propriétés inverses sur l'internalisation, ce qui laisse présager une possible modulation de l'endocytose du récepteur par régulation de l'interaction de ce motif entre $\gamma 2S$ et Grb2.

Autres rôles possibles de Grb2

Tel qu'évoqué auparavant, l'augmentation du signal de BRET entre Grb2 et $GABA_{B2}$ en réponse à une stimulation par l'agoniste peut être interprétée de deux façons, soit comme une augmentation de la quantité d'interaction Grb2- $GABA_B$, soit comme une modification de la conformation du complexe ternaire. Il est néanmoins intéressant de spéculer sur les raisons possibles de cette augmentation de signal BRET. L'augmentation n'ayant lieu qu'après 5 minutes de stimulation, et atteignant son maximum à 15 minutes, on peut probablement rejeter un rôle au sein des mécanismes précoces d'activation du récepteur. L'activation de la protéine G se mesure en deçà d'une seconde, et l'activation des effecteurs est généralement aussi très rapide (393). Grb2 a été identifié originalement comme une protéine d'échafaudage permettant l'activation de la voie Ras-MAP Kinase par le récepteur à l'EGF (394), il est donc tentant de voir un lien entre l'interaction Grb2- $GABA_B$ et l'activation de cette voie. Cependant, le mutant Δ PEST semble activer la phosphorylation de ERK1/2 avec les mêmes propriétés (temps et amplitude) que le récepteur de type sauvage, ce qui semble exclure cette possibilité (données non publiées). Cette absence d'effet est compatible avec la différence dans le recrutement de Grb2 aux deux récepteurs, le recrutement par le domaine SH2 à l'EGFR permettant l'échafaudage du complexe EGFR-Grb2-Sos-Ras (395), ce qui ne peut pas être accompli par le recrutement de Grb2 à $GABA_B$ par un domaine SH3.

Une hypothèse intéressante découle de ce recrutement de Grb2 à GABA_B par un domaine SH3, et repose sur la capacité de GABA_B à activer la kinase Akt dans un mécanisme de protection des neurones de l'apoptose (290). L'activation d'Akt par GABA_B nécessite la transactivation du récepteur à l'IGF-1 de façon intracellulaire par l'activation de FAK1. Grb2 est en mesure d'interagir directement avec FAK1 par l'entremise de son domaine SH2 (396), ce qui pourrait suggérer un mécanisme où, après l'activation de GABA_B, Grb2 est en mesure de recruter FAK1, créant un complexe de signalisation permettant la transactivation du récepteur à l'IGF-1 et l'activation subséquente d'Akt. Ce recrutement de FAK1 permettrait d'expliquer l'augmentation du signal BRET, l'arrivée de FAK1 créant un changement conformationnel sur le complexe Grb2-GABA_B. De plus, il a été observé que FAK1 peut diminuer l'endocytose de la métalloprotéase MT1 en induisant la phosphorylation de l'endophiline A2, ce qui pourrait être une autre avenue de régulation de l'internalisation de GABA_B modulée par Grb2 (397). Il serait intrigant de voir si les différentes voies de signalisation activées dans ce processus peuvent avoir une rétroaction sur le récepteur GABA_B, possiblement médiée par Grb2. Nous avons commencé à tester cette hypothèse en mesurant l'activation de FAK1, mais la forte activité basale de cette dernière a limité nos résultats à ce jour.

Intégration

Les résultats obtenus dans cette thèse, bien que formant trois études distinctes, présentent des parallèles sur le sujet de l'internalisation et la régulation dépendante de la PKC. Dans cette section, je vais tenter de joindre les différentes observations et présenter de possibles liens entre les différents mécanismes observés.

Le premier parallèle majeur observé est au niveau de la régulation du récepteur par PKC. Dans la première étude, PKC est activée en réponse à une stimulation de GABA_B et induit la dissociation de NSF du récepteur. Dans la deuxième étude, la stimulation directe de PKC par le PMA entraîne une internalisation du récepteur suite à une augmentation de l'ubiquitination, mais cet effet n'est pas observable en réponse au baclofen. On remarque donc une certaine différence dans le potentiel de l'agoniste à activer PKC. Les différences observées peuvent provenir du modèle cellulaire utilisé, l'étude sur NSF ayant été effectuée

dans des cellules CHO tandis que l'étude sur l'ubiquitination a été effectuée dans des cellules HEK293. Nous avons observé une activation de PKC par le baclofen beaucoup plus forte dans les cellules CHO (données non publiées), pouvant expliquer cette différence entre les deux types cellulaires. Une hypothèse intéressante est que l'activation du récepteur GABA_B puisse induire une activation de seulement certains isoformes de PKC. Il a été démontré que PKC ϵ est directement impliquée dans la régulation de l'activité ATPasique et la liaison de NSF au récepteur GABA_A (348). Dans l'étude du rôle de NSF, nous avons démontré l'activation de PKC α , mais n'avons pas mesuré l'activation des autres isoformes. Il est donc possible que la régulation de GABA_B soit différente selon l'isoforme de PKC associée. Il sera donc important de mieux caractériser quels sont les isoformes impliqués dans les deux contextes (NSF vs ubiquitination).

Dans les deux cas, on peut toutefois noter que l'activation de PKC provoque une régulation négative du récepteur, dans le premier cas en le désensibilisant, et dans la deuxième étude en entraînant son endocytose et sa dégradation, ce qui suggère quand même que globalement, l'activation de PKC mène à une perte d'activité du récepteur. Une hypothèse intéressante serait que cette réponse de PKC pourrait être «dosée», c'est-à-dire qu'une faible activation mènerait à la désensibilisation du récepteur, tandis qu'une activation plus forte entraînerait aussi l'ubiquitination et la dégradation, possiblement par l'activation différentielle d'isoformes selon le niveau d'activation cellulaire. Cela pourrait expliquer que le baclofen, induisant une réponse plus faible, soit seulement en mesure d'activer la désensibilisation, tandis que le PMA, produisant une réponse beaucoup plus forte, serait en mesure d'induire non seulement la désensibilisation, mais aussi l'ubiquitination et la dégradation du récepteur.

Un deuxième niveau d'intégration se retrouve au niveau de l'internalisation constitutive du récepteur, celle-ci pouvant être diminuée par NSF (données de l'annexe 1), mais semblant être augmentée par l'ubiquitination. Nous observons une compétition entre NSF et le complexe AP-2 pour l'interaction sur la sous-unité GABA_{B2} malgré l'absence de motifs généralement associés au recrutement direct d'AP-2. Dans la deuxième étude, nous émettons l'hypothèse que l'ubiquitination de GABA_B permet le recrutement de l'epsin, pouvant elle-même recruter AP-2 par la suite. Un de sites d'ubiquitination découvert dans le criblage des protéines neuronales (207) se situe exactement au niveau du site d'interaction de

NSF dans le domaine *coiled-coil* de GABA_{B2}, suggérant que la compétition de NSF et AP-2 est régulée par l'ubiquitination du récepteur. En effet, l'ajout d'une ubiquitine à ce niveau a de fortes chances d'inhiber la liaison à NSF, pouvant permettre la liaison à l'epsin. Inversement, la présence de NSF pourrait bloquer l'accès au site d'ubiquitination, défavorisant ainsi le recrutement de la machinerie d'internalisation. Une expérience à tenter à ce niveau sera donc de muter la lysine impliquée et mesurer l'ubiquitination du récepteur, ainsi que son internalisation constitutive. Inversement, il sera intéressant de voir si la dissociation de NSF induit une augmentation de l'ubiquitination du récepteur, libérant la lysine et la rendant accessible.

Un dernier parallèle intéressant se retrouve au niveau des interactions du récepteur à Grb2 et NSF. On peut constater une corrélation entre la cinétique d'augmentation du signal de BRET entre Grb2 et GABA_B et la cinétique de dissociation de NSF de l'hétérodimère. Dans les deux cas, une augmentation graduelle mène à un effet maximal à 15 minutes. Bien qu'il soit possible que ce soit deux phénomènes parallèles n'ayant aucune incidence mutuelle, on peut noter que Grb2 interagit avec plusieurs protéines pouvant potentiellement réguler NSF. Grb2 est en mesure d'interagir avec la phosphatase PTP1B (398), qui est responsable de la déphosphorylation de NSF (352). Puisque NSF est lié au récepteur GABA_B et que son activité ATPasique est inhibée par la phosphorylation de sa tyrosine 83, il serait possible que Grb2, suite à l'activation du récepteur, recrute PTP1B, permettant l'activation de NSF et le désassemblage du domaine *coiled-coil*. Ce désassemblage pourrait aussi possiblement expliquer le changement conformationnel mesuré en BRET entre Grb2 et GABA_{B2}. Inversement, Grb2 s'associe à une panoplie de tyrosines kinases, qui pourraient potentiellement être responsables de la phosphorylation de la tyrosine 83 à la base. Une étude approfondie des protéines échafaudées par Grb2 en complexe avec GABA_B sera essentielle à déterminer si elle est en mesure de réguler la dissociation de NSF, et potentiellement le désassemblage de la structure *coiled-coil*.

Une question importante demeure au sujet des mécanismes permettant le contrôle des interactions protéiques du récepteur GABA_B. En effet, en ajoutant nos récentes découvertes avec ceux déjà connus dans la littérature, il est impossible pour l'ensemble de ces protéines d'interagir avec le récepteur dans un seul complexe. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer

cette panoplie d'interactions. On pourrait premièrement penser que ces interactions se produisent de façons séquentielles, dans le cadre d'un remodelage dynamique du complexe de signalisation du récepteur. Une deuxième hypothèse repose plutôt sur la formation de complexes distincts en parallèle, ségrégant les récepteurs en plusieurs populations différentes. Ces différents complexes seraient composés de protéines distinctes, permettant une spécialisation de chacun. Évidemment, ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives. Il est facile de penser que différents complexes sont présents, et que chacun peut subir un remodelage qui lui est unique en réponse à un stimulus. De plus, il faut considérer que la nature des complexes et du remodelage va être influencé par le contexte et la localisation cellulaire. Il sera intéressant d'étudier le rôle de NSF dans ces phénomènes, considérant son rôle classique en tant que protéine permettant le désassemblage du complexe de fusion membranaire.

Dans l'ensemble, cette thèse démontre une série de nouvelles interactions protéiques régulant le niveau d'activité du récepteur GABA_B, directement par la désensibilisation, ou indirectement par le contrôle de son expression à la membrane et sa dégradation. Bien que certains des mécanismes moléculaires demeurent mal compris, nos études permettent d'ajouter aux connaissances et de broser un portrait d'une régulation complexe du récepteur GABA_B, où plusieurs facteurs convergent pour contrôler son activité et sa stabilité à la membrane plasmique.

Conclusion

Les travaux rapportés dans cette thèse étudient la régulation de la signalisation et de l'expression du récepteur GABA_B par diverses interactions protéiques. Dans le premier article, nous avons identifié un nouveau mécanisme de désensibilisation du récepteur impliquant la protéine de fusion membranaire NSF et la phosphorylation du récepteur par la protéine kinase C, suggérant un modèle où NSF est en mesure de désassembler la structure *coiled-coil* des queues carboxyl-terminales des deux sous-unités de GABA_B. Il s'agit de la première étude portant sur le rôle de NSF au niveau de la désensibilisation d'un RCPG, évoquant un nouveau rôle pour cette protéine classiquement associée à la fusion membranaire. De plus, le mécanisme proposé de désassemblage de la structure *coiled-coil* représente un nouveau paradigme dans la régulation de l'activité des RCPG, proposant un remodelage dynamique du complexe de signalisation du récepteur et des protéines pouvant y être associées par l'action d'une enzyme.

Le deuxième article propose un modèle où l'ubiquitination du récepteur à la membrane induit son endocytose, et où l'interaction directe avec la déubiquitinase USP14 dirige le triage endosomal de GABA_B vers la dégradation lysosomale. Cet article porte sur le phénomène encore mal compris de l'ubiquitination des RCPG et met à jour des différences avec les observations rapportées pour d'autres récepteurs, tels le β 2AR et PAR1. Nous proposons un nouveau rôle catalytiquement indépendant d'USP14 dans la régulation de la dégradation des RCPG, ce qui permet d'approfondir le modèle actuel de la régulation du triage par les déubiquitinases au niveau des complexes ESCRT (371). De plus, ces résultats suggèrent de nouvelles causes au phénotype des souris *ataxia*, possédant une activité GABA_B plus forte en absence d'USP14.

Dans le troisième article, nous avons caractérisé l'interaction de GABA_{B1} avec Grb2, déterminant le site de liaison à la séquence PEST de la sous-unité, et découvrant un rôle de Grb2 dans la stabilisation du récepteur hétérodimérique à la membrane plasmique, diminuant son internalisation constitutive. Il s'agit là aussi d'un nouveau rôle pour Grb2 dans la régulation de l'internalisation des RCPG, étant à ce jour plutôt associé à la promotion de l'internalisation. Des études approfondies pour déterminer le mécanisme moléculaire seront

nécessaires afin de mieux comprendre l'action de Grb2 et il sera intéressant de caractériser ce possible rôle sur d'autres RCPG possédant des séquences de liaison aux domaines SH3.

Les travaux présentés dans cette thèse invoquent de nouveaux mécanismes moléculaires de désensibilisation, de contrôle de l'expression du récepteur GABA_B à la membrane plasmique ainsi que de sa dégradation. Ils démontrent que la régulation de l'activité du récepteur est un phénomène complexe auquel participe une panoplie de protéines d'interactions et que ce phénomène est dynamiquement régulé selon l'état d'activation du récepteur. Une meilleure caractérisation du protéome d'interaction des RCPG est donc nécessaire à l'établissement des mécanismes régulant leur activité et leur expression.

Bibliographie

1. Balasubramanian, S., Teissère, J. A., Raju, D. V., and Hall, R. A. (2004) Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB receptors regulates GABAB receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **279**, 18840–50
2. Brock, C., Boudier, L., and Maurel, D. (2005) Assembly-dependent surface targeting of the heterodimeric GABAB receptor is controlled by COPI but not 14-3-3. *Mol. Biol. ...* **16**, 5572–5578
3. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–72
4. Lagerström, M. C., and Schiöth, H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 339–57
5. Overington, J. P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 993–6
6. Tyndall, J. D. A., and Sandilya, R. (2005) GPCR agonists and antagonists in the clinic. *Med. Chem.* **1**, 405–21
7. Versele, M., Lemaire, K., and Thevelein, J. M. (2001) Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep.* **2**, 574–9
8. Josefsson, L. G. (1999) Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. *Gene* **239**, 333–40
9. Hill, C. A., Fox, A. N., Pitts, R. J., Kent, L. B., Tan, P. L., Chrystal, M. A., Cravchik, A., Collins, F. H., Robertson, H. M., and Zwiebel, L. J. (2002) G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 176–8
10. McLysaght, A., Hokamp, K., and Wolfe, K. H. (2002) Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat. Genet.* **31**, 200–4
11. Broeck, J. V. (2001) Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **48**, 1–12
12. Sutherland, E. W., and Wosilait, W. D. (1955) Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* **175**, 169–70
13. Northup, J. K., Sternweis, P. C., Smigel, M. D., Schleifer, L. S., Ross, E. M., and Gilman, A. G. (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6516–20
14. Milligan, G., and Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl**, S46–55
15. Cohen, P. (1978) The role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle. *Curr. Top. Cell. Regul.* **14**, 117–96

16. Wu, J., Xie, N., Zhao, X., Nice, E. C., and Huang, C. (2012) Dissection of aberrant GPCR signaling in tumorigenesis--a systems biology approach. *Cancer Genomics Proteomics* **9**, 37–50
17. Katada, T., and Ui, M. (1982) ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* **257**, 7210–6
18. Hildebrandt, J. D., Sekura, R. D., Codina, J., Iyengar, R., Manclark, C. R., and Birnbaumer, L. (1983) Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* **302**, 706–9
19. Taussig, R., Iñiguez-Lluhi, J. A., and Gilman, A. G. (1993) Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science* **261**, 218–21
20. Miki, N., Keirns, J. J., Marcus, F. R., Freeman, J., and Bitensky, M. W. (1973) Regulation of cyclic nucleotide concentrations in photoreceptors: an ATP-dependent stimulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3820–4
21. Codina, J., Hildebrandt, J., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R. D., and Manclark, C. R. (1983) Pertussis toxin substrate, the putative Ni component of adenylyl cyclases, is an alpha beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4276–80
22. Rhee, S. G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281–312
23. Burgess, G. M., Godfrey, P. P., McKinney, J. S., Berridge, M. J., Irvine, R. F., and Putney, J. W. The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature* **309**, 63–6
24. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **254**, 3692–5
25. Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., and Johnson, G. L. (1995) G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.* **270**, 24631–4
26. Majumdar, M., Seasholtz, T. M., Buckmaster, C., Toksoz, D., and Brown, J. H. (1999) A rho exchange factor mediates thrombin and Galpha(12)-induced cytoskeletal responses. *J. Biol. Chem.* **274**, 26815–21
27. Liu, S.-C., Jen, Y.-M., Jiang, S. S., Chang, J.-L., Hsiung, C. A., Wang, C.-H., and Juang, J.-L. (2009) G(alpha)12-mediated pathway promotes invasiveness of nasopharyngeal carcinoma by modulating actin cytoskeleton reorganization. *Cancer Res.* **69**, 6122–30
28. Neer, E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249–57
29. Bünemann, M., Frank, M., and Lohse, M. J. (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 16077–82
30. Digby, G. J., Lober, R. M., Sethi, P. R., and Lambert, N. A. (2006) Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17789–94

31. Khan, S. M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J.-P., Labbé, J.-C., Miller, G. J., and Hébert, T. E. (2013) The expanding roles of G $\beta\gamma$ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol. Rev.* **65**, 545–77
32. Bockaert, J., and Pin, J.-P. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**, 1723–9
33. Fredriksson, R., and Schiöth, H. H. B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1414–25
34. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., and Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–63
35. Qanbar, R., and Bouvier, M. (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* **97**, 1–33
36. Allen, S. J., Crown, S. E., and Handel, T. M. (2007) Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 787–820
37. Caltabiano, G., Campillo, M., De Leener, A., Smits, G., Vassart, G., Costagliola, S., and Pardo, L. (2008) The specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2484–92
38. Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**, 971–7
39. Pin, J.-P., Comps-Agrar, L., Maurel, D., Monnier, C., Rives, M. L., Trinquet, E., Kniazeff, J., Rondard, P., and Prézeau, L. (2009) G-protein-coupled receptor oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors. *J. Physiol.* **587**, 5337–44
40. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, 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**, 739–45
41. Rasmussen, S. G. F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R. P., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F. X., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–7
42. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K., and Stevens, R. C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–65
43. Day, P. W., Rasmussen, S. G. F., Parnot, C., Fung, J. J., Masood, A., Kobilka, T. S., Yao, X.-J., Choi, H.-J., Weis, W. I., Rohrer, D. K., and Kobilka, B. K. (2007) A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat. Methods* **4**, 927–9
44. Bhattacharya, S., Hall, S. E., Li, H., and Vaidehi, N. (2008) Ligand-stabilized conformational states of human beta(2) adrenergic receptor: insight into G-protein-coupled receptor activation. *Biophys. J.* **94**, 2027–42

45. Audet, M., and Bouvier, M. (2012) Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell* **151**, 14–23
46. Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S. M., Schuerer, S. C., Sanna, M. G., Han, G. W., Kuhn, P., Rosen, H., and Stevens, R. C. (2012) Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* **335**, 851–5
47. Dror, R. O., Pan, A. C., Arlow, D. H., Borhani, D. W., Maragakis, P., Shan, Y., Xu, H., and Shaw, D. E. (2011) Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13118–23
48. Doré, A. S., Robertson, N., Errey, J. C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., Hurrell, E., Bennett, K., Congreve, M., Magnani, F., Tate, C. G., Weir, M., and Marshall, F. H. (2011) Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* **19**, 1283–93
49. Chien, E. Y. T., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G. W., Hanson, M. A., Shi, L., Newman, A. H., Javitch, J. A., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2010) Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* **330**, 1091–5
50. Wu, B., Chien, E. Y. T., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F. C., Hamel, D. J., Kuhn, P., Handel, T. M., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**, 1066–71
51. Kobilka, B., and Schertler, G. F. X. (2008) New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 79–83
52. Cerione, R. A., Codina, J., Benovic, J. L., Lefkowitz, R. J., Birnbaumer, L., and Caron, M. G. (1984) The mammalian beta 2-adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry* **23**, 4519–25
53. Rasmussen, S. G. F., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T. A., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skinioitis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., and Kobilka, B. K. (2011) Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–55
54. Warne, T., Moukhametziyanov, R., Baker, J. G., Nehmé, R., Edwards, P. C., Leslie, A. G. W., Schertler, G. F. X., and Tate, C. G. (2011) The structural basis for agonist and partial agonist action on a $\beta(1)$ -adrenergic receptor. *Nature* **469**, 241–4
55. Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G. W., and Tate, C. G. (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **474**, 521–5
56. Chung, K. Y., Rasmussen, S. G. F., Liu, T., Li, S., DeVree, B. T., Chae, P. S., Calinski, D., Kobilka, B. K., Woods, V. L., and Sunahara, R. K. (2011) Conformational changes in the G protein Gs induced by the β_2 adrenergic receptor. *Nature* **477**, 611–5
57. Galvez, T., Parmentier, M. L., Joly, C., Malitschek, B., Kaupmann, K., Kuhn, R., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B., and Pin, J. P. (1999) Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor

- extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J. Biol. ...* **274**, 13362–13369
58. Rondard, P., Liu, J., Huang, S., Malhaire, F., Vol, C., Pinault, A., Labesse, G., and Pin, J.-P. (2006) Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J. Biol. Chem.* **281**, 24653–61
 59. Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., and Jingami, H. (2007) Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3759–64
 60. Pin, J.-P., Kniazeff, J., Liu, J., Binet, V., Goudet, C., Rondard, P., and Prézeau, L. (2005) Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. *FEBS J.* **272**, 2947–55
 61. De Lean, A., Stadel, J. M., and Lefkowitz, R. J. (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **255**, 7108–17
 62. Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., and Lefkowitz, R. J. (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* **268**, 4625–36
 63. Weiss, J. M., Morgan, P. H., Lutz, M. W., and Kenakin, T. P. (1996) The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J. Theor. Biol.* **181**, 381–97
 64. Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M., and Bouvier, M. (1994) Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **45**, 490–9
 65. Conn, P. J., Christopoulos, A., and Lindsley, C. W. (2009) Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 41–54
 66. Kenakin, T. (2004) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 186–92
 67. Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Piñeyro, 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**, 11406–11
 68. Galandrin, S., and Bouvier, M. (2006) Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1575–84
 69. Kenakin, T., and Christopoulos, A. (2013) Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 205–16
 70. Mattera, R., Pitts, B. J., Entman, M. L., and Birnbaumer, L. (1985) Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted curve fitting. *J. Biol. Chem.* **260**, 7410–21
 71. Wessling-Resnick, M., and Johnson, G. L. (1987) Allosteric behavior in transducin activation mediated by rhodopsin. Initial rate analysis of guanine nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* **262**, 3697–705

72. Willardson, B. M., Pou, B., Yoshida, T., and Bitensky, M. W. (1993) Cooperative binding of the retinal rod G-protein, transducin, to light-activated rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **268**, 6371–82
73. Sinkins, W. G., Kandel, M., Kandel, S. I., Schunack, W., and Wells, J. W. (1993) G protein-linked receptors labeled by [3H]histamine in guinea pig cerebral cortex. I. Pharmacological characterization [corrected]. *Mol. Pharmacol.* **43**, 569–82
74. Potter, L. T., Ballesteros, L. A., Bichajian, L. H., Ferrendelli, C. A., Fisher, A., Hanchett, H. E., and Zhang, R. (1991) Evidence of paired M2 muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **39**, 211–21
75. Hirschberg, B. T., and Schimerlik, M. I. (1994) A kinetic model for oxotremorine M binding to recombinant porcine m2 muscarinic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 26127–35
76. Avissar, S., Amitai, G., and Sokolovsky, M. (1983) Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 156–9
77. Wreggett, K. A., and Wells, J. W. (1995) Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 22488–99
78. 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 beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 16384–92
79. White, J. H., Wise, a, Main, M. J., Green, a, Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, a a, Emson, P., Foord, S. M., and Marshall, F. H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**, 679–82
80. Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, a, Shigemoto, R., Karschin, a, and Bettler, B. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**, 683–7
81. Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W. J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L. Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Branchek, T. A., and Gerald, C. (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**, 674–9
82. Kuner, R., Köhr, G., Grünewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., and Kornau, H. C. (1999) Role of Heteromer Formation in GABAB Receptor Function. *Science (80-)*. **283**, 74–77
83. Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A., and Palczewski, K. (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**, 127–8
84. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3684–9
85. Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2001) Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci.* **68**, 2243–50

86. Bouvier, M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 274–86
87. Prinster, S. C., Hague, C., and Hall, R. A. (2005) Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol. Rev.* **57**, 289–98
88. Wu, H., Wang, C., Gregory, K. J., Han, G. W., Cho, H. P., Xia, Y., Niswender, C. M., Katritch, V., Meiler, J., Cherezov, V., Conn, P. J., and Stevens, R. C. (2014) Structure of a Class C GPCR Metabotropic Glutamate Receptor 1 Bound to an Allosteric Modulator. *Science* **344**, 58–64
89. Prasanna, X., Chattopadhyay, A., and Sengupta, D. (2014) Cholesterol Modulates the Dimer Interface of the β 2-Adrenergic Receptor via Cholesterol Occupancy Sites. *Biophys. J.* **106**, 1290–300
90. Huang, J., Chen, S., Zhang, J. J., and Huang, X.-Y. (2013) Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 419–25
91. Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**, 381–90
92. Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J. P., and Zuker, C. S. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**, 199–202
93. Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* **5**, 30–4
94. Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbé-Jullié, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 34666–73
95. 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 homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* **17**, 677–91
96. Floyd, D. H., Geva, A., Bruinsma, S. P., Overton, M. C., Blumer, K. J., and Baranski, T. J. (2003) C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* **278**, 35354–61
97. Wurch, T., Matsumoto, A., and Pauwels, P. J. (2001) Agonist-independent and -dependent oligomerization of dopamine D(2) receptors by fusion to fluorescent proteins. *FEBS Lett.* **507**, 109–13
98. Hunzicker-Dunn, M., Barisas, G., Song, J., and Roess, D. A. (2003) Membrane organization of luteinizing hormone receptors differs between actively signaling and desensitized receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 42744–9
99. Cheng, Z. J., and Miller, L. J. (2001) Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystokinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **276**, 48040–7
100. Latif, R., Graves, P., and Davies, T. F. (2002) Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 45059–67

101. Hague, C., Lee, S. E., Chen, Z., Prinster, S. C., Hall, R. A., and Minneman, K. P. (2006) Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol. Pharmacol.* **69**, 45–55
102. Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J.-F., Lagacé, M., Marullo, S., and Bouvier, M. (2004) Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J. Biol. Chem.* **279**, 33390–7
103. Lopez-Gimenez, J. F., Canals, M., Padiani, J. D., and Milligan, G. (2007) The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Mol. Pharmacol.* **71**, 1015–29
104. Kaykas, A., Yang-Snyder, J., Héroux, 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**, 52–8
105. Lazareno, S., Gharagozloo, P., Kuonen, D., Popham, A., and Birdsall, N. J. (1998) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies. *Mol. Pharmacol.* **53**, 573–89
106. Albizu, L., Balestre, M.-N., Breton, C., Pin, J.-P., Manning, M., Mouillac, B., Barberis, C., and Durroux, T. (2006) Probing the existence of G protein-coupled receptor dimers by positive and negative ligand-dependent cooperative binding. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1783–91
107. Maurice, P., Kamal, M., and Jockers, R. (2011) Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 514–20
108. Jordan, B. A., and Devi, L. A. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**, 697–700
109. Jordan, B. A., Gomes, I., Rios, C., Filipovska, J., and Devi, L. A. (2003) Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1317–24
110. González-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V, López-Giménez, J. F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L. F., Milligan, G., Gingrich, J. A., Filizola, M., Meana, J. J., and Sealfon, S. C. (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **452**, 93–7
111. Pfeiffer, M., Kirscht, S., Stumm, R., Koch, T., Wu, D., Laugsch, M., Schröder, H., Höllt, V., and Schulz, S. (2003) Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J. Biol. Chem.* **278**, 51630–7
112. 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**, 32248–57
113. 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**, 17201–10
114. 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**, 1548–53

115. Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J. C., Shi, L., Filizola, M., and Javitch, J. A. (2008) Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* **27**, 2293–304
116. Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M.-L., Bourrier, E., Ayoub, M. A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., Prézeau, L., Trinquet, E., and Pin, J.-P. (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat. Methods* **5**, 561–7
117. Lee, F. J. S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., Wang, Y. T., Niznik, H. B., Yu, X., and Liu, F. (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* **111**, 219–30
118. 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**, 274–80
119. Lee, F. J. S., Pei, L., Moszczynska, A., Vukusic, B., Fletcher, P. J., and Liu, F. (2007) Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *EMBO J.* **26**, 2127–36
120. 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**, 333–9
121. Sexton, P. M., Morfis, M., Tilakaratne, N., Hay, D. L., Udawela, M., Christopoulos, G., and Christopoulos, A. (2006) Complexing receptor pharmacology: modulation of family B G protein-coupled receptor function by RAMPs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1070**, 90–104
122. Robbins, M. J., Calver, a R., Filippov, a K., Hirst, W. D., Russell, R. B., Wood, M. D., Nasir, S., Couve, a, Brown, D. a, Moss, S. J., and Pangalos, M. N. (2001) GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J. Neurosci.* **21**, 8043–52
123. Brock, C., Oueslati, N., Soler, S., Boudier, L., Rondard, P., and Pin, J.-P. (2007) Activation of a dimeric metabotropic glutamate receptor by intersubunit rearrangement. *J. Biol. Chem.* **282**, 33000–8
124. Han, Y., Moreira, I. S., Urizar, E., Weinstein, H., and Javitch, J. A. (2009) Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 688–95
125. 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
126. Dong, C., Filipeanu, C. M., Duvernay, M. T., and Wu, G. (2007) Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 853–70
127. Schülein, R., Westendorf, C., Krause, G., and Rosenthal, W. (2012) Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 294–9
128. Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 913–7

129. Molinari, M., and Helenius, A. (2000) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* **288**, 331–3
130. Labriola, C., Cazzulo, J. J., and Parodi, A. J. (1995) Retention of glucose units added by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase delays exit of glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **130**, 771–9
131. Frenkel, Z., Gregory, W., Kornfeld, S., and Lederkremer, G. Z. (2003) Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2. *J. Biol. Chem.* **278**, 34119–24
132. Eriksson, K. K., Vago, R., Calanca, V., Galli, C., Paganetti, P., and Molinari, M. (2004) EDEM contributes to maintenance of protein folding efficiency and secretory capacity. *J. Biol. Chem.* **279**, 44600–5
133. Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. (2002) E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* **418**, 438–42
134. Vembar, S. S., and Brodsky, J. L. (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 944–57
135. Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H. P. (1999) The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat. Cell Biol.* **1**, 330–4
136. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., D. B., and J. D. (2000) in *Molecular cell biology*, W. H. Freeman, New York
137. Kamitani, S., and Sakata, T. (2001) Glycosylation of human CRLR at Asn123 is required for ligand binding and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1539**, 131–9
138. Bermak, J. C., Li, M., Bullock, C., and Zhou, Q. Y. (2001) Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat. Cell Biol.* **3**, 492–8
139. Kuang, Y.-Q., Charette, N., Frazer, J., Holland, P. J., Attwood, K. M., Delleire, G., and Dupré, D. J. (2012) Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for CCR5 chemokine receptor signaling complex organization. *PLoS One* **7**, e40522
140. Sauvageau, E., Rochdi, D. M., Oueslati, M., Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Simpson, J. C., Pepperkok, R., and Bouvier, M. (2014) CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and control their export from the endoplasmic reticulum. *Traffic*
141. Nishimura, N., and Balch, W. E. (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277**, 556–8
142. Dominguez, M., Dejgaard, K., Füllekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J. P., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J., and Nilsson, T. (1998) gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J. Cell Biol.* **140**, 751–65
143. Heilker, R., Manning-Krieg, U., Zuber, J. F., and Spiess, M. (1996) In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *EMBO J.* **15**, 2893–9

144. Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1986) Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 2797–801
145. Benovic, J. L., Onorato, J. J., Arriza, J. L., Stone, W. C., Lohse, M., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1991) Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *J. Biol. Chem.* **266**, 14939–46
146. Benovic, J. L., DeBlasi, A., Stone, W. C., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1989) Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* **246**, 235–40
147. Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guan. *J. Biol. Chem.* **260**, 7094–101
148. Diviani, D., Lattion, A. L., and Cotecchia, S. (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 28712–9
149. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**, 1547–50
150. Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* **267**, 8558–64
151. Nelson, C. D., Perry, S. J., Regier, D. S., Prescott, S. M., Topham, M. K., and Lefkowitz, R. J. (2007) Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science* **315**, 663–6
152. Perry, S. J., Baillie, G. S., Kohout, T. A., McPhee, I., Magiera, M. M., Ang, K. L., Miller, W. E., McLean, A. J., Conti, M., Houslay, M. D., and Lefkowitz, R. J. (2002) Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* **298**, 834–6
153. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3712–7
154. Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447–50
155. Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Daaka, Y. (1999) Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 1185–8
156. 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**, 11312–9

157. Marchese, A., Paing, M. M., Temple, B. R. S., and Trejo, J. (2008) G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**, 601–29
158. 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**, 19452–60
159. Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A., and Lefkowitz, R. J. (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.* **272**, 5–8
160. Seachrist, J. L., Anborgh, P. H., and Ferguson, S. S. (2000) beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *J. Biol. Chem.* **275**, 27221–8
161. 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. U. S. A.* **92**, 8343–7
162. Gardner, L. A., Naren, A. P., and Bahouth, S. W. (2007) Assembly of an SAP97-AKAP79-cAMP-dependent protein kinase scaffold at the type 1 PSD-95/DLG/ZO1 motif of the human beta(1)-adrenergic receptor generates a receptosome involved in receptor recycling and networking. *J. Biol. Chem.* **282**, 5085–99
163. 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**, 45145–52
164. Wolfe, B. L., Marchese, A., and Trejo, J. (2007) Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. *J. Cell Biol.* **177**, 905–16
165. Whistler, J. L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S. R., and Von Zastrow, M. (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* **297**, 615–20
166. Marley, A., and von Zastrow, M. (2010) Dysbindin promotes the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors to lysosomes. *PLoS One* **5**, e9325
167. Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145–55
168. 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
169. Busillo, J. M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., and Benovic, J. L. (2010) Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J. Biol. Chem.* **285**, 7805–17
170. 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**, 1442–7

171. 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**, 1448–53
172. Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., Strachan, R. T., Huang, T.-Y., Bressler, E. A., Hara, M. R., Shenoy, S. K., Gygi, S. P., and Lefkowitz, R. J. (2011) Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci. Signal.* **4**, ra51
173. 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**, 2449–54
174. 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**, 1574–7
175. Beaulieu, J.-M., Sotnikova, T. D., Marion, S., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **122**, 261–73
176. Beaulieu, J.-M., Marion, S., Rodriguiz, R. M., Medvedev, I. O., Sotnikova, T. D., Ghisi, V., Wetsel, W. C., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2008) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* **132**, 125–36
177. Witherow, D. S., Garrison, T. R., Miller, W. E., and Lefkowitz, R. J. (2004) beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8603–7
178. Luan, B., Zhang, Z., Wu, Y., Kang, J., and Pei, G. (2005) Beta-arrestin2 functions as a phosphorylation-regulated suppressor of UV-induced NF-kappaB activation. *EMBO J.* **24**, 4237–46
179. Kang, J., Shi, Y., Xiang, B., Qu, B., Su, W., Zhu, M., Zhang, M., Bao, G., Wang, F., Zhang, X., Yang, R., Fan, F., Chen, X., Pei, G., and Ma, L. (2005) A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* **123**, 833–47
180. Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K., Yates, J. R., and Lefkowitz, R. J. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12011–6
181. Ma, L., and Pei, G. (2007) Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J. Cell Sci.* **120**, 213–8
182. Kendall, R. T., Strungs, E. G., Rachidi, S. M., Lee, M.-H., El-Shewy, H. M., Luttrell, D. K., Janech, M. G., and Luttrell, L. M. (2011) The beta-arrestin pathway-selective type 1A angiotensin receptor (AT1A) agonist [Sar1,Ile4,Ile8]angiotensin II regulates a robust G protein-independent signaling network. *J. Biol. Chem.* **286**, 19880–91
183. Wetzker, R., and Böhmer, F.-D. (2003) Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 651–7

184. Oligny-Longpré, G., Corbani, M., Zhou, J., Hogue, M., Guillon, G., and Bouvier, M. (2012) Engagement of β -arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E1028–37
185. Girnita, L., Shenoy, S. K., Sehat, B., Vasilcanu, R., Girnita, A., Lefkowitz, R. J., and Larsson, O. (2005) β -Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J. Biol. Chem.* **280**, 24412–9
186. Wilkinson, K. D., Urban, M. K., and Haas, A. L. (1980) Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **255**, 7529–32
187. Hershko, A. (1983) Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* **34**, 11–2
188. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–79
189. Li, W., Bengtson, M. H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V. A., Orth, A., Chanda, S. K., Batalov, S., and Joazeiro, C. A. P. (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487
190. Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H., and Wilkinson, K. D. (2009) Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 363–97
191. Komander, D., and Rape, M. (2012) The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–29
192. Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133–45
193. Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., and Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576–83
194. Chen, X., Lee, B.-H., Finley, D., and Walters, K. J. (2010) Structure of proteasome ubiquitin receptor hRpn13 and its activation by the scaffolding protein hRpn2. *Mol. Cell* **38**, 404–15
195. Peth, A., Besche, H. C., and Goldberg, A. L. (2009) Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol. Cell* **36**, 794–804
196. Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., and Sorkin, A. (2003) Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol. Biol. Cell* **14**, 858–70
197. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2760–5
198. Hicke, L., and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 141–72
199. Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev. Cell* **15**, 209–19

200. Madshus, I. H., and Stang, E. (2009) Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J. Cell Sci.* **122**, 3433–9
201. Zeng, L.-R., Vega-Sánchez, M. E., Zhu, T., and Wang, G.-L. (2006) Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res.* **16**, 413–26
202. Marullo, S., and Bouvier, M. (2007) Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 362–5
203. Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B., and Bouvier, M. (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr. Protoc. Neurosci.* **Chapter 5**, Unit 5.23
204. Komander, D., and Rape, M. (2012) The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229
205. Perroy, J., Pontier, S., Charest, P., Aubry, M., and Bouvier, M. (2004) Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat. Methods* **1**, 203–208
206. Sylvestersen, K. B., Young, C., and Nielsen, M. L. (2013) Advances in characterizing ubiquitylation sites by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 49–58
207. Na, C. H., Jones, D. R., Yang, Y., Wang, X., Xu, Y., and Peng, J. (2012) Synaptic protein ubiquitination in rat brain revealed by antibody-based ubiquitome analysis. *J. Proteome Res.* **11**, 4722–32
208. Hislop, J. N., and von Zastrow, M. (2011) Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors. *Traffic* **12**, 137–48
209. 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**, 1307–13
210. Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2005) Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.* **280**, 15315–24
211. Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 14498–506
212. Shenoy, S. K., Modi, A. S., Shukla, A. K., Xiao, K., Berthouze, M., Ahn, S., Wilkinson, K. D., Miller, W. E., and Lefkowitz, R. J. (2009) Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6650–5
213. Shenoy, S. K., Xiao, K., Venkataramanan, V., Snyder, P. M., Freedman, N. J., and Weissman, A. M. (2008) Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 22166–76
214. Berthouze, M., Venkataramanan, V., Li, Y., and Shenoy, S. K. (2009) The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J.* **28**, 1684–96

215. Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J. H., Stenmark, H., and Benovic, J. L. (2003) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev. Cell* **5**, 709–22
216. Bhandari, D., Trejo, J., Benovic, J. L., and Marchese, A. (2007) Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* **282**, 36971–9
217. Mines, M. a., Goodwin, J. S., Limbird, L. E., Cui, F.-F., and Fan, G.-H. (2009) Deubiquitination of CXCR4 by USP14 is critical for both CXCL12-induced CXCR4 degradation and chemotaxis but not ERK activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 5742–52
218. Berlin, I., Higginbotham, K. M., Dise, R. S., Sierra, M. I., and Nash, P. D. (2010) The deubiquitinating enzyme USP8 promotes trafficking and degradation of the chemokine receptor 4 at the sorting endosome. *J. Biol. Chem.* **285**, 37895–908
219. Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., and Coughlin, S. R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057–68
220. Does, M. R., Paing, M. M., Lin, H., Montagne, W. A., Marchese, A., and Trejo, J. (2012) AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via an ALIX-mediated pathway. *Mol. Biol. Cell* **23**, 3612–23
221. Does, M. R., Chen, B., Lin, H., Soh, U. J. K., Paing, M. M., Montagne, W. a., Meerloo, T., and Trejo, J. (2012) ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J. Cell Biol.* **197**, 407–19
222. Grabbe, C., Husnjak, K., and Dikic, I. (2011) The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 295–307
223. Jahn, R., Lang, T., and Südhof, T. C. (2003) Membrane fusion. *Cell* **112**, 519–33
224. Chen, Y. A., and Scheller, R. H. (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 98–106
225. McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T. H., and Rothman, J. E. (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**, 153–9
226. Pevsner, J., Hsu, S. C., Braun, J. E., Calakos, N., Ting, A. E., Bennett, M. K., and Scheller, R. H. (1994) Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* **13**, 353–61
227. Lin, R. C., and Scheller, R. H. (1997) Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* **19**, 1087–94
228. Jahn, R., and Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–7
229. Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T. C., Neher, E., and Verhage, M. (2001) Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* **31**, 581–91

230. Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E. (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409–18
231. Zhao, C., Slevin, J. T., and Whiteheart, S. W. (2007) Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett.* **581**, 2140–9
232. Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W., and Weis, W. I. (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* **94**, 525–36
233. Furst, J., Sutton, R. B., Chen, J., Brunger, A. T., and Grigorieff, N. (2003) Electron cryomicroscopy structure of N-ethyl maleimide sensitive factor at 11 Å resolution. *EMBO J.* **22**, 4365–74
234. Matsushita, K., Morrell, C. N., Cambien, B., Yang, S. X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M. R., Quick, R. A., Cao, W., O'Rourke, B., Lowenstein, J. M., Pevsner, J., Wagner, D. D., and Lowenstein, C. J. (2003) Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* **115**, 139–50
235. Nishimune, a, Isaac, J. T., Molnar, E., Noel, J., Nash, S. R., Tagaya, M., Collingridge, G. L., Nakanishi, S., and Henley, J. M. (1998) NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* **21**, 87–97
236. Noel, J., Ralph, G. S., Pickard, L., Williams, J., Molnar, E., Uney, J. B., Collingridge, G. L., and Henley, J. M. (1999) Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron* **23**, 365–76
237. Braithwaite, S. P., Xia, H., and Malenka, R. C. (2002) Differential roles for NSF and GRIP/ABP in AMPA receptor cycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7096–101
238. Yao, Y., Kelly, M. T., Sajikumar, S., Serrano, P., Bergold, P. J., Frey, J. U., and Sacktor, T. C. (2009) PKM ζ maintains late-LTP by NSF/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPARs. **28**, 7820–7827
239. Hanley, J. G., Khatri, L., Hanson, P. I., and Ziff, E. B. (2002) NSF ATPase and alpha-/beta-SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. *Neuron* **34**, 53–67
240. McDonald, P. H., Cote, N. L., Lin, F. T., Premont, R. T., Pitcher, J. A., and Lefkowitz, R. J. (1999) Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J. Biol. Chem.* **274**, 10677–80
241. Bomberger, J. M., Parameswaran, N., Hall, C. S., Aiyar, N., and Spielman, W. S. (2005) Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **280**, 9297–307
242. Gage, R. M., Matveeva, E. a, Whiteheart, S. W., and von Zastrow, M. (2005) Type I PDZ ligands are sufficient to promote rapid recycling of G Protein-coupled receptors independent of binding to N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J. Biol. Chem.* **280**, 3305–13
243. Zou, S., Li, L., Pei, L., Vukusic, B., Van Tol, H. H. M., Lee, F. J. S., Wan, Q., and Liu, F. (2005) Protein-protein coupling/uncoupling enables dopamine D2 receptor regulation of AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *J. Neurosci.* **25**, 4385–95

244. Heydorn, A., Søndergaard, B. P., Ersbøll, B., Holst, B., Nielsen, F. C., Haft, C. R., Whistler, J., and Schwartz, T. W. (2004) A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated so. *J. Biol. Chem.* **279**, 54291–303
245. Heydorn, A., Søndergaard, B. P., Hadrup, N., Holst, B., Haft, C. R., and Schwartz, T. W. (2004) Distinct in vitro interaction pattern of dopamine receptor subtypes with adaptor proteins involved in post-endocytotic receptor targeting. *FEBS Lett.* **556**, 276–80
246. Collingridge, G. L., and Isaac, J. T. R. (2003) Functional roles of protein interactions with AMPA and kainate receptors. *Neurosci. Res.* **47**, 3–15
247. Hayatashi, T. (1958) Inhibition and excitation due to gamma-aminobutyric acid in the central nervous system. *Nature* **182**, 1076–7
248. Connolly, C. N., Krishek, B. J., McDonald, B. J., Smart, T. G., and Moss, S. J. (1996) Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 89–96
249. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2004) *Essential Cell Biology, second edition*,
250. Jacob, T. C., Moss, S. J., and Jurd, R. (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 331–43
251. Bowery, N. G., Doble, A., Hill, D. R., Hudson, A. L., Shaw, J. S., Turnbull, M. J., and Warrington, R. (1981) Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.* **71**, 53–70
252. Hill, D. R., and Bowery, N. G. (1981) 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* **290**, 149–52
253. Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P. J., Bischoff, S., Mickel, S. J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., and Bettler, B. (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**, 239–46
254. Couve, A., Filippov, A. K., Connolly, C. N., Bettler, B., Brown, D. A., and Moss, S. J. (1998) Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 26361–7
255. Bowery, N. G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J. P., Marshall, F., Raiteri, M., Bonner, T. I., and Enna, S. J. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol. Rev.* **54**, 247–64
256. Schwarz, D. A., Barry, G., Eliasof, S. D., Petroski, R. E., Conlon, P. J., and Maki, R. A. (2000) Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABAB(1e), a GABAB(1) splice variant encoding a truncated receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 32174–81
257. Isomoto, S., Kaibara, M., Sakurai-Yamashita, Y., Nagayama, Y., Uezono, Y., Yano, K., and Taniyama, K. (1998) Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABAB receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 10–5

258. Steiger, J. L., Bandyopadhyay, S., Farb, D. H., and Russek, S. J. (2004) cAMP response element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream stimulatory factor differentially control hippocampal GABABR1a and GABABR1b subunit gene expression through alternative promoters. *J. Neurosci.* **24**, 6115–26
259. Couve, A., Moss, S. J., and Pangalos, M. N. (2000) GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 296–312
260. Calver, A. R., Michalovich, D., Testa, T. T., Robbins, M. J., Jaillard, C., Hill, J., Szekeres, P. G., Charles, K. J., Jourdain, S., Holbrook, J. D., Boyfield, I., Patel, N., Medhurst, A. D., and Pangalos, M. N. (2003) Molecular cloning and characterisation of a novel GABAB-related G-protein coupled receptor. *Mol. Brain Res.* **110**, 305–317
261. Schuler, V., Lüscher, C., Blanchet, C., Klix, N., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Heid, J., Gentry, C., Urban, L., Fox, A., Spooren, W., Jatón, A. L., Vigouret, J., Pozza, M., Kelly, P. H., Mosbacher, J., Froestl, W., Käslin, E., Korn, R., Bischoff, S., Kaupmann, K., van der Putten, H., and Bettler, B. (2001) Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron* **31**, 47–58
262. Gassmann, M., Shaban, H., Vigot, R., Sansig, G., Haller, C., Barbieri, S., Humeau, Y., Schuler, V., Müller, M., Kinzel, B., Klebs, K., Schmutz, M., Froestl, W., Heid, J., Kelly, P. H., Gentry, C., Jatón, A.-L., Van der Putten, H., Mombereau, C., Lecourtier, L., Mosbacher, J., Cryan, J. F., Fritschy, J.-M., Lüthi, A., Kaupmann, K., and Bettler, B. (2004) Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J. Neurosci.* **24**, 6086–97
263. Vigot, R., Barbieri, S., Bräuner-Osborne, H., Turecek, R., Shigemoto, R., Zhang, Y.-P., Luján, R., Jacobson, L. H., Biermann, B., Fritschy, J.-M., Vacher, C.-M., Müller, M., Sansig, G., Guetg, N., Cryan, J. F., Kaupmann, K., Gassmann, M., Oertner, T. G., and Bettler, B. (2006) Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* **50**, 589–601
264. Kohl, M. M., and Paulsen, O. (2010) The roles of GABAB receptors in cortical network activity. *Adv. Pharmacol.* **58**, 205–29
265. Kauffman, M. A., Levy, E. M., Consalvo, D., Mordoh, J., and Kochen, S. (2008) GABABR1 (G1465A) gene variation and temporal lobe epilepsy controversy: new evidence. *Seizure* **17**, 567–71
266. Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., and Gassmann, M. (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol. Rev.* **84**, 835–67
267. Cousins, M. S., Roberts, D. C. S., and de Wit, H. (2002) GABA(B) receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. *Drug Alcohol Depend.* **65**, 209–20
268. Herman, R. M., D’Luzansky, S. C., and Ippolito, R. (1992) Intrathecal baclofen suppresses central pain in patients with spinal lesions. A pilot study. *Clin. J. Pain* **8**, 338–45
269. Jiang, X., Su, L., Zhang, Q., He, C., Zhang, Z., Yi, P., and Liu, J. (2012) GABAB receptor complex as a potential target for tumor therapy. *J. Histochem. Cytochem.* **60**, 269–79
270. Deriu, D., Gassmann, M., Firbank, S., Ristig, D., Lampert, C., Mosbacher, J., Froestl, W., Kaupmann, K., Bettler, B., and Grütter, M. G. (2005) Determination of the minimal functional ligand-binding domain of the GABAB1b receptor. *Biochem. J.* **386**, 423–31

271. Wood, M. D., Murkitt, K. L., Rice, S. Q., Testa, T., Punia, P. K., Stammers, M., Jenkins, O., Elshourbagy, N. A., Shabon, U., Taylor, S. J., Gager, T. L., Minton, J., Hirst, W. D., Price, G. W., and Pangalos, M. (2000) The human GABA(B1b) and GABA(B2) heterodimeric recombinant receptor shows low sensitivity to phaclofen and saclofen. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 1050–4
272. Hirst, W. D., Babbs, A. J., Green, A., Minton, J. A. L., Shaw, T. E., Wise, A., Rice, S. Q., Pangalos, M. N., and Price, G. W. (2003) Pharmacological characterisation of a cell line expressing GABA B1b and GABA B2 receptor subunits. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1103–13
273. Binet, V., Brajon, C., Le Corre, L., Acher, F., Pin, J.-P., and Prézeau, L. (2004) The heptahelical domain of GABA(B2) is activated directly by CGP7930, a positive allosteric modulator of the GABA(B) receptor. *J. Biol. Chem.* **279**, 29085–91
274. Urwyler, S., Gjoni, T., Koljatić, J., and Dupuis, D. S. (2005) Mechanisms of allosteric modulation at GABAB receptors by CGP7930 and GS39783: effects on affinities and efficacies of orthosteric ligands with distinct intrinsic properties. *Neuropharmacology* **48**, 343–53
275. Mathivet, P., Bernasconi, R., De Barry, J., Marescaux, C., and Bittiger, H. (1997) Binding characteristics of gamma-hydroxybutyric acid as a weak but selective GABAB receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* **321**, 67–75
276. Lingenhoehl, K., Brom, R., Heid, J., Beck, P., Froestl, W., Kaupmann, K., Bettler, B., and Mosbacher, J. (1999) Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. *Neuropharmacology* **38**, 1667–73
277. Callaghan, B., Haythornthwaite, A., Berecki, G., Clark, R. J., Craik, D. J., and Adams, D. J. (2008) Analgesic alpha-conotoxins Vc1.1 and Rg1A inhibit N-type calcium channels in rat sensory neurons via GABAB receptor activation. *J. Neurosci.* **28**, 10943–51
278. Kniazeff, J., Galvez, T., Labesse, G., and Pin, J.-P. (2002) No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J. Neurosci.* **22**, 7352–61
279. Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prézeau, L., and Pin, J. P. (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J.* **20**, 2152–9
280. Galvez, T., Urwyler, S., Prézeau, L., Mosbacher, J., Joly, C., Malitschek, B., Heid, J., Brabet, I., Froestl, W., Bettler, B., Kaupmann, K., and Pin, J. P. (2000) Ca²⁺ requirement for high-affinity gamma-aminobutyric acid (GABA) binding at GABA(B) receptors: involvement of serine 269 of the GABA(B)R1 subunit. *Mol. Pharmacol.* **57**, 419–26
281. Kniazeff, J., Saintot, P.-P., Goudet, C., Liu, J., Charnet, A., Guillon, G., and Pin, J.-P. (2004) Locking the dimeric GABA(B) G-protein-coupled receptor in its active state. *J. Neurosci.* **24**, 370–7
282. Monnier, C., Tu, H., Bourrier, E., Vol, C., Lamarque, L., Trinquet, E., Pin, J.-P., and Rondard, P. (2010) Trans-activation between 7TM domains: implication in heterodimeric GABA(B) receptor activation. *EMBO J.*, 1–11
283. Pin, J.-P., Kniazeff, J., Binet, V., Liu, J., Maurel, D., Galvez, T., Duthey, B., Havlickova, M., Blahos, J., Prézeau, L., and Rondard, P. (2004) Activation mechanism of the heterodimeric GABA(B) receptor. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1565–72

284. Lüscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* **19**, 687–95
285. Mintz, I. M., and Bean, B. P. (1993) GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* **10**, 889–98
286. Poncer, J. C., McKinney, R. A., Gähwiler, B. H., and Thompson, S. M. (1997) Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron* **18**, 463–72
287. Sakaba, T., and Neher, E. (2003) Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* **424**, 775–8
288. Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2006) GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J. Neurosci.* **26**, 5370–82
289. White, J. H., McIlhinney, R. A., Wise, A., Ciruela, F., Chan, W. Y., Emson, P. C., Billinton, A., and Marshall, F. H. (2000) The GABAB receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13967–72
290. Tu, H., Xu, C., Zhang, W., Liu, Q., Rondard, P., Pin, J.-P., and Liu, J. (2010) GABAB receptor activation protects neurons from apoptosis via IGF-1 receptor transactivation. *J. Neurosci.* **30**, 749–59
291. Chalifoux, J. R., and Carter, A. G. (2010) GABAB receptors modulate NMDA receptor calcium signals in dendritic spines. *Neuron* **66**, 101–13
292. Gassmann, M., and Bettler, B. (2012) Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 380–94
293. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97–106
294. 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**, 317–28
295. Restituito, S., Couve, A., Bawagan, H., Jourdain, S., Pangalos, M. N., Calver, A. R., Freeman, K. B., and Moss, S. J. (2005) Multiple motifs regulate the trafficking of GABA(B) receptors at distinct checkpoints within the secretory pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 747–56
296. Chen, Q., Miller, L. J., and Dong, M. (2010) Role of N-linked glycosylation in biosynthesis, trafficking, and function of the human glucagon-like peptide 1 receptor. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E62–8
297. Bettler, B., and Tiao, J. Y.-H. (2006) Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol. Ther.* **110**, 533–43
298. Biermann, B., Ivankova-Susankova, K., Bradaia, A., Abdel Aziz, S., Besseyrias, V., Kapfhammer, J. P., Missler, M., Gassmann, M., and Bettler, B. (2010) The Sushi domains of GABAB receptors function as axonal targeting signals. *J. Neurosci.* **30**, 1385–94

299. Blein, S., Ginham, R., Uhrin, D., Smith, B. O., Soares, D. C., Veltel, S., McIlhinney, R. a J., White, J. H., and Barlow, P. N. (2004) Structural analysis of the complement control protein (CCP) modules of GABA(B) receptor 1a: only one of the two CCP modules is compactly folded. *J. Biol. Chem.* **279**, 48292–306
300. Sauter, K., Grampp, T., Fritschy, J.-M., Kaupmann, K., Bettler, B., Mohler, H., and Benke, D. (2005) Subtype-selective interaction with the transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) regulates cell surface expression of GABA(B) receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 33566–72
301. Fairfax, B. P., Pitcher, J. a, Scott, M. G. H., Calver, A. R., Pangalos, M. N., Moss, S. J., and Couve, A. (2004) Phosphorylation and chronic agonist treatment atypically modulate GABAB receptor cell surface stability. *J. Biol. Chem.* **279**, 12565–73
302. Pontier, S. M., Lahaie, N., Ginham, R., St-Gelais, F., Bonin, H., Bell, D. J., Flynn, H., Trudeau, L.-E., McIlhinney, J., White, J. H., and Bouvier, M. (2006) Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *EMBO J.* **25**, 2698–709
303. Grampp, T., Sauter, K., Markovic, B., and Benke, D. (2007) Gamma-aminobutyric acid type B receptors are constitutively internalized via the clathrin-dependent pathway and targeted to lysosomes for degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 24157–65
304. Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chénier, S., and Bouvier, M. (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* **22**, 3816–24
305. Sallese, M., Mariggìo, S., Collodel, G., Moretti, E., Piomboni, P., Baccetti, B., and De Blasi, A. (1997) G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 10188–95
306. Kanaide, M., and Uezono, Y. (2007) Desensitization of GABAB receptor signaling by formation of protein complexes of GABAB2 subunit with GRK4 or GRK5. *J. Cell. ...* **245**, 237–245
307. Fowler, C. E., Aryal, P., Suen, K. F., and Slesinger, P. A. (2007) Evidence for association of GABA(B) receptors with Kir3 channels and regulators of G protein signalling (RGS4) proteins. *J. Physiol.* **580**, 51–65
308. Schwenk, J., Metz, M., Zolles, G., Turecek, R., Fritzius, T., Bildl, W., Tarusawa, E., Kulik, A., Unger, A., Ivankova, K., Seddik, R., Tiao, J. Y., Rajalu, M., Trojanova, J., Rohde, V., Gassmann, M., Schulte, U., Fakler, B., and Bettler, B. (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* **465**, 231–5
309. Bartoi, T., Rigbolt, K. T. G., Du, D., Köhr, G., Blagoev, B., and Kornau, H.-C. (2010) GABAB receptor constituents revealed by tandem affinity purification from transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **285**, 20625–33
310. Seddik, R., Jungblut, S. P., Silander, O. K., Rajalu, M., Fritzius, T., Besseyrias, V., Jacquier, V., Fakler, B., Gassmann, M., and Bettler, B. (2012) Opposite Effects of KCTD Subunit Domains on GABAB Receptor-mediated Desensitization. *J. Biol. Chem.* **287**, 39869–77
311. Couve, a, Thomas, P., Calver, a R., Hirst, W. D., Pangalos, M. N., Walsh, F. S., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2002) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nat. Neurosci.* **5**, 415–24

312. Kuramoto, N., Wilkins, M. E., Fairfax, B. P., Revilla-Sanchez, R., Terunuma, M., Tamaki, K., Iemata, M., Warren, N., Couve, A., Calver, A., Horvath, Z., Freeman, K., Carling, D., Huang, L., Gonzales, C., Cooper, E., Smart, T. G., Pangalos, M. N., and Moss, S. J. (2007) Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron* **53**, 233–47
313. Terunuma, M., Vargas, K. J., Wilkins, M. E., Ram'virez, O. A., Jaureguiberry-Bravo, M., Pangalos, M. N., Smart, T. G., Moss, S. J., and Couve, A. (2010) Prolonged activation of NMDA receptors promotes dephosphorylation and alters postendocytic sorting of GABAB receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13918
314. Guetg, N., Aziz, S. A., Holbro, N., Turecek, R., Rose, T., Seddik, R., Gassmann, M., Moes, S., Jenoe, P., Oertner, T. G., and others (2010) NMDA receptor-dependent GABAB receptor internalization via CaMKII phosphorylation of serine 867 in GABAB1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13924
315. DeGiorgis, J. A., Jaffe, H., Moreira, J. E., Carlotti, C. G., Leite, J. P., Pant, H. C., Dosemeci, A., Jr, C. C., and Leite, P. (2005) Phosphoproteomic analysis of synaptosomes from human cerebral cortex. *J. Proteome Res.* **4**, 306–15
316. Hall, F. L., and Vulliet, P. R. (1991) Proline-directed protein phosphorylation and cell cycle regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 176–84
317. Marchal, C., Haguenuer-Tsapis, R., and Urban-Grimal, D. (1998) A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 314–21
318. Comps-Agrar, L., Kniazeff, J., Nørskov-Lauritsen, L., Maurel, D., Gassmann, M., Gregor, N., Prézeau, L., Bettler, B., Durrux, T., Trinquet, E., and Pin, J.-P. (2011) The oligomeric state sets GABA(B) receptor signalling efficacy. *EMBO J.* **30**, 2336–49
319. Becher, A., White, J. H., and McIlhinney, R. A. (2001) The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* **79**, 787–95
320. Becher, A., Green, A., Ige, A. O., Wise, A., White, J. H., and McIlhinney, R. a J. (2004) Ectopically expressed gamma-aminobutyric acid receptor B is functionally down-regulated in isolated lipid raft-enriched membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 981–7
321. Ivankova, K., Turecek, R., Fritzius, T., Seddik, R., Prezeau, L., Comps-Agrar, L., Pin, J.-P., Fakler, B., Besseyrias, V., Gassmann, M., and Bettler, B. (2013) Up-regulation of GABA(B) receptor signaling by constitutive assembly with the K⁺ channel tetramerization domain-containing protein 12 (KCTD12). *J. Biol. Chem.* **288**, 24848–56
322. Hannan, S., Wilkins, M. E., Dehghani-Tafti, E., Thomas, P., Baddeley, S. M., and Smart, T. G. (2011) GABAB receptor internalisation is regulated by the R2 subunit. *J. Biol. Chem.*
323. Vargas, K. J., Terunuma, M., Tello, J. a, Pangalos, M. N., Moss, S. J., and Couve, A. (2008) The availability of surface GABA B receptors is independent of gamma-aminobutyric acid but controlled by glutamate in central neurons. *J. Biol. Chem.* **283**, 24641–8
324. Grampp, T., Notz, V., Broll, I., Fischer, N., and Benke, D. (2008) Constitutive, agonist-accelerated, recycling and lysosomal degradation of GABA(B) receptors in cortical neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**, 628–37

325. Kuramoto, N., Ito, M., Saito, Y., Niihara, H., Tanaka, N., Yamada, K.-I., Yamamura, Y., Iwasaki, K., Onishi, Y., and Ogita, K. (2013) Dephosphorylation of endogenous GABA(B) receptor R2 subunit and AMPK α subunits which were measured by in vitro method using transfer membrane. *Neurochem. Int.* **62**, 137–44
326. Vernon, E., Meyer, G., Pickard, L., Dev, K., Molnar, E., Collingridge, G. L., and Henley, J. M. (2001) GABA(B) receptors couple directly to the transcription factor ATF4. *Mol. Cell. Neurosci.* **17**, 637–45
327. Nehring, R. B., Horikawa, H. P., El Far, O., Kneussel, M., Brandstätter, J. H., Stamm, S., Wischmeyer, E., Betz, H., and Karschin, a (2000) The metabotropic GABAB receptor directly interacts with the activating transcription factor 4. *J. Biol. Chem.* **275**, 35185–91
328. Woo, C. W., Cui, D., Arellano, J., Dorweiler, B., Harding, H., Fitzgerald, K. A., Ron, D., and Tabas, I. (2009) Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1473–80
329. Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., and Fafournoux, P. (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 5288–97
330. Couve, A., Restituito, S., Brandon, J. M., Charles, K. J., Bawagan, H., Freeman, K. B., Pangalos, M. N., Calver, A. R., and Moss, S. J. (2004) Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 13934–43
331. Vidal, R. L., Ramírez, O. a, Sandoval, L., Koenig-Robert, R., Härtel, S., and Couve, A. (2007) Marlin-1 and conventional kinesin link GABAB receptors to the cytoskeleton and regulate receptor transport. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 501–12
332. Laffray, S., Bouali-Benazzouz, R., Papon, M.-A., Favereaux, A., Jiang, Y., Holm, T., Spriet, C., Desbarats, P., Fossat, P., Le Feuvre, Y., Decossas, M., Héliot, L., Langel, U., Nagy, F., and Landry, M. (2012) Impairment of GABAB receptor dimer by endogenous 14-3-3 ζ in chronic pain conditions. *EMBO J.* **31**, 3239–51
333. Chang, W., Tu, C., Cheng, Z., Rodriguez, L., Chen, T.-H., Gassmann, M., Bettler, B., Margeta, M., Jan, L. Y., and Shoback, D. (2007) Complex formation with the Type B gamma-aminobutyric acid receptor affects the expression and signal transduction of the extracellular calcium-sensing receptor. Studies with HEK-293 cells and neurons. *J. Biol. Chem.* **282**, 25030–40
334. Balasubramanian, S., Fam, S. R., and Hall, R. A. (2007) GABAB receptor association with the PDZ scaffold Muppl alters receptor stability and function. *J. Biol. Chem.* **282**, 4162–71
335. Calver, A. R., Davies, C. H., and Pangalos, M. GABA(B) receptors: from monogamy to promiscuity. *Neurosignals.* **11**, 299–314
336. Boyer, S. B., Clancy, S. M., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Thomas, S. M., Moss, S. J., and Slesinger, P. a (2009) Direct interaction of GABAB receptors with M2 muscarinic receptors enhances muscarinic signaling. *J. Neurosci.* **29**, 15796–809
337. Kitano, J., Kimura, K., Yamazaki, Y., Soda, T., Shigemoto, R., Nakajima, Y., and Nakanishi, S. (2002) Tamalin, a PDZ domain-containing protein, links a protein complex formation of group 1 metabotropic glutamate receptors and the guanine nucleotide exchange factor cytohesins. *J. Neurosci.* **22**, 1280–9

338. Zemoura, K., Schenkel, M., Acuña, M. a, Yévenes, G. E., Zeilhofer, H. U., and Benke, D. (2013) Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Controls Cell Surface Expression of γ -Aminobutyric Acid, Type B Receptors. *J. Biol. Chem.* **288**, 34897–905
339. Sullivan, R., Chateaneuf, a, Coulombe, N., Kolakowski, L. F., Johnson, M. P., Hebert, T. E., Ethier, N., Belley, M., Metters, K., Abramovitz, M., O'Neill, G. P., and Ng, G. Y. (2000) Coexpression of full-length gamma-aminobutyric acid(B) (GABA(B)) receptors with truncated receptors and metabotropic glutamate receptor 4 supports the GABA(B) heterodimer as the functional receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 460–7
340. Pooler, A. M., Gray, A. G., and McIlhinney, R. A. J. (2009) Identification of a novel region of the GABA(B2) C-terminus that regulates surface expression and neuronal targeting of the GABA(B) receptor. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 869–78
341. Krapivinsky, G., Medina, I., Krapivinsky, L., Gapon, S., and Clapham, D. E. (2004) SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron* **43**, 563–74
342. Galehdar, Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S. M., Park, D. S., and Cregan, S. P. (2010) Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J. Neurosci.* **30**, 16938–48
343. Goto, H., Terunuma, M., Kanematsu, T., Misumi, Y., Moss, S. J., and Hirata, M. (2005) Direct interaction of N-ethylmaleimide-sensitive factor with GABA(A) receptor beta subunits. *Mol. Cell. Neurosci.* **30**, 197–206
344. Chen, S., and Liu, F. (2010) Interaction of dopamine D1 receptor with N-ethylmaleimide-sensitive factor is important for the membrane localization of the receptor. *J. Neurosci. Res.* **88**, 2504–12
345. Kammerer, R. A., Frank, S., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., and Engel, J. (1999) Heterodimerization of a functional GABAB receptor is mediated by parallel coiled-coil alpha-helices. *Biochemistry* **38**, 13263–9
346. Huang, Y., Man, H.-Y., Sekine-Aizawa, Y., Han, Y., Juluri, K., Luo, H., Cheah, J., Lowenstein, C., Huganir, R. L., and Snyder, S. H. (2005) S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Neuron* **46**, 533–40
347. Matveeva, E. A., Whiteheart, S. W., Vanaman, T. C., and Slevin, J. T. (2001) Phosphorylation of the N-ethylmaleimide-sensitive factor is associated with depolarization-dependent neurotransmitter release from synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 12174–81
348. Chou, W.-H., Wang, D., McMahon, T., Qi, Z.-H., Song, M., Zhang, C., Shokat, K. M., and Messing, R. O. (2010) GABAA receptor trafficking is regulated by protein kinase C(epsilon) and the N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J. Neurosci.* **30**, 13955–65
349. Lau, C. G., Takayasu, Y., Rodenas-Ruano, A., Paternain, A. V, Lerma, J., Bennett, M. V. L., and Zukin, R. S. (2010) SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *J. Neurosci.* **30**, 242–54
350. Hirling, H., and Scheller, R. H. (1996) Phosphorylation of synaptic vesicle proteins: modulation of the alpha SNAP interaction with the core complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11945–9

351. Huynh, H., Bottini, N., Williams, S., Cherepanov, V., Musumeci, L., Saito, K., Bruckner, S., Vachon, E., Wang, X., Kruger, J., Chow, C.-W., Pellecchia, M., Monosov, E., Greer, P. A., Trimble, W., Downey, G. P., and Mustelin, T. (2004) Control of vesicle fusion by a tyrosine phosphatase. *Nat. Cell Biol.* **6**, 831–9
352. Zarelli, V. E. P., Ruete, M. C., Roggero, C. M., Mayorga, L. S., and Tomes, C. N. (2009) PTP1B dephosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive factor and elicits SNARE complex disassembly during human sperm exocytosis. *J. Biol. Chem.* **284**, 10491–503
353. 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**, 1266–9
354. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001) Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14649–54
355. Zhou, C., Li, C., Yu, H.-M., Zhang, F., Han, D., and Zhang, G.-Y. (2008) Neuroprotection of gamma-aminobutyric acid receptor agonists via enhancing neuronal nitric oxide synthase (Ser847) phosphorylation through increased neuronal nitric oxide synthase and PSD95 interaction and inhibited protein phosphatase activity in cerebra. *J. Neurosci. Res.* **86**, 2973–83
356. Lee, S. H., Liu, L., Wang, Y. T., and Sheng, M. (2002) Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* **36**, 661–74
357. Kittler, J. T., Chen, G., Honing, S., Bogdanov, Y., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I. L., Jovanovic, J. N., Pangalos, M. N., Haucke, V., Yan, Z., and Moss, S. J. (2005) Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 14871–6
358. Gardner, S. M., Takamiya, K., Xia, J., Suh, J.-G., Johnson, R., Yu, S., and Huganir, R. L. (2005) Calcium-permeable AMPA receptor plasticity is mediated by subunit-specific interactions with PICK1 and NSF. *Neuron* **45**, 903–15
359. Steinberg, J. P., Huganir, R. L., and Linden, D. J. (2004) N-ethylmaleimide-sensitive factor is required for the synaptic incorporation and removal of AMPA receptors during cerebellar long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 18212–6
360. Kneussel, M., and Loeblich, S. (2007) Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol. Cell* **99**, 297–309
361. Pooler, A. M., and McIlhinney, R. A. J. (2007) Lateral diffusion of the GABAB receptor is regulated by the GABAB2 C terminus. *J. Biol. Chem.* **282**, 25349–56
362. Maier, P. J., Marin, I., Grampp, T., Sommer, A., and Benke, D. (2010) Sustained glutamate receptor activation downregulates GABA(B) receptors by shifting the balance from recycling to lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.*
363. Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R.-M., Tsai, Y. C., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., Pierre, S. A., Jensen, J. P., Davydov, I. V., Oberoi, P., Li, C.-C. H., Kenten, J. H., Beutler, J. A., Vousden, K. H., and Weissman, A. M. (2007) Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res.* **67**, 9472–81

364. Dutar, P., and Nicoll, R. A. (1988) Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* **1**, 585–91
365. Harper, J. W. (2002) A phosphorylation-driven ubiquitination switch for cell-cycle control. *Trends Cell Biol.* **12**, 104–7
366. Li, S., Zhang, Q., and You, G. (2013) Three ubiquitination sites of organic anion transporter-1 synergistically mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Mol. Pharmacol.* **84**, 139–46
367. Chen, B., Dores, M. R., Grimsey, N., Canto, I., Barker, B. L., and Trejo, J. (2011) Adaptor protein complex-2 (AP-2) and epsin-1 mediate protease-activated receptor-1 internalization via phosphorylation- and ubiquitination-dependent sorting signals. *J. Biol. Chem.* **286**, 40760–70
368. Gardner, R. G., Swarbrick, G. M., Bays, N. W., Cronin, S. R., Wilhovsky, S., Seelig, L., Kim, C., and Hampton, R. Y. (2000) Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J. Cell Biol.* **151**, 69–82
369. Okiyoneda, T., Barrière, H., Bagdány, M., Rabeh, W. M., Du, K., Höhfeld, J., Young, J. C., and Lukacs, G. L. (2010) Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science* **329**, 805–10
370. Hoeller, D., and Dikic, I. (2010) Regulation of ubiquitin receptors by coupled monoubiquitination. *Subcell. Biochem.* **54**, 31–40
371. Wright, M. H., Berlin, I., and Nash, P. D. (2011) Regulation of endocytic sorting by ESCRT-DUB-mediated deubiquitination. *Cell Biochem. Biophys.* **60**, 39–46
372. Anderson, C., Crimmins, S., Wilson, J. a, Korbelt, G. a, Ploegh, H. L., and Wilson, S. M. (2005) Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice. *J. Neurochem.* **95**, 724–31
373. Bhattacharyya, B. J., Wilson, S. M., Jung, H., and Miller, R. J. (2012) Altered neurotransmitter release machinery in mice deficient for the deubiquitinating enzyme Usp14. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C698–708
374. Jarome, T. J., Kwapis, J. L., Hallengren, J. J., Wilson, S. M., and Helmstetter, F. J. (2013) The ubiquitin-specific protease 14 (USP14) is a critical regulator of long-term memory formation. *Learn. Mem.* **21**, 748–52
375. Walters, B. J., Hallengren, J. J., Theile, C. S., Ploegh, H. L., Wilson, S. M., and Dobrunz, L. E. (2013) A catalytic independent function of the deubiquitinating enzyme USP14 regulates hippocampal short-term synaptic plasticity and vesicle number. *J. Physiol.*
376. Lappe-Siefke, C., Loeblich, S., Hevers, W., Waidmann, O. B., Schweizer, M., Fehr, S., Fritschy, J.-M., Dikic, I., Eilers, J., Wilson, S. M., and Kneussel, M. (2009) The ataxia (axJ) mutation causes abnormal GABAA receptor turnover in mice. *PLoS Genet.* **5**, e1000631
377. Hegde, A. N. (2010) The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learn. Mem.* **17**, 314–27
378. Bingol, B., Wang, C.-F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J., and Sheng, M. (2010) Autophosphorylated CaMKIIalpha acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines. *Cell* **140**, 567–78

379. Djakovic, S. N., Marquez-Lona, E. M., Jakawich, S. K., Wright, R., Chu, C., Sutton, M. A., and Patrick, G. N. (2012) Phosphorylation of Rpt6 regulates synaptic strength in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **32**, 5126–31
380. Marsden, K. C., Shemesh, A., Bayer, K. U., and Carroll, R. C. (2010) Selective translocation of Ca²⁺/calmodulin protein kinase II {alpha} (CaMKII {alpha}) to inhibitory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
381. Peth, A., Kukushkin, N., Bossé, M., and Goldberg, A. L. (2013) Ubiquitinated proteins activate the proteasomal ATPases by binding to Usp14 or Uch37 homologs. *J. Biol. Chem.* **288**, 7781–90
382. Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., and Fagni, L. (2003) The “magic tail” of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* **546**, 65–72
383. Luján, R., and Ciruela, F. (2012) GABAB receptors-associated proteins: potential drug targets in neurological disorders? *Curr. Drug Targets* **13**, 129–44
384. Richer, M., David, M., Villeneuve, L. R., Trieu, P., Ethier, N., Pétrin, D., Mamarbachi, A. M., and Hébert, T. E. (2009) GABA-B(1) receptors are coupled to the ERK1/2 MAP kinase pathway in the absence of GABA-B(2) subunits. *J. Mol. Neurosci.* **38**, 67–79
385. Gassmann, M., Haller, C., Stoll, Y., Abdel Aziz, S., Biermann, B., Mosbacher, J., Kaupmann, K., and Bettler, B. (2005) The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function. *Mol. Pharmacol.* **68**, 137–44
386. Huang, F., and Sorkin, A. (2005) Growth factor receptor binding protein 2-mediated recruitment of the RING domain of Cbl to the epidermal growth factor receptor is essential and sufficient to support receptor endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1268–81
387. She, H. Y., Rockow, S., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E. Y., Chen, M., Margolis, B., and Li, W. (1997) Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1709–21
388. 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**, 33035–41
389. Oldenhof, J., Vickery, R., Anafi, M., Oak, J., Ray, A., Schoots, O., Pawson, T., von Zastrow, M., and Van Tol, H. H. (1998) SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. *Biochemistry* **37**, 15726–36
390. Saunders, C., and Limbird, L. E. (1997) Disruption of microtubules reveals two independent apical targeting mechanisms for G-protein-coupled receptors in polarized renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 19035–45
391. Leil, T. A., Chen, Z.-W., Chang, C.-S. S., and Olsen, R. W. (2004) GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J. Neurosci.* **24**, 11429–38
392. Lüthi, a, Chittajallu, R., Duprat, F., Palmer, M. J., Benke, T. a, Kidd, F. L., Henley, J. M., Isaac, J. T., and Collingridge, G. L. (1999) Hippocampal LTD expression involves a pool of AMPARs regulated by the NSF-GluR2 interaction. *Neuron* **24**, 389–99

393. Galés, C., Van Durm, J. J. J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 778–86
394. Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993) A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* **73**, 179–91
395. Ando, A., Yonezawa, K., Gout, I., Nakata, T., Ueda, H., Hara, K., Kitamura, Y., Noda, Y., Takenawa, T., and Hirokawa, N. (1994) A complex of GRB2-dynamin binds to tyrosine-phosphorylated insulin receptor substrate-1 after insulin treatment. *EMBO J.* **13**, 3033–8
396. Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786–91
397. Wu, X., Gan, B., Yoo, Y., and Guan, J.-L. (2005) FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Dev. Cell* **9**, 185–96
398. Goldstein, B. J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M. F., and Harbeck, M. (2000) Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 4283–9

Annexe 1 : Résultats supplémentaires NSF/GABA_B

FIGURE 1 : Séquence des acides aminés de la queue carboxyl-terminale de GABA_{B(2)}, la région coiled-coil étant soulignée. La séquence en rouge est la région des 11 acides aminés déterminée dans l'essai de criblage en levure. Les différentes mutations apportées au sein des mutants A1, A2, A3 et A4 sont illustrées en comparaison du type sauvage (WT).

FIGURE 2 : Immunoprécipitations de NSF par les différents mutants alanines de GABA_{B(2)}. La sous-unité HA-GABA_{B(2)} WT ou mutante (A1 à A4) est exprimée dans des cellules HEK293T en présence de surexpression de NSF. Les cellules sont solubilisées dans du tampon TNTO (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 60mM β -octylglucopyranoside, 1mM DTT, 5 mg/ml leupeptine, 5 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 10 mg/ml benzamidine) et soumises à une immunoprécipitation en présence d'anticorps anti-HA 12Ca5 (ascites de souris, diluées 1 :500) et de billes de sépharoses conjuguées à la protéine G. Suite à l'immunoprécipitation, les échantillons sont lavés 3 fois dans du tampon TNTO contenant 350 mM de NaCl et élués avec du tampon Laemmli 1.5x. Les échantillons sont sujets à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose, avant d'être soumis à un premier immunobuvardage avec un anticorps anti-NSF (lapin, Calbiochem). Les membranes sont dénudées et soumises à un immunobuvardage avec un anticorps anti-GABA_{B(2)} (lapin, GlaxoSmithKline). L'intensité des bandes est analysée par le logiciel Quantity One (BioRad) et le ratio NSF/GABA_{B(2)} est calculé. Les mutants sont divisés par le ratio du WT. L'histogramme à droite représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

FIGURE 3 : Séquence des acides aminés de la queue carboxyl-terminale de GABA_{B(1)}. La région coiled-coil est soulignée, et les différents mutants de délétions utilisés en GST-pulldown sont illustrés par les différentes couleurs. Le mutant 921 contient les acides aminés en noir, rouge et orange, le mutant 903 les acides aminés en noir et rouge et le mutant 886 les acides aminés en noir seulement.

FIGURE 4 : GST-pulldown de NSF par la queue carboxyl-terminale de GABA_{B(1)} et différents mutants de délétions. NSF et les queues carboxyl-terminales attachées à la protéine GST sont purifiées tel que décrit dans le premier article. 2 μ g de chacune des queues carboxyl-

terminales ou un contrôle négatif (GST seule) sont liées aux billes de sépharose et incubées en présence de 50 nM de NSF purifié dans un tampon contenant 25 mM Hepes-KOH (pH 7.4), 200 mM KCl, 1% Triton X-100, 10% glycérol, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 8 mM MgCl₂ et 8 mM EDTA. Après une heure d'incubation, les échantillons sont centrifugés et le surnageant est retiré. Les billes sont lavées 4 fois avec le tampon d'incubation et éluées avec 20 mM glutathione. Les éluats sont déposés sur gel SDS-PAGE et soumis à une électrophorèse. Les protéines sont détectés par immunobuvardage avec un anticorps anti-NSF (lapin) ou anti GST (souris, Sigma). L'intensité des bandes est analysée par le logiciel Quantity One (BioRad) et la proportion NSF/GST est calculée. L'histogramme ci-dessous représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

FIGURE 5 : Interaction de α et β -SNAP avec la queue carboxyl-terminale de GABA_{B(2)}. La queue carboxyl-terminale de GABA_{B(2)} et α/β -SNAP ont été purifiés tel que décrit dans le premier article. 2 μ g de la queue carboxyl-terminale de GABA_{B(2)} ou un contrôle négatif (GST seule) sont liés aux billes de sépharose et incubés en présence de 500 nM de α ou β -SNAP purifié dans un tampon contenant 25 mM Hepes-KOH (pH 7.4), 200 mM KCl, 1% Triton X-100, 10% glycérol et 1 mM DTT. Après une heure d'incubation, les échantillons sont centrifugés et le surnageant est retiré. Les billes sont lavées 4 fois avec le tampon d'incubation et éluées avec 20 mM glutathione. Les éluats sont déposés sur gel SDS-PAGE et soumis à une électrophorèse. Les protéines sont détectés par immunobuvardage avec un anticorps anti- α/β -SNAP (souris, Calbiochem) ou anti GST. L'expérience est représentative de trois différentes expériences indépendantes.

FIGURE 6 : Interaction entre GABA_{B(2)} et le complexe AP-2. Les sous-unités GABA_B (indiquées sur l'axe X) sont coexprimées avec β -adapline 2-YFP, membre du complexe AP-2 dans des cellules HEK293T en présence de surexpression de NSF ou du plasmide contrôle. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS et resuspendues dans du PBS contenant 30 mM glucose. Les cellules sont incubées avec 5 μ M de *coelenterazine h* et le signal BRET est mesuré dans un Mithras (Berthold) tel qu'indiqué dans le deuxième article. Les résultats sont une moyenne (et écart-type) de 3 expériences indépendantes.

FIGURE 7 : NSF diminue l'internalisation constitutive du récepteur GABA_B. Tel que décrit dans le deuxième article. Des cellules HEK293T exprimant Myc-GABA_{B(1b)}, HA-GABA_{B(2)}

et soit NSF, soit un plasmide vide (pcDNA3) sont incubées avec un anticorps anti-Myc (9E10, souris) pour 1 heure à 4°C dans du tampon A et lavées 3 fois. L'internalisation constitutive est induite en incubant les cellules à 37°C pour 2 heures. Ensuite, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire (anti-IgG de souris) couplé à une Hrp (Horseradish peroxydase) pour 30 minutes et lavées à 4 reprises avant d'être soumises à un traitement avec le réactif Sigma SuperFast. Le signal du pourcentage d'internalisation est obtenu en soustrayant la quantité finale de signal d'un contrôle gardé sur glace. Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

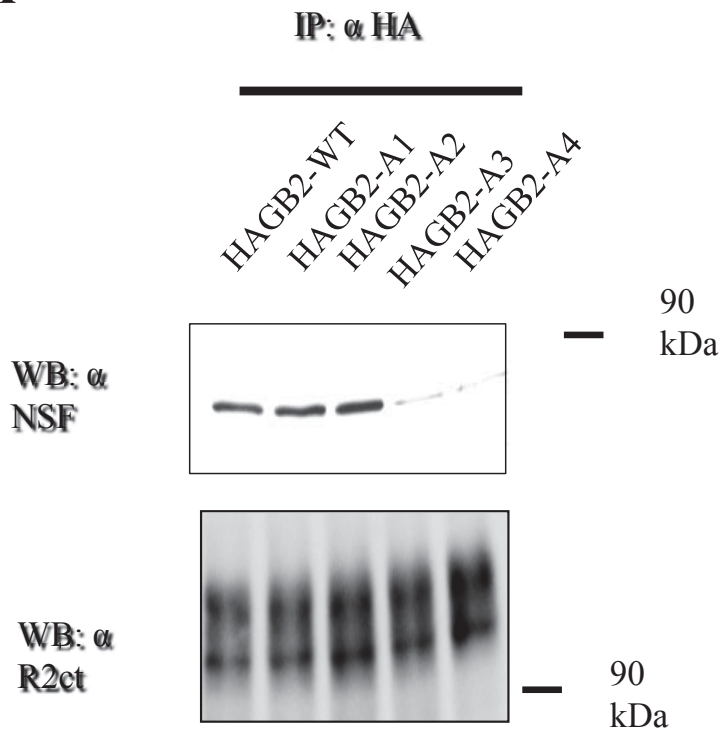
Figure 1

742 PKLITLRTNPDAATQNRRFQFTQNQKKEDSKTSTSVTNQASTSRLEGLQ
SENHRL**RMKITE**LDKDLEVTMQLQDTPEKTTYIKQNHQELNDILNLG
NFTTESTDGGKAILKNHLDQNPQLQWNTTEPSRTCKDPIEDINSPEHIQR
RLSLQLPILHHAYLPSIGGVDASCVSPCVSPTASPRHRHVPPSFRVMVSGL
941

WT	RMK <u>I</u> TE <u>L</u> DK <u>D</u> L
A1	AAA <u>I</u> TE <u>L</u> DK <u>D</u> L
A2	AAA <u>I</u> A <u>A</u> L <u>D</u> DK <u>D</u> L
A3	RMK <u>I</u> TE <u>L</u> AA <u>A</u> L
A4	RMK <u>I</u> A <u>A</u> L <u>A</u> AA <u>L</u>

Figure 2

A



B

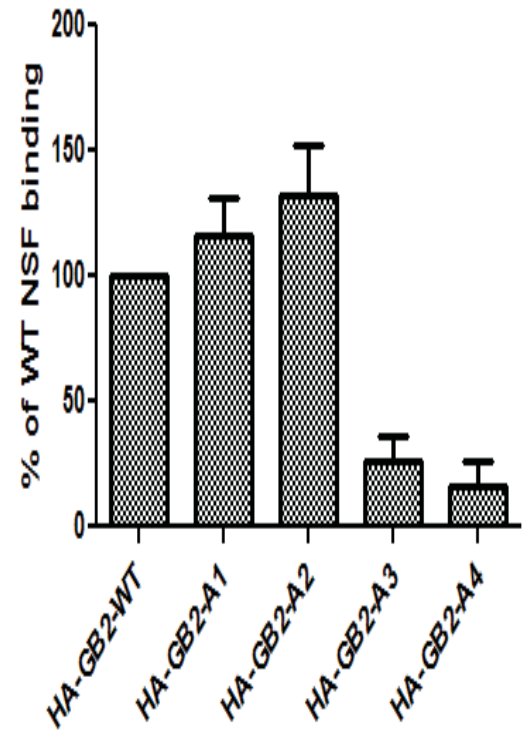


Figure 3

854 VPKMRRLITRGEWQSEAQDTMKTGSSTNNN
EEEKSRLLEKENRELEKIIAEKEERVSELRHQL
QSRQQLRSRRHPPTPPEPSGGLPRGPPEPPDRL
SCDGSRVHLLYK 961

Mutants de délétions

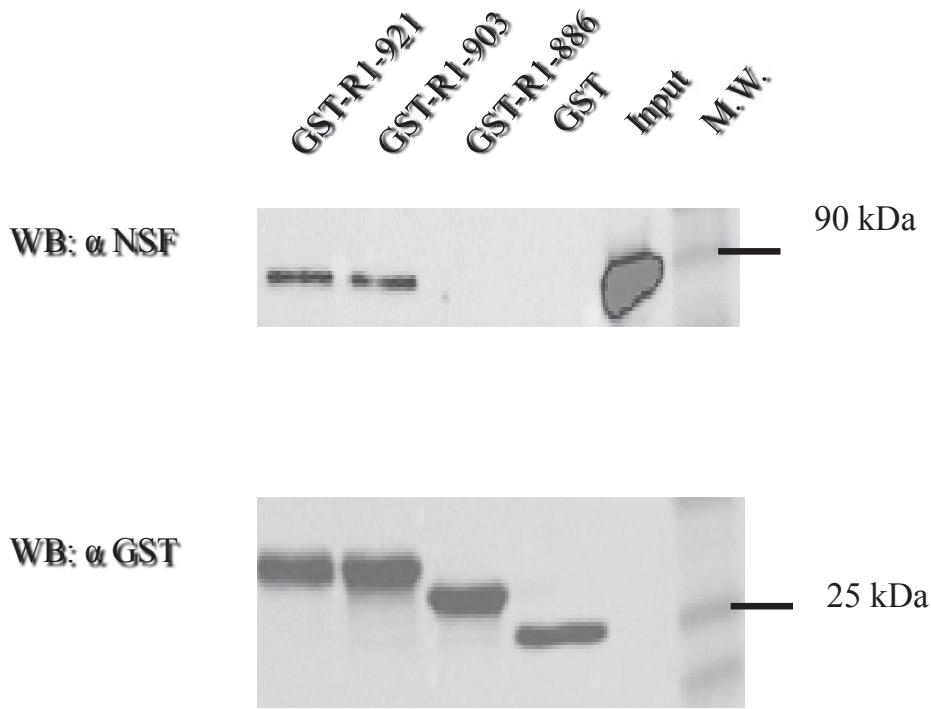
R1ct-921 : C-tail from 854 to 921 (922-961 délétés)

R1ct-903 : C-tail from 854 to 903 (903-961 délétés)

R1ct-886 : C-tail from 854 to 903 (887-961 délétés)

Figure 4

A



B

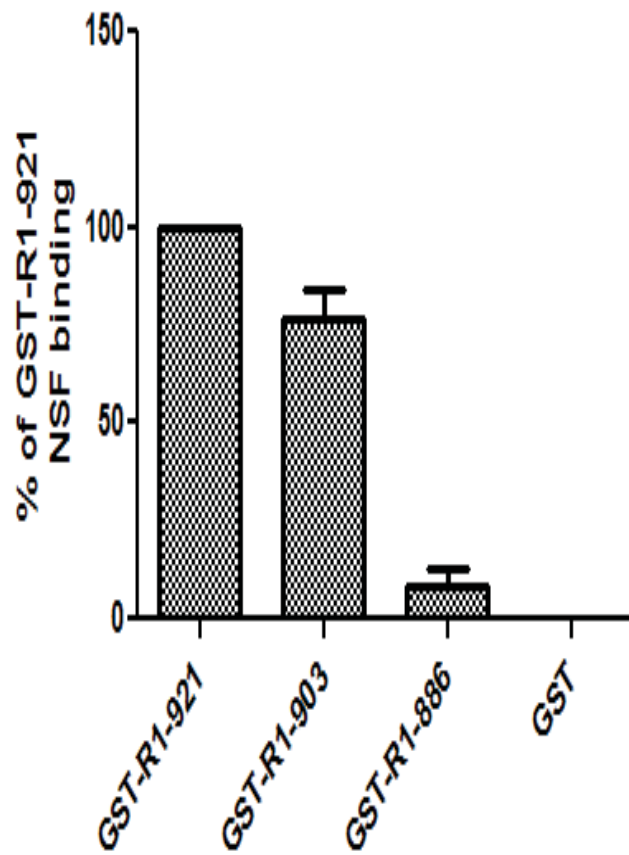


Figure 5

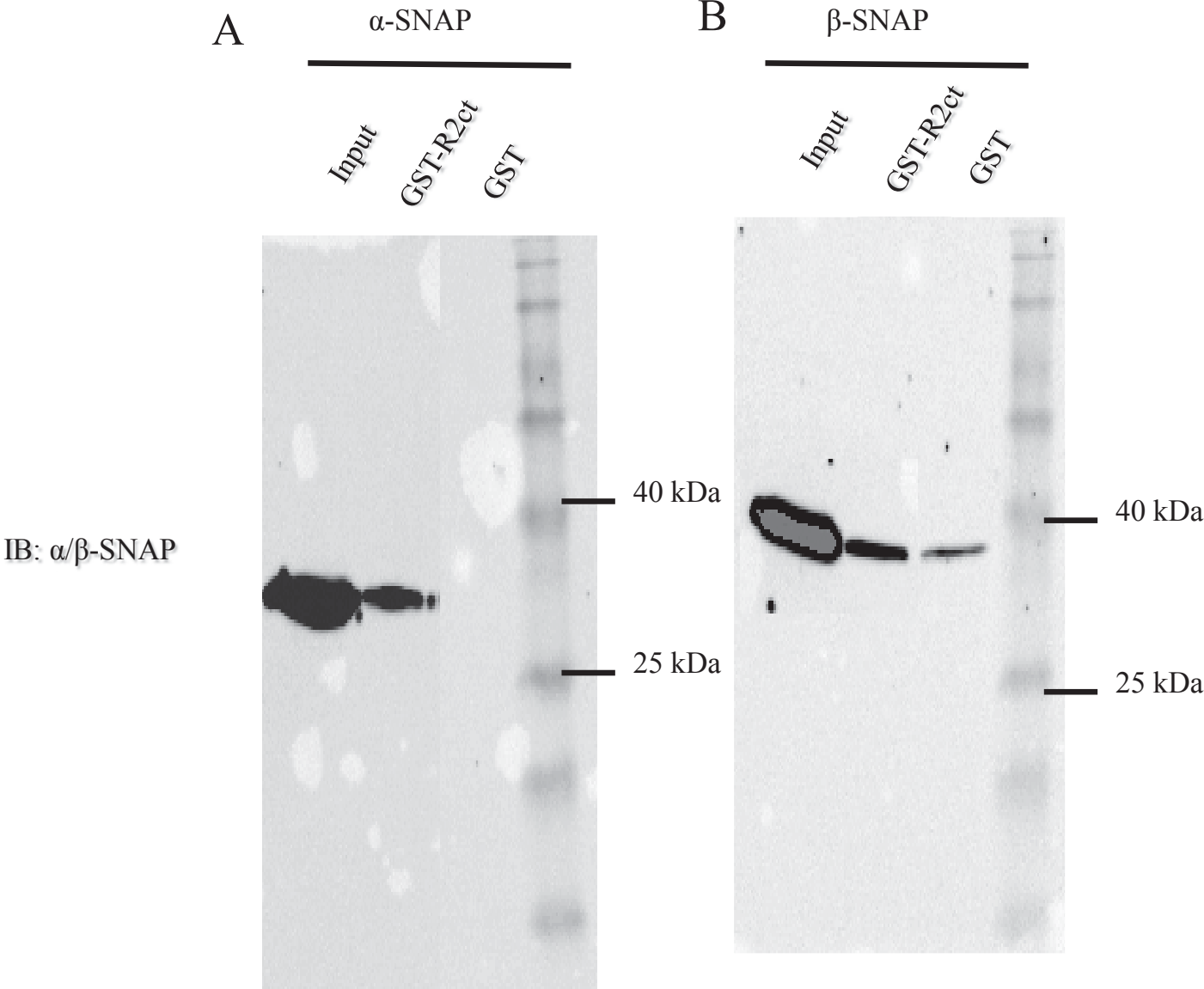


Figure 6

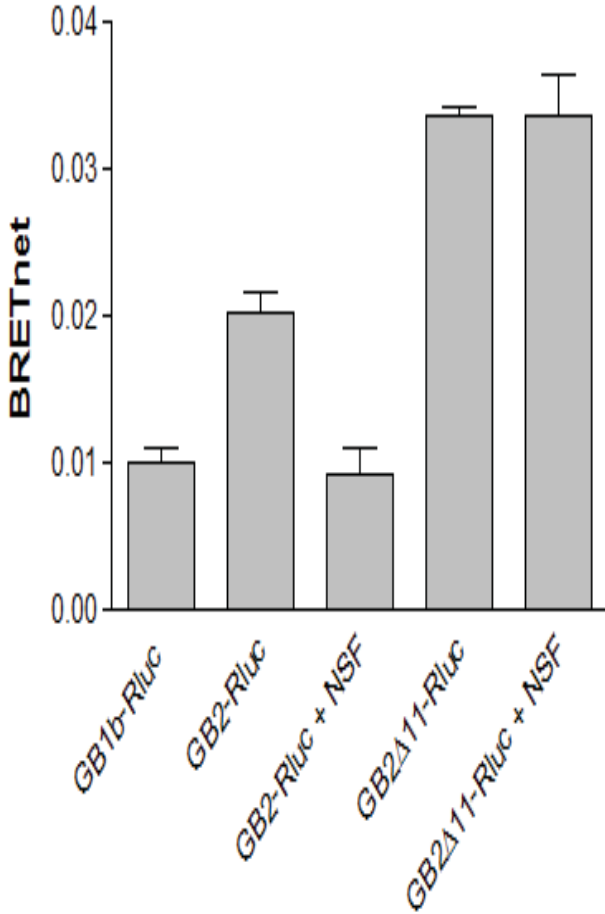


Figure 7

