

2m11.3023.4

Université de Montréal

Démonstration biochimique et biophysique de l'existence
d'hétéro-dimères entre les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques

par

Jean-François Mercier

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

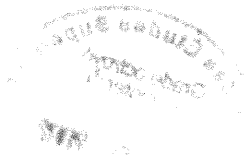
Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Biochimie

Août 2002

© Jean-François Mercier, 2002



W
4
U58
2002
N. 119



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Démonstration biochimique et biophysique de l'existence
d'hétéro-dimères entre les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques

présenté par :
Jean-François Mercier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luc DesGroseillers
Président-rapporteur

Dr Michel Bouvier
Directeur de recherche

Dr Nikolas Heveker
Membre du jury

Résumé

Les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques (β_1 AR et β_2 AR) sont co-exprimés dans de nombreux tissus où ils jouent un rôle central dans la réponse de divers organes à une stimulation sympathique. Puisque de nombreuses évidences supportent l'existence d'homo et d'hétéro-dimères chez les Récepteurs Couplés aux Protéines G, des études ont été entreprises afin de vérifier l'existence d'hétéro-dimères entre β_1 et β_2 AR et les conséquences fonctionnelles de cette potentielle hétéro-dimérisation. Nous avons démontré que ces deux récepteurs forment un complexe stable à la surface cellulaire et qu'ils ont autant de facilité à former des homo ou des hétéro-dimères dans des cellules vivantes. Fonctionnellement, l'hétéro-dimérisation des deux sous-types ne permet pas l'activation agoniste-dépendante de la voie ERK1/2 MAP kinase, qui est activée dans des cellules exprimant seulement β_2 AR mais pas β_1 AR. De plus, une inhibition de l'internalisation agoniste-dépendante du β_2 AR est observée lorsque les deux sous-types sont co-exprimés. Nous avons également observé que plus de 80% des récepteurs exprimés dans les cellules forment des dimères et que cette grande proportion de dimères est indépendante de la densité de récepteurs exprimés pour des niveaux d'expression variant entre 0,4 et 14,5 pmol de récepteur/mg de protéine cellulaire. Ces résultats indiquent donc que l'hétéro-dimérisation de β_1 et β_2 AR inhibe l'internalisation agoniste-dépendante du β_2 AR et sa capacité à activer la voie de signalisation ERK1/2 MAPK. De plus, la majorité des récepteurs exprimés dans des cellules existent sous forme de dimère constitutif et la proportion d'homo et d'hétéro-dimères entre β_1 et β_2 AR est déterminée par la loi d'action de masse.

Mots-clés : Récepteur couplé aux protéines G; Dimérisation; Homo-dimère; Transfert d'énergie; Quantification; Affinité relative; Proportions; Internalisation; ERK1/2 MAP kinase.

Abstract

β_1 and β_2 -adrenergic receptors (β_1 AR and β_2 AR) are co-expressed in numerous tissues where they play a central role in the responses of various organs to sympathetic stimulation. Given the recent recognition that many G protein-coupled receptors can form homo and hetero-dimers, this study was undertaken to determine if the β_1 and β_2 AR can form dimers in cells and investigate the functional consequences of their hetero-dimerization. We have shown that the two receptors are forming a stable complex expressed at the cell surface and that they have the same propensity to engage in homo- and heterotropic interactions in living cells. Functionally, the β_1 and β_2 AR co-expression did not allow the agonist-promoted ERK1/2 MAP kinase activation, which was activated in cells expressing only β_2 AR but not β_1 AR. Moreover, a similar inhibition of agonist-promoted internalization of the β_2 AR was observed upon co-expression of the two subtypes. We have also observed that more than 80% of the receptors expressed in cells are engaged in dimer formation and that this high proportion of dimers is insensitive to receptor density for expression levels varying between 0,4 and 14,5 pmol/mg of cellular proteins. Taken together, these results indicate that the β_1 and β_2 AR hetero-dimerization inhibits the agonist-promoted internalization of the β_2 AR and its ability to activate the ERK1/2 MAPK signaling pathway. Moreover, most of the receptors expressed in cells exist as constitutive dimers and the proportion of homo and hetero-dimers between β_1 and β_2 AR is determined by the law of mass action.

Key-words : G protein-coupled receptors; Dimerization; Homo-dimers; Energy transfer; Quantification; Relative affinity; Proportions; Internalization; ERK1/2 MAP kinase.

Table des matières

| | |
|---|-------------|
| Résumé | iii |
| Abstract | iv |
| Table des matières | v |
| Liste des tableaux | vii |
| Liste des figures | viii |
| Liste des sigles et abréviations | ix |
| Les remerciements | x |
| | |
| CHAPITRE 1: INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Les Récepteurs Couplés aux Protéines G | 2 |
| 1.2 Les récepteurs β -adrénergiques | 3 |
| 1.2.1 Les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques: similarités et différences | 5 |
| 1.3 L'historique de la dimérisation des RCPG | 10 |
| 1.3.1 La co-immunoprécipitation | 11 |
| 1.3.2 Stabilité des dimères | 12 |
| 1.3.3 La détection de dimères chez des cellules vivantes | 15 |
| 1.3.3.1 Les caractéristiques physiques des techniques de transfert d'énergie de résonance | 15 |
| 1.3.3.2 Le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) | 16 |
| 1.3.3.3 Le transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) | 19 |
| 1.3.4 La formation des dimères chez les RCPG | 20 |
| 1.4 Les objectifs du projet de maîtrise | 24 |
| | |
| CHAPITRE 2: PREMIER ARTICLE | 26 |
| <i>β_1/β_2-adrenergic receptor heterodimerization regulates β_2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy.</i> | 28 |
| 2.1 Abstract | 29 |
| 2.2 Introduction | 30 |
| 2.3 Experimental Procedures | 32 |
| 2.4 Results | 38 |
| 2.5 Discussion | 50 |
| 2.6 Acknowledgements | 54 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE 3: DEUXIÈME ARTICLE | 55 |
| Quantitative Assessment of β_1 and β_2-Adrenergic Receptor Homo and Hetero-Dimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. | 57 |
| 3.1 Abstract | 58 |
| 3.2 Introduction | 59 |
| 3.3 Experimental Procedures | 62 |
| 3.4 Results and Discussion | 66 |
| 3.5 Conclusion | 77 |
| 3.6 Acknowledgements | 78 |
| | |
| CHAPITRE 4: RÉSULTATS ADDITIONNELS | 79 |
| 4.1 Localisation sub-cellulaire de l'hétéro-dimère β_1/β_2-adrénergique | 80 |
| 4.1.1 Procédures expérimentales | 80 |
| 4.1.2 Résultats | 81 |
| 4.2 Recrutement de la β-arrestine par β_1 et β_2AR en présence de ligands sélectifs ou non-sélectifs | 83 |
| 4.2.1 Procédures expérimentales | 83 |
| 4.2.2 Résultats | 84 |
| | |
| CHAPITRE 5: DISCUSSION | 88 |
| 5.1 L'aspect fonctionnel de l'hétéro-dimérisation β_1AR/β_2AR | 89 |
| 5.1.1 La formation des hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR | 89 |
| 5.1.2 La voie MAPK et l'internalisation des récepteurs | 91 |
| 5.1.3 Le recrutement de la β -arrestine | 92 |
| 5.1.4 L'effet du ligand sur la dimérisation | 95 |
| 5.2 La quantification des interactions protéine-protéine dans un dimère | 96 |
| 5.2.1 Les courbes de saturation de BRET | 96 |
| 5.2.2 La proportion de dimères | 99 |
| 5.2.3 Les niveaux d'expression cellulaire des récepteurs dimériques | 100 |
| 5.3 Conclusion | 101 |
| | |
| CHAPITRE 6: BIBLIOGRAPHIE | 103 |

Liste des tableaux

| | | |
|---------------|--|----|
| Tableau I.I | Affinité des ligands pharmacologiques pour β_1 et β_2 AR | 8 |
| Tableau I.II | Alignement de séquence du motif de dimérisation de la Glycophorine A (GpA) avec plusieurs RCPG | 14 |
| Tableau III.I | BRET _{Max} and BRET ₅₀ of the corrected BRET saturation curves | 73 |

Liste des figures

| | | |
|------------|---|----|
| Figure 1.1 | Schéma de la voie classique de stimulation des RCPG | 3 |
| Figure 1.2 | Représentation schématique de l'arrangement topologique du récepteur β_1 -adrénergique | 5 |
| Figure 1.3 | Représentation schématique du BRET | 17 |
| Figure 2.1 | Immunodetection of co-immunoprecipitated β_1 AR/ β_2 AR | 39 |
| Figure 2.2 | Homo- and heterodimers exist in living cells | 41 |
| Figure 2.3 | Stimulation of adenylyl cyclase by β_1 AR, β_2 AR and β_1 AR/ β_2 AR | 43 |
| Figure 2.4 | Stimulation of ERK1/2 phosphorylation by β_1 AR, β_2 AR and β_1 AR/ β_2 AR | 45 |
| Figure 2.5 | Stimulation of ERK1/2 phosphorylation by stably transfected β_2 AR in absence and presence of transiently co-transfected β_1 AR | 46 |
| Figure 2.6 | Distribution and trafficking of β_1 AR or β_2 AR when expressed alone or as part of a putative heterodimer | 48 |
| Figure 2.7 | Colocalization of transiently co-transfected β_1 AR and β_2 AR-GFP in HEK 293 cells in response to agonist stimulation | 49 |
| Figure 2.8 | Quantification of β_2 AR internalization in absence and presence of co-transfected β_1 AR | 49 |
| Figure 3.1 | BRET saturation curves | 67 |
| Figure 3.2 | Linear relationship between total luminescence or total fluorescence and receptor density | 69 |
| Figure 3.3 | Corrected BRET saturation curves | 71 |
| Figure 3.4 | Effect of receptor expression levels on BRET determined at ~ equimolar [donor]/ [acceptor] ratios | 75 |
| Figure 3.5 | Schematic representation of the estimated percentage of β_2 AR dimers in living cells | 76 |
| Figure 4.1 | Fractionnement cellulaire par gradient discontinu de sucrose | 82 |
| Figure 4.2 | Recrutement de la β -arrestine par β_1 et β_2 AR | 85 |

Liste des sigles et abréviations

| | |
|---------------------|---|
| β AR | Récepteur β -adrénergique |
| BRET | Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence |
| δ -OR | Récepteur δ -opioïde |
| EGF | Epidermal growth factor |
| ERK | Extracellular regulated kinase |
| FRET | Transfert d'énergie de résonance de fluorescence |
| GABA _B R | Récepteur métabotrope GABA |
| GFP | Protéine verte fluorescente (Green Fluorescent Protein) |
| GH | Growth hormone |
| GnRH | Gonadotropin-releasing hormone |
| GpA | Glycophorine A |
| GRK | G-protein receptor kinase |
| JNK | c-Jun amino-terminal kinase |
| κ -OR | Récepteur κ -opioïde |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MTR | Récepteur mélatonine |
| PKA | Protéine kinase A |
| RCPG | Récepteur Couplé aux Protéine G |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| Rluc | <i>Renilla</i> luciférase |
| SDS | Sodium dodécyl sulfate |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| TM | Domaine transmembranaire |
| TRH | Thyrotropin-releasing hormone |
| V2R | Récepteur V2 de la vasopressine |

Les remerciements

Mes travaux de maîtrise et la rédaction de ce mémoire n'auraient pu être possible sans les encouragements soutenus de nombreuses personnes. Je tiens principalement à remercier ma mère Monique, mon père Gérard et ma sœur Stéphanie pour leur présence constante à mes côtés au cours de toutes ces années. Un gros merci à mon directeur de maîtrise, Dr Michel Bouvier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son dévouement à bâtir le meilleur environnement possible pour notre épanouissement personnel et scientifique.

Je tiens également à saluer l'amitié et la grande générosité de tous les membres du laboratoire Bouvier, anciens et actuels. Je désire particulièrement remercier mon collègue Ali Salahpour avec qui j'ai passé de très agréables moments au cours des dernières années à réaliser de nombreuses expériences de laboratoire.

Finalement, ces travaux de maîtrise ont été facilités par le soutien financier du Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA) de l'Université de Montréal et du Fonds de Formation Chercheurs et Aide Recherche/ Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FCAR-FRSQ).

Chapitre 1: Introduction

1.1 Les Récepteurs Couplés aux Protéines G

Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires et l'une des plus importantes familles de gènes du génome humain. Chez l'homme, on estime que plusieurs centaines de récepteurs différents génèrent une réponse cellulaire à une très grande variété de signaux extracellulaires, tels les amines, les acides aminés, les peptides, les lipides, les ions, les substances odorantes et les photons. Cette grande variété de signaux extracellulaires permet l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire qui passent généralement via une protéine G hétérotrimérique liant le GTP (figure 1.1). Le couplage de ces protéines G à divers effecteurs module positivement ou négativement leur activité. C'est le cas notamment de l'adénylate cyclase (activation ou inhibition), des phospholipases C et A₂ (activation) ainsi que de plusieurs canaux ioniques (ouverture ou fermeture) (Parmentier *et al.*, 1995).

Les RCPG partagent tous une structure similaire. Ils possèdent sept domaines transmembranaires en hélices α qui sont reliées par trois courtes boucles extracellulaires ainsi que trois boucles intracellulaires, qui, en particulier la troisième boucle intracellulaire, peuvent varier significativement en longueur. Le domaine N-terminal, souvent glycosylé, est extracellulaire tandis que le domaine C-terminal est intracellulaire (Bockaert and Pin, 1999). Cette structure prend la forme d'un baril transmembranaire sur lequel la protéine G hétérotrimérique peut venir se coupler. En se basant sur leur similarité de séquences, les RCPG peuvent être classés en trois grandes familles (Gether, 2000). La famille A, correspondant à la famille des récepteurs de type rhodopsine, est la plus grande des trois et est caractérisée par la présence d'environ 20 acides aminés hautement conservés qui sont localisés principalement dans les domaines transmembranaires (TM). La famille B, correspondant à la famille des récepteurs de type sécrétine/glucagon, est caractérisée par la présence d'un domaine N-terminal très imposant qui contient 6 cystéines très conservées en plus des 20 acides aminés hautement conservés dans les TM (Laburthe *et al.*, 1996). La famille C, quant à elle, correspond à la famille des récepteurs métabotropiques de neurotransmetteurs et de senseurs de Ca²⁺. Elle est caractérisée par la présence des 20 résidus hautement conservés dans les TM et

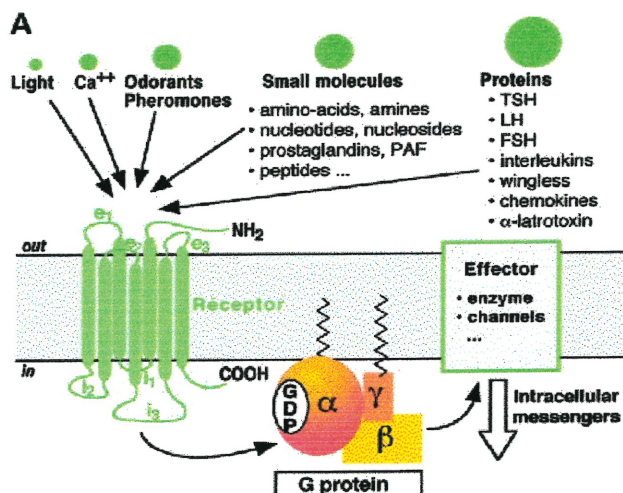


Figure 1.1: Représentation schématique de la voie classique de stimulation des RCPG et de la production de messagers intracellulaires résultant de leur activation.

d'un très long domaine N-terminal extracellulaire qui contient environ 20 cystéines (Brown *et al.*, 1996).

Auparavant, il était généralement accepté que le complexe récepteur-protéine G-effecteur fût constitué dans un ratio de 1:1:1. Cependant, au cours des huit dernières années, un nombre croissant d'études a suggéré que les RCPG pouvaient former des complexes oligomériques, appelés dimères pour le plus petit oligomère pouvant exister. Dans la famille des récepteurs β -adrénergiques, il avait été démontré auparavant que le récepteur β_2 -adrénergique pouvait former des homo-dimères. Ce projet de maîtrise a pour objectif premier d'évaluer l'existence d'hétéro-dimères entre les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques. Dans cette introduction, nous présenterons d'abord les acteurs principaux dans cette dimérisation, soit les deux sous-types de récepteurs β -adrénergiques, puis nous synthétiserons la littérature sur la dimérisation des RCPG.

1.2 Les récepteurs β -adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques font partie de la famille A des RCPG. Ils forment les sites membranaires par lesquels la noradrénaline et l'adrénaline agissent en tant

qu'importants neurotransmetteurs pour le système nerveux périphérique et central. Cette sous-famille de récepteurs est une cible importante pour de nombreuses drogues thérapeutiques, dont celles prescrites pour les maladies cardiovasculaires, l'asthme, la congestion nasale, l'obésité et la douleur (Guimaraes and Moura, 2001).

Au milieu du vingtième siècle, Alquist a été le premier à diviser les récepteurs adrénérgiques en deux types, α et β . Au cours des années suivantes, plusieurs sous-types de récepteurs α et β -adrénérgiques ont été découverts. Actuellement, neuf sous-types différents ont été clonés et caractérisés pharmacologiquement (Alexanders and Peters, 1999). Il s'agit des récepteurs α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 et β_3 -adrénérgiques.

Dans le groupe des récepteurs β -adrénérgiques (β AR), trois sous-types ont été clonés chez l'humain: β_1 AR, β_2 AR, β_3 AR. β_1 AR et β_2 AR possèdent entre eux une identité de séquence de l'ordre de 54%, tandis que le β_3 AR présente une identité de 50,7% et 45,5% avec β_1 AR et β_2 AR respectivement (Frielle *et al.*, 1987; Emorine *et al.*, 1989). De plus, plusieurs acides aminés sont conservés chez ces trois protéines (Dohlman *et al.*, 1987). La figure 1.2 présente l'arrangement topologique du β_1 AR sur lequel sont indiqués les acides aminés conservés entre β_1 et β_2 AR.

Depuis le clonage du β_3 AR, plusieurs études ont suggéré qu'il existait un quatrième sous-type de récepteur β -adrénérgique, nommé β_4 AR atypique. Cette suggestion est venue du fait que certaines propriétés pharmacologiques de récepteurs β -adrénérgiques exprimés dans certains tissus ne pouvaient être expliquées par les profils pharmacologiques des trois autres sous-types β AR qui avaient été très bien caractérisés pharmacologiquement. Ce récepteur n'a cependant jamais été purifié ou cloné.

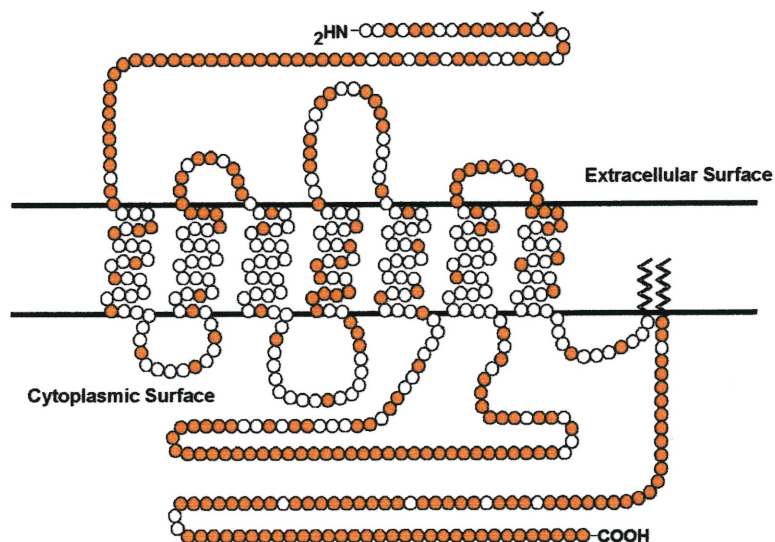


Figure 1.2: Séquence primaire et représentation schématique de l'arrangement topologique du récepteur β_1 -adrénergique. Les résidus conservés entre β_1 et β_2 AR sont représentés en blanc.

Les trois sous-types β AR ayant été clonés partagent un mécanisme et une voie d'activation similaire. À la suite de la liaison d'un agoniste, des domaines spécifiques des récepteurs (des portions de la troisième boucle intracellulaire et de la queue C-terminale) interagissent avec la protéine G hétérotrimérique de type Gs. Cette interaction catalyse l'échange du GDP pour du GTP sur la sous-unité $G\alpha_s$ de la protéine G, entraînant ainsi la dissociation de l'hétérotrimère en sous-unités actives $G\alpha_s$ et $G\beta\gamma$. Ces sous-unités activées régulent par la suite l'activité d'effecteurs, tels l'adénylate cyclase et les canaux ioniques. L'hydrolyse du GTP en GDP par une activité GTPase intrinsèque à la sous-unité $G\alpha$ désactive finalement cette sous-unité, conduisant à la réassociation de l'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$.

1.2.1 Les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques: similarités et différences

Les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques ont été très bien étudiés au cours des années. Ces deux récepteurs présentent de nombreuses similitudes et différences, que ce soit dans leur reconnaissance des ligands ou dans leur mécanisme d'activation de voies intracellulaires et de régulation du signal. Dans cette section,

nous décrivons brièvement les principales similitudes et différences entre ces deux sous-types.

Le β_1 AR est une protéine de 477 acides aminés dont la séquence codante est localisée sur le chromosome 10 (Frielle *et al.*, 1987). Bien qu'exprimé dans de nombreux tissus, la distribution sub-tissulaire du β_1 AR a été la mieux caractérisée dans le cœur. Ce récepteur est retrouvé dans toutes les parties du cœur et représente de 75 à 85% des β AR exprimés dans le cœur humain (Brodde, 1991; Bristow *et al.*, 1990). Lorsque le β_1 AR cardiaque est stimulé, il entraîne une augmentation de l'automatisme, de la chronotropie, de l'inotropie et de l'excitabilité du muscle cardiaque (Kaumann *et al.*, 1989; Bristow *et al.*, 1990).

Quant à lui, le β_2 AR est composé de 413 acides aminés et sa séquence codante est localisée sur le chromosome 5 (Kobilka *et al.*, 1987). Comme pour le β_1 AR, le β_2 AR est exprimé dans plusieurs tissus mais a été mieux caractérisé au niveau cardiaque. Ce récepteur est exprimé principalement dans des cellules autres que des cardiomyocytes, telles les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Il est également exprimé dans les ventricules et les oreillettes du cœur, où il est impliqué dans le système de contraction du myocarde et dans la réponse inotropique positive cardiaque. Il est également localisé dans les régions de conduction et de stimulation cardiaque, où il joue un rôle important dans le contrôle de la fréquence et du rythme cardiaque (Bristow *et al.*, 1986; Summers *et al.*, 1989).

Il n'y a jamais eu de démonstration *in vivo* directe de la co-expression de ces deux sous-types dans une même cellule. Cependant, la présence du β_1 et β_2 AR dans les mêmes types cellulaires a été prise comme évidence de leur co-expression dans les cellules transitionnelles et mi-nodales du nœud atrio-ventriculaire, les fibres nerveuses des systèmes de conduction ventriculaire et atrio-ventriculaire ainsi que dans les cellules de muscle lisse et vasculaire du rein (Petrecca and Shrier, 1998; Boivin *et al.*, 2001).

Depuis le milieu du siècle dernier, β_1 et β_2 AR ont été très bien caractérisés pharmacologiquement. Ces deux sous-types ont été caractérisés initialement par

leur capacité à reconnaître et être activés par deux ligands endogènes: l'adrénaline provenant des surrénales et circulant dans le sang et la noradrénaline libérée par les terminaisons nerveuses du système nerveux sympathique. Ces deux ligands sont des agonistes pour β_1 et β_2 AR. Pour le β_1 AR, l'adrénaline et la noradrénaline ont toutes deux une affinité équivalente pour le récepteur tandis que l'adrénaline a une meilleure affinité que la noradrénaline pour le β_2 AR. Au cours des années, de nombreuses molécules ont été synthétisées afin d'activer ou inactiver sélectivement ou non ces récepteurs. C'est le cas notamment de l'isoproterenol. Cette molécule est un agoniste non-sélectif qui possède une aussi bonne affinité pour le β_1 AR que pour le β_2 AR. L'affinité de l'isoproterenol est également meilleure pour ces deux sous-types que les deux agonistes endogènes adrénaline et noradrénaline. Certains agonistes sélectifs ont également été générés. Mentionnons notamment le xamoterol et le procaterol qui sont sélectifs respectivement pour le β_1 et le β_2 AR. Certains ligands permettent également de bloquer l'activation de ces récepteurs: ce sont des antagonistes. Pour le β_1 AR, le betaxolol est considéré comme antagoniste sélectif, tandis que le ICI 118,551 est un antagoniste sélectif pour le β_2 AR. L'alprenolol, le cyanopindolol et le propranolol sont trois antagonistes ayant des affinités similaires pour les deux récepteurs. Le tableau I.1 présente, pour les sous-types β_1 et β_2 AR, l'affinité des ligands qui seront utilisés dans les différentes études présentées dans ce mémoire.

Nous avons précédemment mentionné que les sept domaines transmembranaires des RCPG prenaient une structure de baril qui était maintenue par un réseau d'interactions intramoléculaires. De nombreuses études ont permis de démontrer que les ligands pour β_1 et β_2 AR s'inséraient à l'intérieur de ce baril et que certains liens se formaient entre les ligands et des acides aminés des domaines transmembranaires (TM) du récepteur. Des études de mutagenèse ont permis de démontrer que la sélectivité des agonistes pour les sous-types β_1 et β_2 AR était déterminée par des acides aminés du domaine transmembranaire IV, tandis que la sélectivité des antagonistes pour ces deux mêmes récepteurs était définie par des résidus des TM VI et VII (Frielle *et al.*, 1988).

| Ligand | β_1 AR Agoniste K_i (nM) | β_2 AR |
|---|--|--------------------|
| <i>Non-sélectif</i> Isoproterenol | 14 | 21 |
| <i>Sélectif</i> Xamoterol Procaterol | 135 4100 | 4533 41 |
| <u>Antagoniste</u> K_i (nM) | | |
| <i>Non-sélectif</i> Propranolol Alprenolol Cyanopindolol | 6.3 8.8 0.01 | 0.7 1.5 0.01 |
| <i>Sélectif</i> Betaxolol ICI-118,551 | 3 710 | 610 4.6 |

Tableau I.I: Affinité des ligands pharmacologiques pour β_1 et β_2 AR. Les valeurs indiquées correspondent à la constante de dissociation à l'équilibre (K_i) pour l'inhibition de la liaison du radioligand sur le récepteur β -adrénergique.

Il y a quelques années, plusieurs études ont démontré qu'il existait une différence entre β_1 et β_2 AR dans leur efficacité de couplage à la protéine G (Green *et al.*, 1992; Rousseau *et al.*, 1996). Bien que β_1 et β_2 AR se couplent de façon préférentielle à la protéine G de type Gs, plusieurs études ont suggéré que l'efficacité de couplage varie entre les deux récepteurs. En effet, le β_2 AR se couple plus fortement à Gs que le β_1 AR (Levy *et al.*, 1993). De plus, alors que le β_1 AR interagit seulement avec Gs (stimulatrice) (Barr *et al.*, 1997), il a été démontré que le β_2 AR pouvait se coupler à Gs et Gi (inhibitrice) (Okamoto *et al.*, 1991; Daaka *et al.*, 1997). La troisième boucle intracellulaire du β AR serait en partie responsable de la différence de couplage entre ces deux sous-types. Il est intéressant de noter que cette région est considérablement plus longue chez le β_1 AR que chez le β_2 AR. De plus, la présence d'une séquence riche en proline dans la troisième boucle intracellulaire du β_1 AR serait engagée comme modulateur négatif dans son couplage avec Gs (Green and Liggett, 1994). Plus récemment, un polymorphisme dans la

queue C-terminale du β_1 AR a été découvert et consiste en la présence d'une arginine à la position 389 du récepteur au lieu d'une glycine. Il a été démontré que ce simple changement d'un seul acide aminé permet un meilleur couplage du β_1 AR à Gs, augmentant ainsi de deux fois l'activité maximale de l'adénylate cyclase par rapport au β_1 AR ayant une glycine en position 389 (Mason *et al.*, 1999). Toutefois, aucune étude comparative n'a encore été faite entre l'efficacité de couplage du β_2 AR et ce polymorphisme chez le β_1 AR.

En plus de l'activation de divers mécanismes de transduction du signal, la stimulation des RCPG induit une série de moyens permettant de réguler négativement leur propre signalisation. Un de ces mécanismes de désensibilisation est appelé la régulation négative (downregulation) et survient plusieurs heures après la stimulation. Ce mécanisme permet ainsi de réduire le nombre de récepteurs dans la cellule à la suite d'une diminution de leur synthèse ou d'une augmentation de leur dégradation et de celle de leur ARNm (Lefkowitz, 1998; Pitcher *et al.*, 1998).

De plus, d'autres mécanismes de désensibilisation, plus rapide ceux-là, surviennent dans les secondes et les minutes suivant la stimulation. Ce rapide découplage des RCPG est la conséquence de la phosphorylation des récepteurs médiée par diverses kinases. Notamment, les β_1 et β_2 AR peuvent tous deux être phosphorylés par la protéine kinase A (PKA) et certaines kinases de la famille des RCPG (G-protein receptor kinases; GRK). Les β AR phosphorylés interagissent ensuite avec la protéine cytosolique β -arrestine. Cette association entre le récepteur et la β -arrestine bloque l'interaction du récepteur avec la protéine Gs et la stimulation subséquente de l'adénylate cyclase. Les sites de phosphorylation ont été identifiés chez le β_2 AR et localisés dans sa troisième boucle intracellulaire et sa queue C-terminale (Clark *et al.*, 1989; Bouvier *et al.*, 1989). De plus, les patrons de désensibilisation du β_1 et β_2 AR ont été comparés et il a été observé que la désensibilisation induite par un agoniste pour le β_1 AR était environ deux fois inférieure à celle du β_2 AR (Rousseau *et al.*, 1996). Cette différence a été attribuée à la présence d'un site de phosphorylation par la PKA localisé dans la queue C-terminale du β_2 AR et qui est absent chez le β_1 AR. Cette observation voulant que le

β_1 AR était plus résistant à la désensibilisation que le β_2 AR avait également été décrite précédemment (Freedman *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995).

La phosphorylation des β AR est accompagnée d'une rapide séquestration/internalisation de ceux-ci à l'intérieur de vésicules de densité légère tels les caveolae ou les vésicules enrobés de clathrine (Von Zastrow *et al.*, 1993; Muntz *et al.*, 1994). Des études ont suggéré que la β -arrestine était également impliquée dans l'internalisation des β AR à l'intérieur de puits tapissés de clathrine (Ferguson *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 2000). En effet, il a été démontré que la β -arrestine agit comme adaptateur entre le récepteur et la clathrine en plus d'interagir avec la protéine AP2, un adaptateur de clathrine (Laporte *et al.*, 1999). De plus, des études démontrant que la β -arrestine interagissait moins fortement avec β_1 AR qu'avec β_2 AR permet d'expliquer la différence dans le profil d'internalisation entre β_1 et β_2 AR (Shiina *et al.*, 2000). En effet, il y a quelques années, la rapide séquestration des β_1 et β_2 AR a été comparée et il a été observé que, à la suite d'une exposition de 15 minutes à l'isoproterenol, plus de 40% des β_2 AR étaient internalisés tandis que moins de 10% des β_1 AR l'étaient (Suzuki *et al.*, 1992). Dans cette même étude, il a aussi été observé que le patron de régulation négative du β_1 AR était plus lent que celui du β_2 AR. Toutes ces observations suggèrent ainsi que le β_1 AR est moins propice à la désensibilisation que le β_2 AR.

Cette section a présenté les mécanismes de signalisation et de régulation de β_1 et β_2 AR dans des modèles où ils étaient étudiés séparément. Toutefois, il a été récemment démontré clairement que certains RCPG pouvaient fonctionner sous forme d'homo et d'hétéro-dimères. Compte tenu des différences mentionnées précédemment entre β_1 et β_2 AR, l'existence d'hétéro-dimères entre ces deux récepteurs pourrait avoir des conséquences importantes sur la signalisation β -adrénergique.

1.3 L'histoire de la dimérisation des RCPG

Chez certaines familles de récepteurs transmembranaires, il a été clairement démontré depuis longtemps que leur dimérisation était importante pour leur

activation. C'est notamment le cas des récepteurs de facteurs de croissance et de cytokines, tels les récepteurs de facteurs de croissance épidermale (EGF), de l'interféron- γ et de l'hormone de croissance (GH) (Heldin, 1995). Par contre, pour la famille des RCPG, il était généralement accepté jusqu'à récemment qu'un récepteur monomérique interagissait allostériquement avec une seule protéine G hétérotrimérique. Cependant, à partir du milieu des années 1970, des observations provenant d'expériences de radio-liaison, de crosslinking, de marquage par photo-affinité et d'inactivation par irradiation sur des RCPG envisageaient la possibilité que ceux-ci pouvaient fonctionner sous forme de dimères (pour une revue, voir (Salahpour *et al.*, 2000)). Malgré ces observations, la notion voulant que les RCPG puissent former des dimères n'avait pas réussi à gagner l'acceptation générale.

1.3.1 La co-immunoprécipitation

Ce n'est que depuis le milieu des années 1990 qu'a ressurgi la notion de la dimérisation des RCPG grâce à de nouvelles études biochimiques. Au cours des dernières années, la co-immunoprécipitation de récepteurs portants des épitopes différents a été l'une des approches biochimiques les plus utilisées pour étudier la dimérisation des RCPG. Dans la première étude sur les RCPG utilisant cette approche, Hébert *et al.* ont utilisé deux β_2 AR différents portant soit un épitope Hémagglutinine (HA) ou c-Myc. Après co-expression des deux récepteurs (HA- β_2 AR et Myc- β_2 AR) et solubilisation des cellules, ils ont détecté la présence du HA- β_2 AR après que le Myc- β_2 AR ait été immunoprécipité par un anticorps anti-c-Myc (Hebert *et al.*, 1996). La détection de cette immunoréactivité HA permet ainsi de suggérer des interactions intermoléculaires entre deux β_2 AR. La sélectivité de cette interaction a été contrôlée en utilisant un RCPG d'une autre sous-classe, le récepteur Myc-M2-muscarinique, qui n'a pu être co-immunoprécipité avec le HA- β_2 AR. Cette étude de co-immunoprécipitation a par la suite été adaptée pour démontrer l'homo-dimérisation de plusieurs autres RCPG, dont les récepteurs dopaminergiques (Ng *et al.*, 1996), mGluR5 (Romano *et al.*, 1996), δ -opioïdes (Cvejic and Devi, 1997), au calcium (Bai *et al.*, 1998) et M3 muscariniques (Zeng and Wess, 1999). Plus récemment, la co-immunoprécipitation a également été utilisée pour démontrer l'existence d'hétéro-dimères entre différents sous-types de

récepteurs, tels les récepteurs GABA_BR1 et GABA_BR2 (White *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998), δ et κ -opioïdes (Jordan and Devi, 1999), δ et μ -opioïdes (Gomes *et al.*, 2000; George *et al.*, 2000), ainsi que SST3 et SST2a somatostatine (Pfeiffer *et al.*, 2001). De plus, l'hétéro-dimérisation de RCPG de différentes sous-classes a également été observée entre les récepteurs adénosine A1 et dopamine D1 (Gines *et al.*, 2000), angiotensine AT1 et bradykinine B2 (AbdAlla *et al.*, 2000) et entre δ -opioïde et β_2 -adrénergique (Jordan *et al.*, 2001). Ces nombreuses études ont ainsi permis de suggérer que les RCPG pouvaient exister sous forme homo ou hétéro-dimériques.

La co-immunoprécipitation est une méthode très utilisée pour étudier des interactions protéine-protéine. Cependant, elle comporte un inconvénient important lorsqu'il s'agit de co-immunoprécipiter des protéines très hydrophobes, tels les RCPG, puisqu'elle requiert la solubilisation de ces protéines à l'aide de détergents, pouvant conduire à une agrégation artéfactuelle à la suite d'une solubilisation incomplète. Dans le but de vérifier que les résultats de dimérisation obtenus par co-immunoprécipitation n'étaient pas dus à une agrégation artéfactuelle, deux types d'approches ont été utilisés. Premièrement, en traitant les cellules avec un agent de réticulation hydrophile (crosslinking) avant leur lyse et solubilisation, il a été démontré que la formation des dimères était stabilisée, suggérant ainsi que ces récepteurs dimériques étaient présents à la surface cellulaire. Ensuite, aucune co-immunoprécipitation de récepteurs ayant des épitopes différents ne pouvait être réalisée en mélangeant et solubilisant des membranes de cellules exprimant chaque récepteur individuellement, suggérant ainsi que les dimères observés ne se formaient pas à la suite de la solubilisation des protéines (Hebert *et al.*, 1996; Cvejic and Devi, 1997).

1.3.2 Stabilité des dimères

Les dimères formés par plusieurs RCPG ont la propriété de résister à la dénaturation en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS). En effet, à la suite d'une séparation électrophorétique des récepteurs sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes incluant du SDS, le poids moléculaire observé de ces

récepteurs, tels les récepteurs GABA_BR1 et GABA_BR2 (White *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998), δ et κ -opioïdes (Jordan and Devi, 1999), δ et μ -opioïdes (Gomes *et al.*, 2000; George *et al.*, 2000), ainsi que SST3 et SST2a somatostatine (Pfeiffer *et al.*, 2001). De plus, l'hétéro-dimérisation de RCPG de différentes sous-classes a également été observée entre les récepteurs adénosine A1 et dopamine D1 (Gines *et al.*, 2000), angiotensine AT1 et bradykinine B2 (AbdAlla *et al.*, 2000) et entre δ -opioïde et β_2 -adrénergique (Jordan *et al.*, 2001). Ces nombreuses études ont ainsi permis de suggérer que les RCPG pouvaient exister sous forme homo ou hétéro-dimérique.

La co-immunoprécipitation est une méthode très utilisée pour étudier des interactions protéine-protéine. Cependant, elle comporte un inconvénient important lorsqu'il s'agit de co-immunoprécipiter des protéines très hydrophobes, tels les RCPG, puisqu'elle requiert la solubilisation de ces protéines à l'aide de détergents, pouvant conduire à une agrégation artéfactuelle à la suite d'une solubilisation incomplète. Dans le but de vérifier que les résultats de dimérisation obtenus par co-immunoprécipitation n'étaient pas dus à une agrégation artéfactuelle, deux types d'approches ont été utilisés. Premièrement, en traitant les cellules avec un agent de réticulation hydrophile (crosslinking) avant leur lyse et solubilisation, il a été démontré que la formation des dimères était stabilisée, suggérant ainsi que ces récepteurs dimériques étaient présents à la surface cellulaire. Ensuite, aucune co-immunoprécipitation de récepteurs ayant des épitopes différents ne pouvait être réalisée en mélangeant et solubilisant des membranes de cellules exprimant chaque récepteur individuellement, suggérant ainsi que les dimères observés ne se formaient pas à la suite de la solubilisation des protéines (Hebert *et al.*, 1996; Cvejic and Devi, 1997).

1.3.2 Stabilité des dimères

Les dimères formés par plusieurs RCPG ont la propriété de résister à la dénaturation en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS). En effet, à la suite d'une séparation électrophorétique des récepteurs sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes incluant du SDS, le poids moléculaire observé de ces

récepteurs correspond approximativement au double de celui attendu pour le récepteur monomérique. Cette résistance des dimères au SDS n'est pas unique aux RCPG, car elle a également été observée pour plusieurs autres protéines qui forment des interactions intermoléculaires hydrophobes, telle la protéine transmembranaire Glycophorine A (GpA) (Furthmayr and Marchesi, 1976).

Chez la GpA, il a été démontré que certains résidus localisés dans son seul domaine transmembranaire étaient essentiels pour la formation de dimères (Lemmon *et al.*, 1994; Bormann *et al.*, 1989; Lemmon *et al.*, 1992a; Lemmon *et al.*, 1992b). En se basant sur l'importance relative de certains résidus transmembranaires, l'existence d'un motif de dimérisation (⁷⁵LIXXGVXXG⁸³VXXT) a été proposé pour cette protéine (Lemmon *et al.*, 1992b). Il est intéressant de noter que les résidus Glycine et Leucine importants pour cette dimérisation sont espacés de trois acides aminés, suggérant ainsi qu'ils sont tous localisés sur la même face de l'hélice α formée par le domaine transmembranaire.

Le β_2 AR possède une séquence d'acides aminés ayant une grande homologie avec le motif de dimérisation de la GpA. En effet, les résidus Glycine et Leucine de la séquence ¹⁷²LKTLGIIMGTFTL, localisée à l'extrémité cytoplasmique du sixième domaine transmembranaire (TM VI) du β_2 AR, sont également espacés entre eux par trois acides aminés. Dans une étude, Hébert *et al.* ont suggéré que ce motif pouvait être important pour la dimérisation du β_2 AR (Hebert *et al.*, 1996). En utilisant un peptide synthétique correspondant à la séquence d'acides aminés du TM VI du β_2 AR, ils ont réussi à bloquer la dimérisation et l'activation de ce dernier. D'autres études ont également utilisé des peptides synthétiques pour étudier la dimérisation et l'activation de RCPG (Ng *et al.*, 1996; Tarasova *et al.*, 1999). Les résultats de ces différentes études suggèrent donc que des interactions hydrophobes entre des domaines transmembranaires peuvent être impliqués dans la dimérisation des récepteurs.

Il est intéressant de noter que ce motif de dimérisation observé dans la GpA et le β_2 AR est conservé totalement ou en partie chez un grand nombre de RCPG (tableau I.II). Il est notamment très bien conservé dans le sixième domaine transmembranaire de tous les sous-types β -adrénergiques. Ce motif pourrait donc

| | |
|---------------|---------------------------------|
| GpA | IGYSILLITGIVGAMVGFILTI |
| β_1 AR | SRLVALREQKALKTLGIIMGFILTI |
| β_2 AR | SSKFCLKEHKALKTLGIIMGTFTLCWLPFF |
| β_3 AR | ARLLPLREHRALCTLGLIMGTFTLCWLPFF |
| 5HT1A | RKMALARERKTVKTLGIIMGTFTLCWLPFF |
| 5HT1B | KKLMAARERKATKTLGIILGAFIVCWLPFF |
| 5HT1D | KRISAARERKATKILGIILGAFIICWLPFF |
| 5HT1E | QQISSTRERKAARILGLILGAFILSWLPFF |
| 5HT1F | QKISGTRERKAATTLGLILGAFVICWLPFF |
| 5HT2A | TMQISISNEQKACKVLGIVFFLFVVMWCPFF |
| 5HT2B | SVQTIISNEQRASKVLGIVFFLFLLMWCPFF |
| 5HT2C | TMQAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFF |
| 5HT5 | QKEQRAALMVGILIGVFVLCWIPFF |
| 5HT5Brat | QKEKRAAMMVGILIGVFVLCWIPFF |
| 5HT6rat | KHSRKALKASLTLGILLGMFFVTWLPFF |
| 5HT7 | KREQKAATTLGIIIVGAFTVCWLPFF |
| α_1 A | RLLKFSREKKAAKTLAIVVGVFVLCWFPPF |
| α_1 B | KLKFSREKKAAKTLGIVVGMFILCWLPFF |
| α_1 C | RLLKFSREKKAAKTLGIVVGVFVLCWLPFF |
| α_2 A | GAGGQNREKRFTFVLA VVIGVFVVCWFPPF |
| α_2 B | RAHV TREKRFTFVLA VVIGVFVLCWFPPF |
| α_2 C1 | VAQAREKRFTFVLA VVMGVFVLCWFPPF |
| α_2 C2 | VAQAREKRFTFVLA VVMGVFVLCWFPPF |
| D1A | FKMSFKRETKVLKTL SVIMGVFVCCWLPFF |
| D2 | QQKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFF |
| D3 | PLREKKATQMV AIVL GAFIVCWLPFF |
| D4 | RERKAMRVLPVVVGAFLLCWTPFF |
| D5 | LRASIKKETKVLKTL SVIMGVFVCCWLPFF |
| A1 | PQKYYGKELKIAKSLALILFLFALSWLPLH |
| A2a | ARSTLQKEVHAAKSLAIIIVGLFALCWLPFH |
| A2b | SRTTLQREIHAAKSLAMIVGIFALCWLPVH |
| A3 | TGAFYGREFKTAKSLFLVLFLEFALSWLPLS |
| V1A | VKSISRAKIRTVKMTFVIVTAYIVCWAPFF |
| V1B | INTISRAKIRTVKMTFVIVLAYIACWAPFF |
| V2 | GAHVSAAVAKTVRMTLVIVVVVYVLCWAPFF |
| δ -OP | KEKDRSLRRITRMVLVVVGAFVVCWAPIH |
| κ -OP | REKDRNLRRITRLVLVVVAVFVVCWTPIH |
| μ -OP | KEKDRNLRRITRMVLVVVAVFIVCWTPIH |
| OPRX | REKDRNLRRITRLVLVVVAVFVGCWTPVQ |

Tableau I.II: Alignement de séquence du motif de dimérisation GXXXGXXXL de la Glycophorine A (GpA) avec plusieurs RCPG.

être théoriquement impliqué dans la dimérisation de tous ces RCPG. Par contre, d'autres études ont démontré qu'il pouvait exister différents déterminants moléculaires pour la dimérisation des RCPG. La formation de ponts disulfures et l'interaction entre des domaines en enroulement d'hélices (coiled-coil) en sont des exemples (pour une revue, voir (Bouvier, 2001)). Il serait donc possible que plus d'un déterminant moléculaire soient impliqués dans la formation dimérique d'un RCPG.

1.3.3 La détection de dimères chez des cellules vivantes

Jusqu'à tout récemment, la co-immunoprécipitation constituait pratiquement la seule méthode permettant de démontrer l'existence de dimérisation entre différents RCPG. Cependant, comme nous l'avons expliqué précédemment, cette approche *in vitro* requiert la solubilisation des récepteurs, pouvant ainsi causer l'agrégation artificielle de ces protéines. Afin de contourner ces problèmes de solubilisation, divers groupes ont utilisé des méthodes biophysiques de transfert d'énergie récemment développées pour étudier la dimérisation des RCPG chez des cellules vivantes.

1.3.3.1 Les caractéristiques physiques des techniques de transfert d'énergie de résonance

Ces méthodes biophysiques de transfert d'énergie de résonance de lumière sont basées sur le transfert non-radiatif d'énergie entre les dipôles électromagnétiques d'un donneur d'énergie et ceux d'un accepteur d'énergie (Hovius *et al.*, 2000). Deux approches différentes ont été développées à partir de ce principe. Pour la technique de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET), le donneur est une molécule bioluminescente tandis que l'accepteur est une molécule fluorescente. Dans le cas du transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET), les donneurs et accepteurs d'énergie sont toutes deux des molécules fluorescentes. Ces molécules donneuses et accepteuses sont ainsi fusionnées à l'extrémité N- ou C-terminale de protéines d'intérêt, couplées à des

anticorps dirigées spécifiquement contre un domaine précis de la protéine étudiée ou couplées à des ligands se liant au récepteur étudié.

Deux éléments sont requis pour le bon fonctionnement de ces approches. Tout d'abord, il est important que les spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur se chevauchent pour permettre un bon transfert d'énergie entre les deux molécules. Ensuite, il est requis que le donneur et l'accepteur d'énergie soient situés très proches l'un de l'autre, préférentiellement à une distance inférieure à 100 Å, puisque l'efficacité du transfert d'énergie diminue à la puissance 6 avec la distance. La proximité moléculaire entre le donneur et l'accepteur d'énergie est donc un élément très important de ces approches et en font des techniques de choix pour détecter des interactions protéine-protéine chez des cellules vivantes sans la destruction de l'environnement naturel dans lequel elles surviennent.

Le transfert d'énergie du BRET est évalué en calculant un ratio entre l'énergie émise par la GFP et celle émise par la *Rluc*. Quant au FRET, la quantification du transfert d'énergie est déterminée par la fluorescence de l'accepteur ainsi que par le quenching de la fluorescence du donneur.

1.3.3.2 Le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)

Le BRET est un phénomène naturel qui se produit chez plusieurs organismes marins, tels la pensée de mer *Renilla Reniformis* et la méduse *Aequorea victoria*. Chez ces organismes, l'enzyme luciférase (luc) effectue la dégradation catalytique de son substrat, la coelenterazine, générant ainsi de la bioluminescence. Lorsque la luciférase se trouve sous forme dimérique avec une protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein; GFP), l'énergie de résonance sous forme de bioluminescence provenant de la luciférase est transférée à cette GFP. La GFP émet ainsi à son tour de la fluorescence à une longueur d'onde qui lui est caractéristique. L'efficacité du transfert d'énergie, qui dépend en partie de la distance entre la *Rluc* et la GFP, est déterminée en calculant le ratio entre la lumière émise par la GFP et celle émise par la luciférase.

Cette méthode a été initialement utilisée pour détecter des interactions entre des protéines du cycle circadien (Xu *et al.*, 1999). En fusionnant la *Renilla* luciférase (*Rluc*) et une variante de la GFP à l'extrémité N-terminale de la protéine circadienne

kaiB, Xu et al. ont démontré que, lorsque *Rluc*-kaiB et GFP-kaiB étaient co-exprimés, un transfert d'énergie survenait entre le donneur et l'accepteur, suggérant ainsi que kaiB formait un homo-dimère.

Notre laboratoire a ensuite utilisé cette approche pour étudier la dimérisation des RCPG. Pour cela, des protéines de fusion ont été générées dans lesquelles la GFP et la *Rluc* ont été liées génétiquement à l'extrémité C-terminale du β_2 AR (Figure 1.3) (Angers *et al.*, 2000). Après avoir co-exprimé les constructions β_2 AR-*Rluc* et β_2 AR-GFP dans un système d'expression hétérologue, un transfert d'énergie de résonance de bioluminescence a été détecté dans des conditions basales, suggérant que le récepteur formait un dimère constitutif. Il a également été observé que, lorsque le récepteur est stimulé par l'agoniste β -adrénergique isoproterenol, le niveau de BRET détecté augmente légèrement. Ceci permet de penser que l'activation du récepteur est associée soit une augmentation du nombre de dimères ou à un changement de conformation du récepteur permettant à la *Rluc* et la GFP de

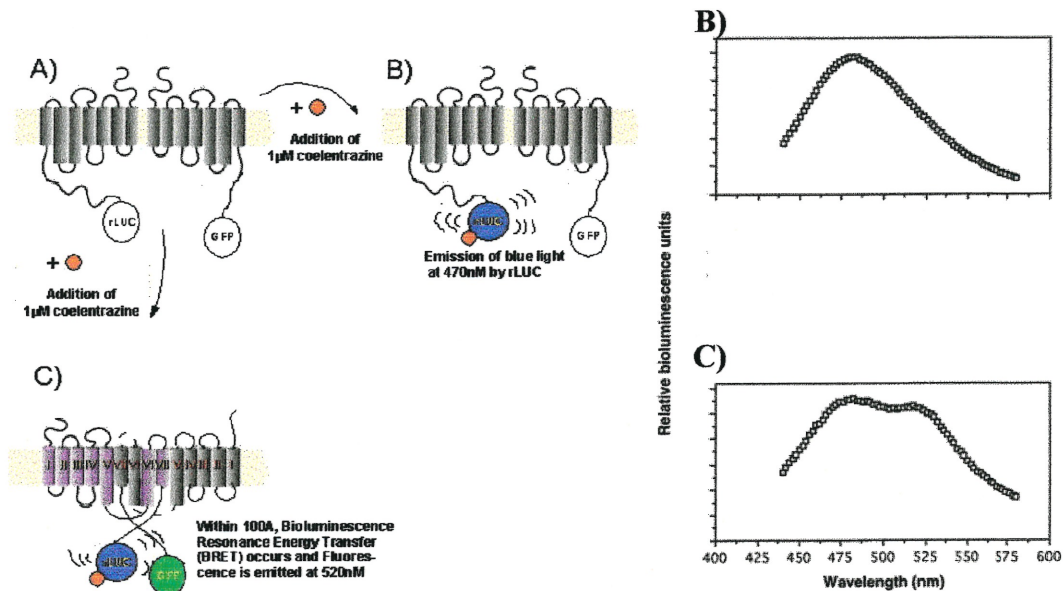


Figure 1.3: Représentation schématique du transfert d'énergie se produisant entre le donneur bioluminescent *Rluc* et l'accepteur fluorescent GFP dans le BRET. A) En absence du substrat du donneur, aucune énergie n'est émise. B) Aucun transfert d'énergie se produit entre le donneur et l'accepteur d'énergie si leur distance est supérieure à 100 Å. Un seul pic d'émission d'énergie est observable sur le spectre d'émission. C) Un transfert d'énergie se produit si la distance entre le donneur et l'accepteur d'énergie est inférieure à 100 Å. Dans ce cas, les pics d'émission du donneur et de l'accepteur sont détectables sur le spectre d'émission.

se rapprocher dans l'espace pour un meilleur transfert énergétique. Nous expliquerons plus loin que la deuxième hypothèse est la plus probable.

Depuis la première étude sur la dimérisation du β_2 AR utilisant l'approche du BRET, cette méthode a été utilisée pour démontrer que d'autres RCPG pouvaient aussi former des homo-dimères dans des cellules vivantes. Ceux-ci incluent les récepteurs δ -opioïdes (McVey *et al.*, 2001), du TRH (Kroeger *et al.*, 2001), de la cholecystokinine (Cheng and Miller, 2001) et de la mélatonine (Ayoub *et al.*, 2002). Dans tous ces cas, un signal constitutif de BRET a été détecté, suggérant que la formation de dimères chez ces RCPG n'est pas régulée par la présence de ligand. Tout comme pour le β_2 AR, la stimulation du récepteur TRH avec des agonistes a permis d'observer une augmentation du signal de BRET. Toutefois, une diminution du signal de BRET a été observée en traitant le récepteur cholecystokinine avec un agoniste, tandis qu'aucune modification du signal n'a été détectée pour l'homo-dimère δ -opioïde en présence de ligand. Dans le cas des homo et hétéro-dimères MT1R et MT2R, Ayoub *et al.* ont observé qu'un traitement avec des agonistes mélatoninergiques permettait une augmentation du signal de BRET détecté pour l'homo-dimère MT2R, mais pas pour l'homo-dimère MT1R. De plus, un traitement avec des agonistes, antagonistes et agonistes inverses permettait une augmentation du BRET pour l'hétéro-dimère MT1R-Rluc/MT2R-GFP, mais aucun effet de ligand n'était observable pour l'hétéro-dimère MT2R-Rluc/MT1R-GFP. Ces observations, comme nous en discuterons plus loin, semblent suggérer que l'augmentation du BRET observé à la suite d'un traitement avec un ligand ne serait due qu'à un changement de conformation du récepteur permettant un meilleur transfert d'énergie entre Rluc et GFP (Ayoub *et al.*, 2002).

Depuis la première utilisation du BRET et jusqu'à tout récemment, cette approche était essentiellement utilisée pour déterminer de façon qualitative si deux protéines d'intérêt pouvaient interagir entre elles. Toutefois, cette technologie permet de bien quantifier ces interactions. C'est dans cette perspective qu'Ayoub *et al.* ont suggéré que les homo-dimères MT1R et MT2R formaient véritablement un dimère et non un trimère ou un oligomère plus complexe (Ayoub *et al.*, 2002). En effet, par des expériences de compétition de BRET dans lesquelles ils ont titré les paires réceptorielles de BRET par un récepteur de la mélatonine non-fusionné à un

donneur ou accepteur d'énergie, ils ont démontré que, selon le modèle d'extinction du transfert d'énergie proposé par Veatch et Stryer (Veatch and Stryer, 1977), cette courbe de titration pouvait être le plus fidèlement modélisée en assumant un dimère. Ils ont également proposé, grâce à la quantification possible du BRET, qu'une très grande proportion des récepteurs formait des dimères.

Ces études ont toutes été réalisées en utilisant la variante jaune de la GFP (YFP). L'utilisation d'un substrat spécifique, la coelenterazine H, permettait à la *Rluc* d'exciter la YFP à une longueur d'onde de 470 nm. Cette dernière émettait ensuite de la lumière à une longueur d'onde de 530 nm. Le chevauchement des deux pics d'émission était très important et résultait en des niveaux de BRET relativement faibles. Une nouvelle génération de BRET a ensuite été développée. Cette nouvelle génération, appelée BRET², utilise un nouveau substrat, la DeepBlue coelenterazine, et une nouvelle variante de la GFP comportant trois acides aminés mutés par rapport à la GFP naturelle (P64L, S147P et S202P). Dans ce cas, la *Rluc* dégrade la coelenterazine en émettant une lumière à une longueur d'onde de 400 nm. La GFP ainsi excitée, émettra ensuite de la fluorescence à 510 nm. Le moins grand chevauchement des deux pics d'émission permet ainsi une meilleure résolution du signal et des niveaux de BRET plus élevés.

1.3.3.3 Le transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET)

Le FRET a également été utilisé pour l'étude de la dimérisation des RCPG. Dans ce cas, deux différentes variantes de la GFP sont fusionnées chacune à l'extrémité d'un RCPG. Ces variantes de GFP sont choisies afin que le spectre d'émission du donneur d'énergie chevauche le spectre d'excitation de l'accepteur. L'efficacité du FRET dépend donc du chevauchement des spectres ainsi que de l'orientation relative et de la distance entre le fluorophore donneur et le fluorophore accepteur. Contrairement au BRET, qui utilise un substrat bioluminescent, l'énergie initiale d'excitation du donneur de FRET est fournie par une source lumineuse correspondant à la longueur d'onde d'excitation du donneur (Overton and Blumer, 2000).

Il existe diverses variantes de la technique de FRET. En effet, en plus d'utiliser deux variantes de GFP, il est également possible de coupler des fluorophores sur

des anticorps ou des ligands qui reconnaissent spécifiquement les RCPG étudiés (Rocheville *et al.*, 2000b;Roess *et al.*, 2000). D'autres modifications au FRET ont également été utilisées pour étudier la dimérisation des RCPG, tels le « photo-bleaching FRET » et le « time-resolved FRET » (pour plus de renseignement, voir (Angers *et al.*, 2002)).

Par ces différentes approches de FRET, il a été démontré que certains RCPG pouvaient homo-dimériser. C'est notamment le cas pour les récepteurs des facteurs d'accouplement de la levure Ste2 (Overton and Blumer, 2000), du GnRH (Cornea *et al.*, 2001;Horvat *et al.*, 2001), du SSTR5 somatostatine (Rocheville *et al.*, 2000b), du δ -opioïde (McVey *et al.*, 2001) et du LH (Roess *et al.*, 2000). Le FRET a également été utilisé pour observer l'hétéro-dimérisation entre les récepteurs SSTR5 somatostatine et D2 dopaminergique (Rocheville *et al.*, 2000a).

1.3.4 La formation des dimères chez les RCPG

Pour plusieurs familles de récepteurs, tels les récepteurs tyrosine kinase et des cytokines, il a été bien démontré que leur homo ou hétéro-dimérisation est induite par un agoniste et que l'équilibre entre monomère et dimère est considéré comme faisant partie du processus d'activation du récepteur (Schlessinger, 2000;Weiss and Schlessinger, 1998). Cependant, pour les RCPG, les résultats présentés dans la section 1.3.3 ne permettent pas de conclure d'une manière générale que l'activation de cette famille de récepteurs conduise à leur dimérisation. En fait, plusieurs études suggèrent l'existence de dimères constitutifs. Selon les récepteurs considérés et les études, la formation de dimères a été suggérée comme étant 1) entièrement dépendante, 2) entièrement indépendante ou 3) partiellement dépendante de l'activation du récepteur. La détection dans plusieurs études de dimères constitutifs pose également la question du site de leur assemblage. À priori, deux sites peuvent être proposés : le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Des évidences récentes ont permis d'appuyer l'hypothèse selon laquelle les dimères pouvaient se former tôt dans leur biosynthèse, probablement dès le réticulum endoplasmique.

Certaines études ont effectivement suggéré que les RCPG s'assemblaient en dimères dans les compartiments intracellulaires (RE, appareil de Golgi) et étaient ensuite acheminés à la surface cellulaire sous forme dimérique. En fait, l'assemblage de sous-unités protéiques dans le RE est une stratégie de contrôle de qualité communément utilisée par la cellule pour permettre seulement l'exportation des complexes parfaitement repliés (Reddy and Corley, 1998). Un excellent exemple dans lequel la dimérisation de RCPG est requise pour obtenir un récepteur fonctionnel exprimé à la surface cellulaire est l'hétéro-dimère des récepteurs métabotropiques GABA (GABA_BR1/GABA_BR2). Lorsqu'il est exprimé seul, le récepteur GABA_BR1 est retenu dans le RE sous forme de protéine immature alors que GABA_BR2, qui est bien acheminé à la surface cellulaire, ne peut pas lier son ligand naturel, le GABA. Par contre, lorsque ces deux récepteurs sont co-exprimés dans la même cellule, ils rejoignent la membrane plasmique sous forme d'un complexe fonctionnel pouvant lier le GABA. Ceci laisse donc penser que la maturation de GABA_BR1 passe par son hétéro-dimérisation avec GABA_BR2 et que ce dernier servirait de chaperonne pour permettre l'expression de GABA_BR1 à la surface cellulaire (White *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; Kuner *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 2000). Cette hypothèse est supportée par la découverte d'un motif de rétention dans le RE (ER-retention motif) localisé dans la queue C-terminale de GABA_BR1 (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000). Le GABA_BR2 masquerait ce motif de rétention par une interaction entre les domaines en enroulement d'hélices (coiled-coil) C-terminaux de ces deux récepteurs et permettrait ainsi au GABA_BR1 d'être acheminé à la surface cellulaire.

D'autres études sur divers RCPG suggèrent également que la dimérisation se produit très tôt dans le RE. En effet, plusieurs mutants du récepteur V2 de la vasopressine (V2R), qui sont impliqués dans la maladie du diabète néphrogénique insipide, sont retenus à l'intérieur du RE et ne peuvent être exprimés à la membrane plasmique (Morello *et al.*, 2000). Pourtant, plusieurs de ces récepteurs mutants forment des dimères, suggérant ainsi que la dimérisation est un processus qui survient très tôt lors de leur biosynthèse. Ceci a également été observé pour d'autres mutants du V2R qui, lorsque co-exprimés avec le récepteur sauvage, agissent comme dominant-négatifs sur ce dernier en prévenant son expression à la surface cellulaire (Zhu and Wess, 1998). Cette idée voulant que la dimérisation

dans le RE soit impliquée dans le contrôle de qualité des protéines, dans le but de bloquer les récepteurs mutants ou mal repliés, est également supportée par des observations sur le récepteur chémokine CCR5 (Samson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Benkirane *et al.*, 1997) et sur les récepteurs D2 et D3 dopamine (Lee *et al.*, 2000; Karpa *et al.*, 2000). Ces nombreuses études permettent donc de penser que les RCPG peuvent dimériser très tôt lors de leur biosynthèse et que cette dimérisation serait requise pour leur bon acheminement à la surface cellulaire.

Ces études suggèrent donc que les dimères peuvent se former indépendamment de leur activation par un ligand. Qu'en est-il donc de l'effet de la liaison du ligand sur la dimérisation? Pour de nombreux RCPG constitutivement dimériques, il a été suggéré qu'un traitement avec un ligand stabilise ou augmente le nombre de dimères détectés à la surface cellulaire. C'est notamment le cas du β_2 AR dont un traitement à l'agoniste isoproterenol augmente légèrement les formes de haut poids moléculaire (Hebert *et al.*, 1996) ou le niveau de BRET (Angers *et al.*, 2000). Une augmentation du transfert d'énergie ainsi que des formes de haut poids moléculaire à la suite d'un traitement avec un agoniste ont aussi été suggérées comme étant le reflet d'une dimérisation pour les récepteurs SST5 de la somatostatine (Rocheville *et al.*, 2000b), au Ca^{2+} (Ward *et al.*, 1998) et du TRH (Kroeger *et al.*, 2001). Dans le cas de l'homo et hétéro-dimérisation des récepteurs MT1 et MT2 mélatonine, il a été observé qu'un traitement avec des agonistes, mais aussi avec des antagonistes et des agonistes inverses, entraînait une augmentation du signal de BRET détecté pour l'homo-dimère MT1R mais pas pour l'homo-dimère MT2R (Ayoub *et al.*, 2002). De plus, dans la même étude, il a été démontré que l'effet du ligand sur le niveau de BRET pour l'hétéro-dimère MT1R/MT2R n'était pas observable pour les deux orientations de transfert d'énergie possibles. En effet, aucun effet de ligand n'était observé pour l'hétéro-dimère MT2R-Rluc/MT1R-GFP tandis que pour l'hétéro-dimère MT1R-Rluc/MT2R-GFP, tous les ligands utilisés induisaient une augmentation du niveau de BRET.

Dans certaines études, il a été observé que la dimérisation des RCPG était dépendante du ligand. Ainsi, il est suggéré que certains récepteurs seraient acheminés à la surface cellulaire sous forme monomérique et que leur stimulation induirait leur dimérisation. C'est le cas notamment pour les récepteurs GnRH

(Horvat *et al.*, 2001; Kroeger *et al.*, 2001), SST5 somatostatine (Rocheville *et al.*, 2000b), CCR5 (Vila-Coro *et al.*, 2000), CCR2 (Rodriguez-Frade *et al.*, 1999), CXCR4 (Vila-Coro *et al.*, 1999), ainsi pour que l'hétéro-dimère SST5 somatostatine/D2 dopamine dont la présence d'agoniste ou d'antagoniste semble promouvoir leur formation (Rocheville *et al.*, 2000a).

Certaines études ont conclu à une diminution du nombre de dimères constitutifs à la suite d'un traitement avec un agoniste. Mentionnons, entre autres, les récepteurs δ -opioïdes (δ -OR) (Cvejic and Devi, 1997), CCK cholecystokinine (Cheng and Miller, 2001) et l'hétéro-dimère A1 adénosine/D1 dopamine dont un traitement avec un agoniste dopaminergique diminue le nombre de formes de haut poids moléculaire sur gel SDS (Gines *et al.*, 2000). Il est intéressant de noter, cependant, que pour cet hétéro-dimère, la présence de l'agoniste adénosine n'affecte aucunement le nombre de dimères détectés. L'absence de modification du nombre de dimères détectés en présence d'un agoniste a également été observée pour d'autres RCPG, tels que les récepteurs M3 muscariniques (Zeng and Wess, 1999), Ste2 (Overton and Blumer, 2000), δ -OR (McVey *et al.*, 2001) et κ -OR (Jordan and Devi, 1999).

Certaines des observations présentées ci-dessus sont apparemment contradictoires et leur diversité nous permet de penser que la formation des dimères chez les RCPG procède selon différents mécanismes. Cependant, cela peut également s'expliquer par la difficulté de l'interprétation provenant de ces observations. En effet, dans le cas des observations provenant des expériences de co-immunoprécipitation et d'immunobuvardage Western dans lesquelles le ligand induisait un changement dans la quantité de dimères détectés, il est possible que la liaison du ligand sur le récepteur étudié puisse modifier la conformation de ce dernier et sa reconnaissance par l'anticorps, entraînant ainsi une modification positive ou négative du nombre de dimères détectés. C'est également le cas pour les expériences de transfert d'énergie dans lesquelles un changement de conformation des récepteurs à la suite de la liaison d'un ligand pourrait induire une modification dans la distance entre le donneur et l'accepteur d'énergie. Puisque l'efficacité du transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur diminue à la puissance 6 de la distance, une légère modification dans la conformation d'un

dimère constitutif pourrait entraîner des changements importants dans le signal de BRET ou de FRET détecté. Ceci pourrait donc expliquer que, dans certains cas, le transfert d'énergie entre deux récepteurs formant un dimère passe d'une valeur nulle à une valeur très importante lorsqu'un changement de conformation important survient dans le dimère. Pour d'autres RCPG, l'effet du ligand ne modifie pas significativement le transfert d'énergie en raison d'un changement mineur de conformation dans le dimère. Cette hypothèse pourrait également expliquer que non seulement des agonistes induisent une modification du signal de BRET ou de FRET, mais qu'également des antagonistes et agonistes inverses peuvent moduler ce transfert d'énergie. Toutefois, la technologie actuelle ne permet pas de confirmer l'une ou l'autre des possibilités.

1.4 Les objectifs du projet de maîtrise

Au moment de débiter mon projet de maîtrise, les premières observations d'hétéro-dimérisation entre différents sous-types de RCPG commençaient à être présentées. Étant donné les nombreuses similitudes et différences énumérées précédemment entre β_1 et β_2 AR, nous avons émis l'hypothèse que β_1 et β_2 AR pouvaient former des hétéro-dimères. L'expression de ces deux sous-types dans un très grand nombre de tissus pouvait en faire un modèle intéressant de l'hétéro-dimérisation des RCPG.

Au cours de ma maîtrise, nous voulions donc vérifier que :

- 1) les récepteurs β -adrénergiques pouvaient former des homo-dimères. Dans le cas du β_2 AR, cela avait déjà été démontré que l'homo-dimère β_2 AR pouvait former des complexes stables en condition dénaturante et que ces complexes étaient également observés dans des cellules vivantes. Dans le cas du β_1 AR, deux approches allaient être utilisées pour vérifier leur homo-dimérisation : la co-immunoprécipitation pour vérifier que β_1 AR forme un dimère stable en présence de SDS, puis le BRET pour vérifier si l'homo-dimérisation survient dans des cellules vivantes. Nous voulions également vérifier la proportion de la

- population de β AR engagée dans la formation de dimères, ainsi que le site cellulaire de la formation des homo-dimères β_1 et β_2 AR;
- 2) les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques pouvaient former des hétéro-dimères. Nous nous intéressions donc à vérifier si des hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR existaient dans des conditions dénaturantes ainsi que dans des cellules vivantes. Nous voulions également étudier l'affinité relative des protomères formant un dimère ainsi que le site cellulaire de la formation des hétéro-dimères.
 - 3) l'hétéro-dimère β_1 AR/ β_2 AR présentait des propriétés fonctionnelles particulières. Pour ce faire, nous avons voulu vérifier le recrutement de la β -arrestine par cet hétéro-dimère, ainsi que ses propriétés d'internalisation et de stimulation des voies de l'adénylate cyclase et MAPK.

Dans les prochains chapitres, les résultats obtenus au cours de ma maîtrise sont exposés sous forme de deux articles publiés ainsi que dans une section comprenant des résultats additionnels qui n'ont pas été publiés. Une discussion englobera ensuite l'analyse de tous ces résultats.

Chapitre 2: Premier article

Ma contribution à cet article, dont je suis premier co-auteur, a été de démontrer l'existence des hétéro-dimères $\beta_1\text{AR}/\beta_2\text{AR}$. Ainsi, j'ai réalisé les expériences représentées dans les figures 2.1 et 2.2. De plus, ceci inclus les résultats non-montrés qui se rattachent à ces figures et qui sont cités dans le texte. J'ai également contribué de façon importante à la rédaction du manuscrit.

β_1/β_2 -adrenergic receptor heterodimerization regulates β_2 -adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy.

Catherine Lavoie^{1,2*}, Jean-François Mercier^{2*}, Ali Salahpour², Dhiviya Umapathy¹, Andreas Breit², Louis-Robert Villeneuve¹, Wei-Zhong Zhu³, Rui-Ping Xiao³, Edward G. Lakatta³, Michel Bouvier² and Terence E. Hébert^{1,2,4†}

- 1) Centre de recherche, Institut de Cardiologie de Montréal
- 2) Département de biochimie et Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal
- 3) Laboratory of Cardiovascular Science, Gerontology Research Center, National Institute on Aging, Baltimore, MD.
- 4) Département d'anesthésiologie, Université de Montréal

* These authors contributed equally to the manuscript.

† To whom correspondence should be addressed

T. E. Hébert

Centre de Recherche, Institut de Cardiologie de Montréal

5000 rue Bélanger est, Montréal, PQ, Canada, H1T 1C8

Phone (514) 376-3330 ext. 3473

Fax (514) 376-1355

Email hebertt@icm.umontreal.ca

Running title: Heterodimerization of β -adrenergic receptors.

2.1 Abstract

β_1 - and β_2 -adrenergic receptors are co-expressed in numerous tissues where they play a central role in the responses of various organs to sympathetic stimulation. Although the two receptor subtypes share some signaling pathways, each has been shown to have specific signaling and regulatory properties. Given the recent recognition that many G protein-coupled receptors (GPCRs) can form homo- and heterodimers, the present study was undertaken to determine if the β_1 AR and β_2 AR can form dimers in cells, and if so, to investigate the potential functional consequences of such heterodimerization. Using co-immunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer (BRET), we show that β_1 AR and β_2 AR can form heterodimers in HEK-293 cells co-expressing the two receptors. Functionally, β -adrenergic-stimulated adenylyl cyclase activity was found to be identical in cells expressing either β_1 AR, β_2 AR or both receptors at similar levels indicating that heterodimerization did not affect this signaling pathway. When considering ERK1/2 MAP kinase activity, a significant agonist-promoted activation was detected in β_2 AR but not β_1 AR expressing cells. Similarly to what was observed in cells expressing the β_1 AR alone, no β -adrenergic-stimulated ERK1/2 phosphorylation was observed in cells co-expressing the two receptors. A similar inhibition of agonist-promoted internalization of the β_2 AR was observed upon co-expression of the β_1 AR which by itself internalized to a lesser extent. Taken together, our data suggest that heterodimerization between β_1 AR and β_2 AR inhibits the agonist-promoted internalization of the β_2 AR and its ability to activate the ERK1/2 MAPK signaling pathway.

2.2 Introduction

The standard model describing signaling in GPCRs, where the receptor functions strictly as a monomer is no longer tenable. In the past few years, a number of studies have demonstrated that oligomerization of GPCRs may play important roles in receptor trafficking and signaling (for review see (Bouvier, 2001;Angers *et al.*, 2002)). In addition to forming homodimers, several receptors have been shown to heterodimerize with other receptor subtypes. In some cases, such as the metabotropic GABA_B (White *et al.*, 1998;Jones *et al.*, 1998;Kaupmann *et al.*, 1998;Kuner *et al.*, 1999;Ng *et al.*, 1999) and the gustatory receptors (Nelson *et al.*, 2001;Nelson *et al.*, 2002), heterodimerization between closely related subtypes was found to be essential for the formation of functional receptors. Although only a few examples for such obligatory heterodimerization are available to date, an increasing number of reports suggest the occurrence of heterodimerization between more or less closely related family members (Jordan and Devi, 1999;Pfeiffer *et al.*, 2001;Gines *et al.*, 2000;Gomes *et al.*, 2000;George *et al.*, 2000;AbdAlla *et al.*, 2000;Jordan *et al.*, 2001;McVey *et al.*, 2001;Rocheville *et al.*, 2000b;Rocheville *et al.*, 2000a). In some of these cases, heterodimerization has been proposed to lead to receptors with pharmacological and/or functional properties that are different from those of the individual receptors.

The potential regulatory influences that these oligomeric assemblies may have on the function of receptors co-existing in the same cell led us to investigate whether receptors that are ubiquitously expressed in many tissues and cell types could function as heterodimers. Two such widely distributed receptors are the β_1 AR and β_2 AR, which are co-expressed in a large number of tissues and cell types (Brodde *et al.*, 1983;del Monte *et al.*, 1993;Sano *et al.*, 1993;Boivin *et al.*, 2001;Petrecca and Shrier, 1998). Interestingly, the two receptor subtypes were shown to form homodimers when expressed individually in heterologous expression systems (Hebert *et al.*, 1996;Angers *et al.*, 2000;Xu *et al.*, 2001). Although the two receptors display more than 50% sequence homology (Frielle *et al.*, 1987) and share transmembrane domain motifs proposed as a dimerization interface (Hebert *et al.*, 1996), no study has directly investigated their potential for heterodimerization.

Although the two receptors are known to couple to Gs, important differences in their functional properties have been reported. For instance, the β_2 AR has been shown to be more efficiently coupled than some variants of the β_1 AR to adenylyl cyclase (Rousseau *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1993). Also, β_2 AR activation leads to a more efficient stimulation of various MAP kinase signaling pathways (Chesley *et al.*, 2000; Sabri *et al.*, 2000). In further contrast to the β_2 AR, which undergoes rapid internalization following agonist stimulation, the β_1 AR was found to remain largely localized at the cell surface for extended periods following agonist stimulation (Suzuki *et al.*, 1992; Shiina *et al.*, 2000; Shiina *et al.*, 2001). Since these differences represent intrinsic properties which were determined for the individual receptors, they offer useful readouts to assess the functional consequences of heterodimerization.

In the present study, the occurrence of heterodimerization between the β_1 AR and β_2 AR was assessed by co-immunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in living human cells co-expressing the two receptors. The potential functional consequences of the heterodimerization were also assessed by determining the influence of receptor co-expression on the ability of the receptors to stimulate adenylyl cyclase and MAP kinase pathways as well as to undergo agonist-promoted internalization. We found that co-expression of the two receptor subtypes in HEK 293 cells lead to their heterodimerization and inhibited both agonist-promoted β_2 AR internalization and ERK1/2 MAP kinase stimulation. This suggests that heterodimerization may represent a regulatory cross-talk process arising through the creation of a receptor form that has distinct functional properties.

2.3 Experimental Procedures

Materials

Unless otherwise stated, all chemicals were of reagent grade or higher and were obtained from Sigma.

Eukaryotic Expression Vectors.

β_1 AR-GFP10. The β_1 AR coding sequence without its stop codon was amplified from the pBC12BI-human β_1 AR plasmid (Frielle *et al.*, 1987) using sense and antisense primers harboring unique *SacI* and *AgeI* sites. The fragment was then subcloned in-frame into the *SacI/AgeI* site of the turquoise variant GFP-sapphire vector (pGFP-N1-Sapphire; Packard) to give the plasmid pGFP-N1- β_1 AR-Sapphire. Finally, the GFP-Sapphire was replaced by a green GFP variant (GFP10) containing the following mutations: P64L, S147P, and S202P. For this purpose, an *AgeI/BsrGI* fragment of the GFP10 was subcloned into the *AgeI/BsrGI* site of the pGFP-N1- β_1 AR-Sapphire to finally yield pGFP-N1- β_1 AR-GFP10. *β_2 AR-GFP10.* The GFP10 *AgeI/BsrGI* fragment was subcloned into the *AgeI/BsrGI* site of pGFP-N1-His β_2 AR-YFP (Angers *et al.*, 2000). For the sake of simplicity, the constructs are referred to β_1 AR-GFP and β_2 AR-GFP respectively. *HA- β_1 AR.* The *HindIII/XhoI* fragment of the plasmid pCMV-HA- β_1 AR, which was a generous gift of Dr. Brian Kobilka, Stanford University (Rohrer *et al.*, 1996), was subcloned into the *HindIII/XhoI* site of pcDNA3 (RSV) plasmid to yield pcDNA3 (RSV)-HA- β_1 AR. This β_1 AR construct contains an arginine at position 389, the most common polymorphism at this position (Mason *et al.*, 1999). *HA- β_2 AR.* The human His β_2 AR coding sequence was amplified using a sense primer containing a *BamHI* restriction site followed by the HA-tag sequence, and an antisense primer. The amplified HA- β_2 AR sequence was digested with *BamHI/EcoNI*, then subcloned into *BamHI/EcoNI*-digested pcDNA3 (RSV)-His- β_2 AR vector resulting in pcDNA3 (RSV)-HisHA- β_2 AR plasmid. *β_1 AR-Rluc.* The pcDNA3.1- β_1 AR:6:hRluc was a generous gift from Packard BioSignal. This fusion protein contains a linker of 6 amino acids linking the carboxyl tail of the human β_1 AR to humanized Rluc. *β_2 AR-Rluc.* The humanized Rluc coding sequence (Packard) was amplified using sense and antisense primers, then subcloned into the PCR Blunt II Topo vector (Invitrogen). The hRluc fragment was excised by digestion with

KpnI/XbaI and subcloned into the *KpnI/XbaI*-digested pcDNA3.1 Zeo vector to generate the pcDNA3.1 Zeo/hRluc plasmid. The human His β_2 AR coding sequence was amplified without its stop codon using sense and antisense primers. The PCR product was subcloned into PCR Blunt II Topo Vector, then excised by double digestion with *HindIII/KpnI* and ligated into the *HindIII/KpnI*-digested expression vector pcDNA3.1Zeo/hRluc. The resulting construct encodes a six amino acid linker between the carboxyl tail of the β_2 AR and the humanized Rluc sequence. In some experiments, a *c-myc* tagged version (N-terminal) of the β_2 AR-Rluc construct was used. HA-GABA β R2. The pcDNA3.1-HA-GABA β R2 was a generous gift from Glaxo Smith Kline.

Cell culture and transfection.

HEK 293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS (Wisent or BioMedia), 100 units/ml penicillin/streptomycin, 2mM L-glutamine (from Wisent or Life Technologies). For transfection experiments, cells were seeded at a density of 2×10^6 cells per 100-mm dish and cultured for 24 hours. Transient transfections were then performed using either the calcium phosphate precipitation protocol (Mellon *et al.*, 1981) or Lipofectamine (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. The cells were then cultured in the same medium for 48-72 hours. In some experiments, transient transfections were carried out in HEK 293 cells stably expressing the human β_2 AR (a generous gift from Dr. Phil Wedergaertner, Thomas Jefferson University).

Immunoprecipitation and Western blot analysis.

For immunoprecipitation experiments, cells co-expressing HA-tagged receptors and the β_2 AR-GFP were harvested 72 hours post-transfection, washed three times in PBS and incubated with blocking buffer (PBS containing 0.2% bovine serum albumin) for 1 h on ice. Subsequently, the cells were incubated with the mouse monoclonal anti-HA (12CA5) antibody (1:250 dilution) in blocking buffer on ice for an additional hour. After two washes in blocking buffer and two washes in PBS, cells were lysed and proteins solubilized in RIPA buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM iodoacetamide, 1 mM PMSF, 0.1 mg/ml benzamidine, 2.5 μ g/ml leupeptin for 30 minutes on ice, and centrifuged at 12,000 $\times g$ for 15 min at 4 $^\circ C$ to

remove cellular debris. For immunoprecipitation of the total receptor pool, lysates were incubated overnight at 4 °C with additional 12CA5 antibodies (1:200 dilution) before the addition of protein G-Sepharose for 3 h. For immunoprecipitation of cell surface receptors, only protein G-Sepharose was added. Protein G-Sepharose/antibody/antigen complexes were then collected by centrifugation at 12,000 x g. The immunoprecipitates were washed four times with cold RIPA buffer and resuspended in sample buffer containing 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 4 M urea, and 100 mM dithiothreitol, and heated at 50 °C. Protein concentration to be used in the immunoprecipitation was assessed using the DC Protein assay kit (BioRad) with bovine serum albumin as a standard. Protein samples were resolved by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose (Protran), and subjected to immunoblotting using rabbit polyclonal anti-GFP antibody (Clontech, 1:100 dilution). Renaissance chemiluminescence kit (Perkin-Elmer Life Sciences) was used for Western blot development.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay.

Forty-eight hours post-transfection, cells were washed twice in PBS, detached with PBS/EDTA and resuspended in PBS/glucose 0.1%. Cells were then distributed in 96-well microplates (white Optiplate from Packard Bioscience) at a density of ~ 100,000 cells per well. Deep Blue C coelenterazine (BioSignal Packard Bioscience) was added at a final concentration of 5 μ M and readings were collected using a modified Top-count apparatus (BRETCount) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370-450 and 500-530 nm windows using filters with the appropriate band pass (Chroma). The BRET signal is determined by calculating the ratio of the light emitted by the Receptor-GFP (500-530 nm) over the light emitted by the Receptor-Rluc (370-450). The values were corrected by subtracting the background signal detected when the Receptor-Rluc constructs were expressed alone. On a routine basis, the protein concentration of the samples was determined to control for the number of cells using a Bradford assay (BioRad) with bovine serum albumin as a standard. To determine the maximal BRET level detectable between each partner, preliminary experiments were carried out by co-transfecting increasing amounts of the receptor-GFP plasmids with a constant quantity of receptor-Rluc construct.

Membrane preparation.

Membranes were prepared from cells 48h after transfection as described previously (Hebert *et al.*, 1996; Lemire *et al.*, 1998). Briefly, cells were washed twice with ice-cold PBS. They were then disrupted by homogenization with a polytron in 10 ml of ice-cold buffer containing 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml benzamidine and 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor. Lysates were centrifuged at 500 x g for 5 minutes at 4°C to remove nuclei and unbroken cells. The supernatant was then centrifuged at 45,000 x g for 20 minutes and the pellet washed twice in the same buffer. Membrane preparations were used immediately for adenylyl cyclase and binding assays.

Receptor quantification.

Membranes were prepared and washed as described above. Total βAR number was calculated from binding experiments using a saturating concentration (300 pM) of [¹²⁵I] cyanopindolol (CYP; Perkin Elmer) as the radioligand. Briefly, membrane preparations (10 µg of protein) were incubated with [¹²⁵I]-CYP for 90 minutes at room temperature in a total volume of 0.5 ml in the presence or absence of 10 µM alprenolol or propranolol (Sigma) to define specific binding. In some experiments, the proportion of β₁AR and β₂AR expressed were determined using a concentration (0.1 µM) of the selective β₂- or β₁-specific antagonists ICI 118,551 (Tocris) or betaxolol (Tocris) that fully occupies one of the subtypes but blocks less than 10% of the other.

Surface receptor expression was determined using whole cell binding assays with the hydrophilic ligand [³H]-CGP 12177 (CGP; Perkin Elmer) as described (Dunigan *et al.*, 2000). Cells were transiently transfected with either β₂AR-GFP10 or β₂AR-GFP10 and HA-β₁AR. Briefly, β₂AR-specific internalization was determined using 5 X 10⁻⁸ M betaxolol to block CGP binding to the β₁AR and non-specific surface binding was determined using 10 µM propranolol and subtracted from values determined in the presence of betaxolol. These experiments (except for washing steps) were conducted at 37° C. Cells were treated with 10 µM isoproterenol or vehicle (10⁻⁴ M ascorbic acid) for 2 hours and then washed with cold PBS to remove ligand. For cell surface binding, cells were incubated with CGP for 30 minutes and

for total binding, cells were incubated with CYP for 60 minutes. Cells were then filtered with a Brandel cell harvester as for the membrane receptor assay described above.

Measurement of adenylyl cyclase activity.

Adenylyl cyclase activity was assayed in the same membrane preparation according to the method of Salomon et al. (Salomon *et al.*, 1974) using 50 μg of protein in a total volume of 50 μl . Enzyme activities were determined following a 15 minute incubation in the presence of 1 nM to 100 μM isoproterenol, 100 μM forskolin, 10 mM NaF or the vehicle at 37°C. Data were calculated as pmoles cAMP produced/min/mg protein, normalized with respect to forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity and analyzed by least squares regression using GraphPad PRISM.

Detection of phosphorylated MAP kinase isoforms (p38 and p42/p44 ERK).

Cells were serum starved for 16 hours and treated for the indicated times with the non-selective β -adrenergic agonist isoproterenol or PMA at 37 °C. Cells were then lysed in a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.25% sodium deoxycholate, 10% glycerol (v/v), 25 mM NaF, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1mM Na_3VO_4 , 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 10 mM benzamidine, 0.5 μM microcystin, 1% Triton X-100 (v/v), 0.1 mM PMSF and 5 mM DTT. The samples were then prepared for denaturing SDS PAGE and the activity of the p38 and p42/p44 (ERK1/2) MAP kinase was determined by immunoblotting with anti-phospho-p38 or anti-phospho-ERK (both at 1:1000 dilution, Cell Signaling). The blots were then stripped and re-blotted with the anti-ERK1/2 or anti-p38 (1:2000, StressGen) to control for the total amount of kinases loaded. Data from separate experiments were digitized on a flatbed scanner and analyzed using Quantity One (BioRad) software.

Confocal microscopy.

Cells were cultured on coverslips overnight in DMEM and stimulated for the indicated times with 1 μM isoproterenol at 37 °C. They were then permeabilized and fixed with 3% paraformaldehyde (v/v) and 0.2% Triton X-100 (v/v) for 20 minutes at room temperature. After three washes with PBS, the cells were treated with a blocking solution containing 2% BSA and 5% pre-immune normal donkey serum (Jackson Laboratories) for 1 hour. Rabbit polyclonal anti- $\beta_2\text{AR}$ (Santa Cruz; 1:100

dilution) or anti- β_1 AR (a generous gift from Dr. Brian Kobilka, Stanford University; 1:100 dilution), diluted in a solution of 2.5% normal donkey serum and 1% BSA, were subsequently incubated with fixed, permeabilized cells for 16 hours at 4 °C. Following three washes with PBS, CY5-labelled secondary donkey anti-rabbit antisera (Jackson Laboratories; 1:500 dilution) was incubated with the samples for 60 minutes in the dark followed again by three washes with PBS. For colocalization experiments, cells were transfected with β_2 AR-GFP and β_1 AR. GFP fluorescence was stimulated with a 488 nm Ar laser and these signals were overlaid with CY5 fluorescence (stimulated with a 633 nm He-Ne laser) after labeling with anti- β_1 AR. Confocal microscopy was performed using a Zeiss LSM-510 system with a highly corrected objective (Zeiss Plan-Apochromat X63, numerical aperture 1.4 under oil). Control experiments were performed in the absence of primary antibodies and revealed a low level of background staining indicating the specificity of the primary antibodies used.

ELISA to detect receptors expressed at the cell surface.

Cells were transfected with β_2 AR-Rluc bearing a c-myc tag on the extracellular N-terminus alone or with β_1 AR-GFP10 and transferred to 6 well polylysine-coated plates 12 hours after transfection. 24 hours post-transfection, cells were treated with 10 μ M isoproterenol or vehicle for 60 minutes at 37 ° C. Cells were kept on ice for all subsequent steps. After 3 washes with cold PBS, cells were blocked with PBS with 1% BSA (w/v) for 30 minutes. Blocked cells were then incubated with anti-myc (9E10) antibodies (1:100 dilution) for 60 minutes and subsequently washed again three times with PBS/1% BSA. Cells were then fixed with 3% paraformaldehyde (v/v) for 15 minutes and washed 3 times with PBS. Cells were blocked again for 15 minutes with PBS/1% BSA, incubated with anti-mouse/HRP conjugate (Amersham-Pharmacia; 1:1000) for 30 minutes and finally washed with PBS/1% BSA three times. The substrate o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) was added according to manufacturer's instructions for 4-7 minutes. The reaction was stopped with 200 μ l 3N HCl and extinction was measured at 492 nm. Data were plotted as percent signal (isoproterenol) relative to time matched control (vehicle).

2.4 Results

Characterization of the β_1 AR/ β_2 AR heterodimer by co-immunoprecipitation.

In a first attempt to determine if the β_2 AR could form a heterodimer with the β_1 AR, a co-immunoprecipitation experiment between β_1 AR and β_2 AR bearing different epitope-tags (HA and GFP, respectively) was designed. The ability of the β_2 AR to form homodimers or to heterodimerize with the β_1 AR was assessed in HEK 293 cells co-expressing the β_2 AR-GFP with either HA- β_2 AR or HA- β_1 AR (Figure 2.1, lanes 3-6). After cell surface (S) or total cell extract (T) immunoprecipitation of the HA-tagged receptors using a mouse monoclonal anti-HA antibody, the presence of β_2 AR-GFP in the immunoprecipitate was probed using a rabbit anti-GFP antibody. Two major species corresponding to monomeric and oligomeric forms of the β_2 AR were detected in both HA- β_2 AR/ β_2 AR-GFP and HA- β_1 AR/ β_2 AR-GFP expressing cells. In contrast, no specific GFP immunoreactivity was detected at the cell surface or in the total extract of cells co-expressing the unrelated HA-tagged GABA_B-R2 receptor and the β_2 AR-GFP (Figure 2.1, lanes 7 and 8), confirming the selectivity of the immunoprecipitation approach. Immunoreactivity for the HA-GABA_B-R2 was, however, detected in the anti-HA immunoprecipitate (data not shown) confirming that this receptor was efficiently expressed and immunoprecipitated. Taken together, these results confirm, as previously reported (Hebert *et al.*, 1996;Angers *et al.*, 2000;Xu *et al.*, 2001), that the β_2 AR and β_1 AR can form homodimers, and indicate that stable and selective intermolecular interactions can also occur between the two receptors as well. The higher molecular weight species detected in Western analyses correspond to SDS-resistant complexes that may either represent dimers or possibly higher order oligomers such as trimers that were not fully denatured by SDS (Hebert *et al.*, 1996). The low resolution in this region of the gels and the possibility of aberrant mobility make it difficult to unambiguously distinguish between these possibilities. For the sake of simplicity, we will therefore refer to stable receptor-receptor complexes as dimers.

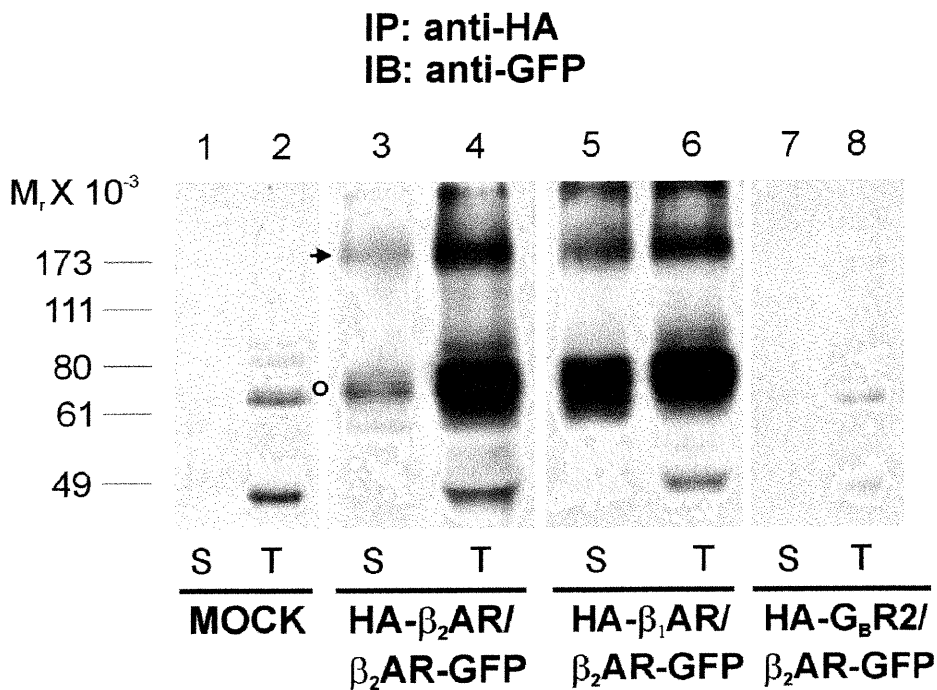


Figure 2.1: Immunodetection of co-immunoprecipitated β_1 AR/ β_2 AR. 72 hours after transfection, HEK 293 cells were harvested and immunoprecipitations were carried out on cell surface (S) or total extracts (T) in non-transfected cells (lanes 1 and 2) and in cells transiently co-transfected with HA- β_2 AR and β_2 AR-GFP (lanes 3 and 4), HA- β_1 AR and β_2 AR-GFP (lanes 5 and 6) and HA-GABA $_B$ -R2 and β_2 AR-GFP (lanes 7 and 8). HA-tagged receptors were immunoprecipitated with a mouse monoclonal anti-HA (12CA5) antibody. Immunoreactive bands were revealed using a rabbit polyclonal anti-GFP antibody. Immunocomplexes were analysed by SDS-PAGE (10%). Western blots are representative of at least 3 independent experiments. *Arrows*: high molecular weight oligomeric species; *open circle*: fully glycosylated forms of the β_2 AR-GFP.

β_1 - and β_2 -adrenergic receptors form homo- and heterodimers in living cells.

Although co-immunoprecipitation is a generally accepted method to document protein-protein interactions, the interpretation of these experiments for hydrophobic membrane proteins such as receptors is complicated by detergent solubilization that could promote artefactual aggregation. To assess if β_1 AR/ β_2 AR heterodimers could be detected in living cells, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) was used. This technique is a proximity assay based on the non-radiative transfer of energy between a bioluminescent donor (*Renilla* luciferase; *Rluc*) and a fluorescent acceptor (GFP) that allows real-time monitoring of protein-protein interaction in living cells (Angers *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1999). BRET has been

used to complement biochemical approaches to studying receptor/receptor interactions for β_2 AR (Angers *et al.*, 2000), δ -opioid (McVey *et al.*, 2001) and thyrotropin releasing hormone receptor (Kroeger *et al.*, 2001) homodimerization. In these experiments, we have used a slight modification of the previously published assay. The new BRET² technology (BioSignal Packard) takes advantage of the spectral properties of a distinct luciferase substrate known as Deep Blue coelenterazine (Deep Blue C), which permits a better separation between Rluc and GFP emission spectra (see *Experimental Procedures*).

To assess β_2 AR and β_1 AR homo- and heterodimerization, fusion constructs linking the receptor carboxyl terminal tails to either Rluc or GFP were co-transfected in HEK 293 cells and the transfer of energy between the two partners assessed following the addition of Deep Blue C. Upon oxidation of the luciferase substrate, the enzyme emits light with a peak at 400 nm that can excite GFP which, in turn, re-emits fluorescence with a peak at 510 nm but only if the two partners are within the permissive distance (<100Å). The BRET signal is determined by calculating the ratio of the light emitted by the Receptor-GFP (500-530 nm) over the light emitted by the Receptor-Rluc (370-450 nm).

Figure 2.2 presents the BRET level measured for the different partners considered. A strong BRET signal was detected for both β_1 AR and β_2 AR homodimers and a smaller but significant BRET was also observed in cells expressing β_1 AR-Rluc/ β_2 AR-GFP or β_2 AR-Rluc/ β_1 AR-GFP indicating that heterodimers between the receptor subtypes also form in living cells. No significant BRET was detected when either β_1 AR-Rluc or β_2 AR-Rluc was co-expressed with soluble GFP expressed at a similar fluorescence level as β_1 AR- or β_2 AR-GFP confirming the selectivity of the detected signals. The small difference between the BRET signals observed for the homo- and heterodimers does not necessarily reflect a smaller number of heterodimers as the level of BRET does not depend strictly on the number of dimers formed but also on the relative orientation and distance between the energy donor and acceptor within the dimers. It follows that differences in the structural organization of the dimers could account for the different BRET levels. No significant changes were detected in the measured BRET levels when the

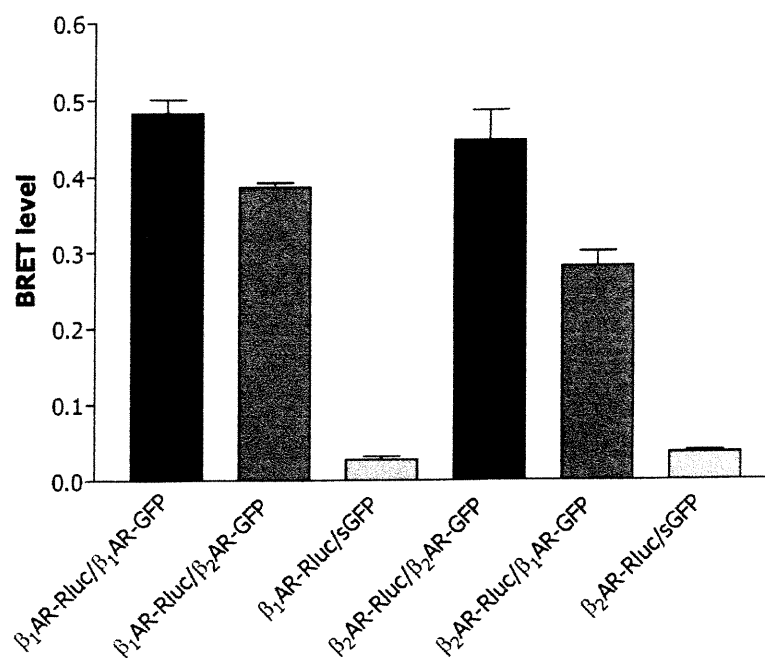


Figure 2.2: Homo- and heterodimers exist in living cells. HEK 293 cells were transiently co-transfected with β_1 AR-Rluc or β_2 AR-Rluc in combination with β_1 AR-GFP, β_2 AR-GFP, or the soluble GFP (sGFP). For each pair considered, the quantities of DNA used for β_1 AR-Rluc and β_2 AR-Rluc were selected to yield equivalent luminescent signals (370–450 nm) while those for β_1 AR-GFP and β_2 AR-GFP were selected to obtain the maximum BRET levels. The BRET level for the soluble GFP was measured at a fluorescence level equivalent to those of β_1 AR-GFP and β_2 AR-GFP. Cells were harvested 48 hours post-transfection, counted and transferred to 96-well plates (100,000 cells/wells). The energy transfer reaction was initiated by adding 5 μ M of Deep Blue C coelenterazine to each well and BRET was assessed in a BRETCount microplate reader with the filter settings described in *Experimental Procedures*. The results represent mean \pm SEM of 3-6 independent experiments performed in triplicate.

cells were stimulated with 10 μ M isoproterenol (data not shown).

Functional characterization of β_1 AR/ β_2 AR interactions.

We next determined the functional consequences of β_1 AR/ β_2 AR heterodimerization by measuring receptor-mediated stimulation of several effector pathways. For this purpose, cells were transfected with the β_1 AR, β_2 AR or both receptors together. Transfection conditions were such that an equivalent total number of receptors were expressed in each case (β_1 AR: 2.0 \pm 0.7, β_2 AR: 1.8 \pm 0.7).

0.5, β_1 AR + β_2 AR: 1.5 +/- 0.6 pmol/mg). For cells expressing the two receptor subtypes, competition radioligand binding with the selective antagonists betaxolol and ICI-118,551 revealed equivalent proportions of β_1 AR and β_2 AR. In a first series of experiments, the ability of the non-selective β -adrenergic agonist, isoproterenol, to stimulate the adenylyl cyclase was tested. In the absence of transfected receptor, isoproterenol promoted a modest concentration-dependent increase in cAMP production that most likely reflects the presence of endogenously expressed β_2 AR (~0.01 pmol/mg) in HEK 293 cells (Figure 2.3). Transfection of the β_1 AR, β_2 AR or of both receptors together led to similar increases in the agonist-stimulated adenylyl cyclase activity. EC_{50} and maximal stimulated values were 60 +/- 24 nM and 20.6 +/- 3.3 pmol/min.mg for β_1 AR (n=4), 48 +/- 33 nM and 21.6 +/- 1.4 pmol/min.mg for β_2 AR (n=4), and 128 +/- 54 nM and 25.2 +/- 4.7 pmol/min.mg for β_1 AR + β_2 AR (n=7), respectively. In mock transfected cells, the EC_{50} and maximal stimulated values were 171 +/- 179 nM and 8.1 +/- 5.5 pmol/min.mg (n=3). No differences in the ability of NaF or forskolin to stimulate adenylyl cyclase were detected whether the receptors were expressed alone or together (data not shown). Since no significant difference in either the efficacy or the potency of isoproterenol was detected, we conclude that: 1) the two receptor subtypes had similar abilities to couple with the adenylyl cyclase pathway and 2) that the formation of β_1 AR/ β_2 AR heterodimers had no effect on this signaling pathway (Figure 2.3).

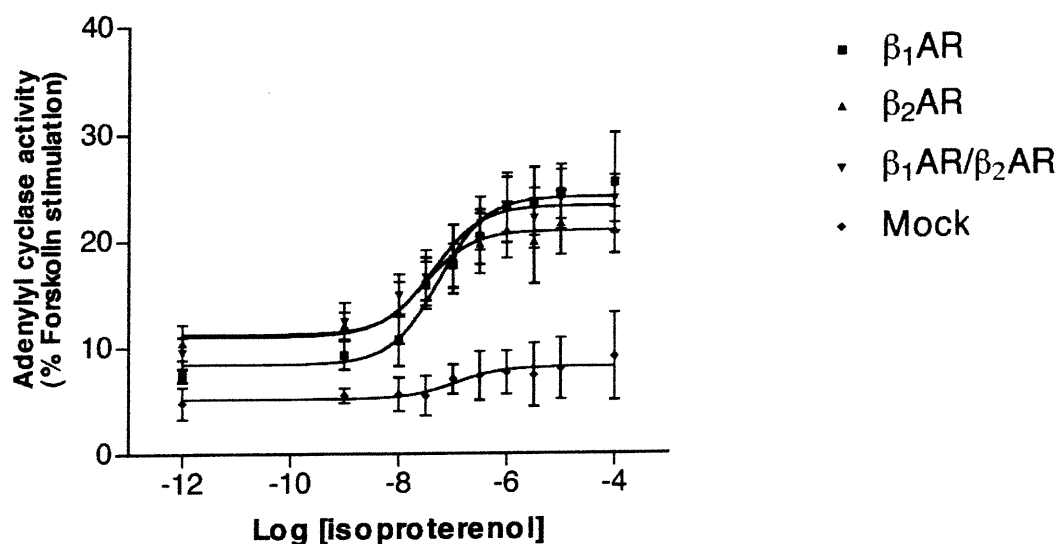


Figure 2.3: Stimulation of adenylyl cyclase by β_1 AR, β_2 AR and β_1 AR/ β_2 AR. HEK 293 cells expressing β_1 AR, β_2 AR or the two receptors together were assayed for adenylyl cyclase activity. Expression of both receptors was confirmed by ligand binding and were as follows (+/- standard deviation): β_1 AR, 2 +/- 0.7 pmol/mg (n=6), β_2 AR, 1.8 +/- 0.5 pmol/mg (n=7) and β_1 AR/ β_2 AR, 1.5 +/- 0.6 pmol/mg (n=7). The ratio of β_1 AR to β_2 AR in HEK 293 cells expressing both receptors was approximately 1:1 as determined using β_2 - or β_1 -selective ligand ICI 118,551 or betaxolol (β_1 AR: 51.2 +/- 3.2%; β_2 AR: 48.7 +/- 3.2). The level of endogenous β_2 AR in HEK 293 cells was 0.01 +/- 0.01 pmol/mg (n=3). Membranes were prepared from HEK 293 cells as described in *Experimental Procedures*. Control cells expressing GFP vector (Mock) alone displayed a markedly lower stimulation (presumably due to the low levels of endogenous β_2 AR in these cells) of adenylyl cyclase under the same conditions used for receptor transfected cells (data not shown). Data were normalized to forskolin stimulation and represent mean +/- SEM for β_1 AR, (n=4), β_2 AR, (n=4), β_1 AR/ β_2 AR, (n=7) and mock (n=3).

The efficacy of each receptor subtype expressed individually or together to stimulate the MAP kinases p38 and ERK1/2 was then assessed. p38 was modestly activated by the β_1 AR and this was not altered by co-expression with the β_2 AR (Figure 2.4e). In HEK 293 cells, we could not detect a consistent stimulation of p38 by the β_2 AR alone. In contrast, a dramatic difference was observed between β_1 AR and β_2 AR in their ability to promote phosphorylation of ERK1/2. Indeed, as seen by other groups, agonist stimulation of the β_2 AR results in a robust activation of ERK1/2 which peaked at 5 minutes and returned to almost basal levels by 30 minutes (Figure 2.4a, Figure 2.5). However, no increase in the phosphorylation of ERK1/2 could be detected upon isoproterenol treatment in cells expressing the β_1 AR (Figure 2.4b).

This difference did not result from aberrant ERK1/2 activities in the β_1 AR expressing cells since the phorbol-ester stimulated ERK1/2 phosphorylation was normal in these cells. Interestingly, in a similar fashion to what was observed for the β_1 AR expressing cells, no β -adrenergic-stimulated ERK1/2 activity could be detected in cells co-expressing both β_1 AR and β_2 AR (Figure 2.4c). For both the β_1 AR alone and β_1 AR and β_2 AR together, no stimulation was seen after 30 minutes of agonist stimulation (Figure 2.5b) demonstrating that the loss of ERK1/2 stimulation shown at 5 minutes was not simply due to changes in the time course of receptor activation of the ERK pathway (Figure 2.5). In fact we could not detect changes in ERK1/2 activation even after 2 hours of agonist stimulation when the two receptors were expressed together (data not shown). Given that the two receptors were expressed at equivalent levels ($\sim 52\%$ β_1 AR), these results suggest that heterodimerization inhibited the β_2 AR-promoted ERK1/2 activation. Data from several experiments is summarized in Figure 2.4d. To confirm that expression of the β_1 AR by itself did not reduce levels of β_2 AR in the transient co-transfections, we also transfected β_1 AR into a stable cell line expressing the β_2 AR. As determined by confocal microscopy, the transfection efficiency for the β_1 AR into the β_2 AR stable cell line was always between 60 and 70% in these experiments. As shown in Figure 2.5, a similar loss of isoproterenol-stimulated ERK1/2 activity was also seen upon co-expression of the two receptor subtypes. Again, no stimulation was seen when the β_1 AR/ β_2 AR were co-expressed at any of the times measured. This data is summarized in Figure 2.5c.

Given the distinct internalization profiles previously reported for the two receptors, the consequences of heterodimerization on the internalization of each receptor was then assessed. Confocal immunocytochemistry analysis revealed that, under control conditions, both receptors are found primarily at the plasma membrane (Figure 2.6a,b). Stimulation of the β_2 AR expressing cells with isoproterenol led to a rapid internalization indicated by the disappearance of receptor from the plasma membrane that could be detected as early as 5 minutes post-stimulation (Figure 2.6a, top panel). For β_1 AR expressing cells, the same treatment had no detectable effect on the expression of the receptor at the cell surface (Figure 2.6b, top panel). No significant internalization of the β_1 AR was detected even following a two hour treatment with the agonist, confirming earlier studies that indicated that the β_1 AR is

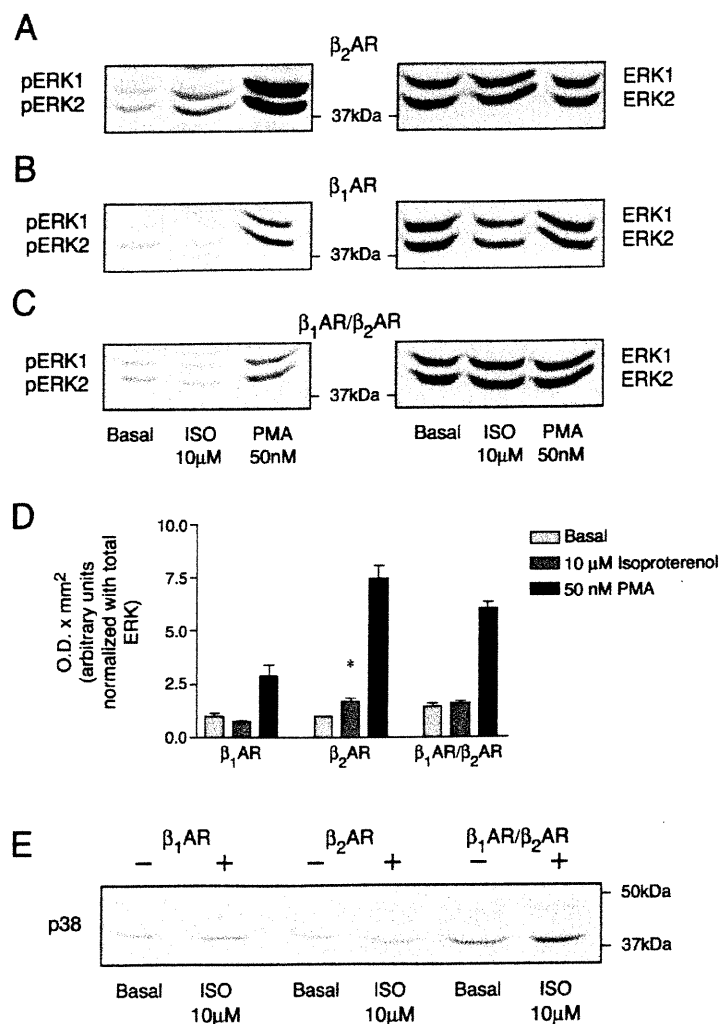


Figure 2.4: Stimulation of ERK1/2 phosphorylation by β_1 AR, β_2 AR and β_1 AR/ β_2 AR. ERK1/2 activation is shown in the upper part of each figure (as measured by anti-phospho ERK1/2 antibodies) in response to stimulation by 10 μ M isoproterenol for 5 minutes of serum-starved HEK 293 cells transiently transfected with (A) β_2 AR, (B) β_1 AR or (C) the two receptors together. As a loading control, the total ERK1/2 pool in the lysate was measured using anti-ERK1/2 antibodies and the anti-phospho ERK data are normalized with respect to the total ERK pool. Expression of both receptors was confirmed by ligand binding, Western blotting and immunocytochemistry. 200 μ g of cell lysate was loaded into each lane. SDS-PAGE was followed by immunoblot, developed with enhanced chemiluminescence. Representative experiments are shown. D) p42/44 ERK data from separate experiments were digitized on a flatbed scanner and analyzed using Quantity One (BioRad) software and are presented here as mean \pm SEM for β_1 AR (n=4); β_2 AR (n=3) and β_1 AR/ β_2 AR (n=4). Asterisk denotes significant differences ($p < 0.05$ using Student's *t*-test) between control and isoproterenol-stimulated samples. E) Representative example (n=3) of p38 MAP kinase activation (as measured using anti-phospho p38 antibodies) by β_1 AR (28 \pm 10 % increase over basal), β_2 AR (20 \pm 0.07 % decrease from basal) or the two receptors together (35 \pm 20 % increase over basal).

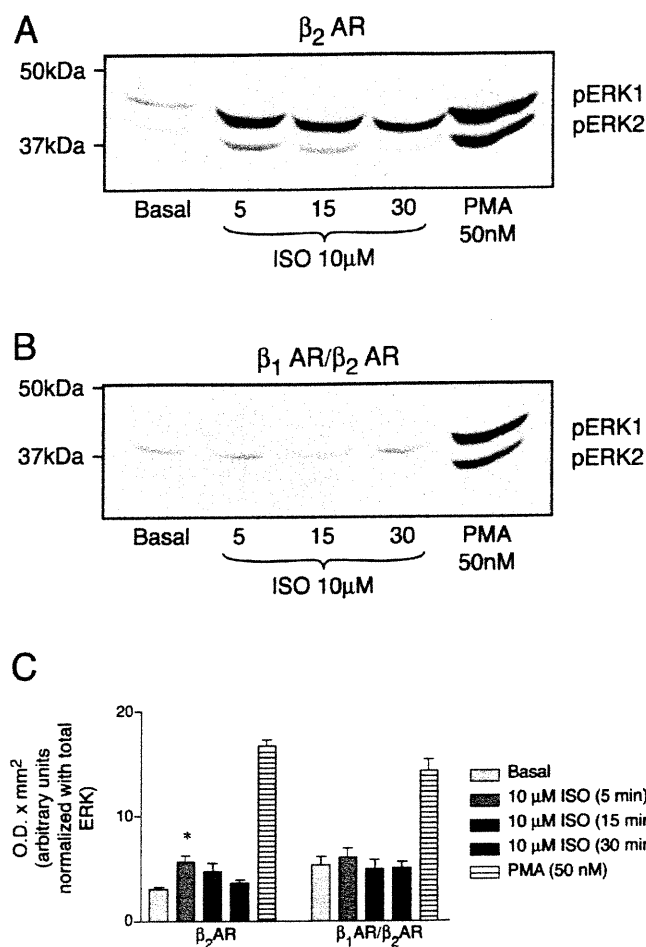


Figure 2.5: Stimulation of ERK1/2 phosphorylation by stably transfected β_2 AR in absence and presence of transiently co-transfected β_1 AR. ERK1/2 activation is shown in the upper part of each figure (as measured by anti-phospho ERK1/2 antibodies) in response to stimulation by 10 μ M isoproterenol for various times of serum-starved HEK 293 cells stably transfected with β_2 AR in the absence (A) and presence (B) of transiently co-transfected β_1 AR. Expression of both receptors was confirmed by ligand binding, Western blotting and immunocytochemistry. Estimates using confocal microscopy of transfection efficiency for transiently expressed β_1 AR were between 60 and 70% using our procedures. 200 μ g of cell lysate was loaded into each lane. SDS-PAGE was followed by immunoblot, developed with enhanced chemiluminescence. Representative experiments are shown and were repeated at least three times. C) p42/44 ERK data from separate experiments were digitized on a flatbed scanner and analyzed using Quantity One (BioRad) software and are presented here as mean \pm SEM for β_2 AR (n=5) and β_1 AR/ β_2 AR (n=5). Asterisk denotes significant differences ($p < 0.07$ using Student's t -test) between control and isoproterenol-stimulated samples.

resistant to agonist-promoted internalization (Suzuki *et al.*, 1992; Shiina *et al.*, 2000; Shiina *et al.*, 2001). In cells co-expressing the two receptor subtypes, isoproterenol stimulation failed to promote significant internalization of either the β_1 AR or the β_2 AR (Figure 2.6a and b bottom panels) indicating that expression of the internalization-resistant β_1 AR inhibited the internalization of the β_2 AR. We also performed colocalization experiments in cells transiently transfected with both β_1 AR and β_2 AR-GFP. Under control conditions, both receptors are expressed at the cell surface where they colocalize (Figure 2.7a). As described above for the untagged β_2 AR, isoproterenol-promoted internalization was readily observed in cells only or predominantly expressing β_2 AR-GFP (Figure 2.7b,c). In contrast, no such internalization of β_2 AR-GFP was observed in those cells co-expressing significant amounts of the β_1 AR (Figure 2.7b,c). The modest β_2 AR-GFP internalization, seen in some of cells co-expressing both receptors, most likely reflects internalization of β_2 AR homodimers.

To quantify the proportion of β_2 AR internalized in the presence and absence of the β_1 AR we took two separate approaches using transient transfections of the β_2 AR in the absence or presence of co-transfected β_1 AR. First, using the hydrophilic ligand CGP, we determined that 54.5 \pm 4.5% of β_2 AR (as measured in the presence of 5 X 10⁻⁸ M betaxolol to isolate the β_2 AR signal) remained at the surface after 2 hours of agonist stimulation (Figure 2.8a). In the presence of the β_1 AR, the amount of β_2 AR which remained at the cell surface after 2 hours of agonist stimulation was 108 \pm 25% confirming our observations made using confocal microscopy. No changes were seen in the total numbers of receptors under these conditions as determined with CYP (data not shown). To further verify these results, we also measured cell surface expression of extracellularly tagged (N-terminus) β_2 AR using an ELISA. Again in the presence of the β_1 AR, the amount of β_2 AR internalized is markedly reduced. When the β_2 AR is expressed alone, 52 \pm 10% of c-*myc* tagged receptors remain at the surface after 60 minutes of 10 μ M isoproterenol in comparison with 84 \pm 6.6% when the β_1 AR is present (Figure 2.8b). Taken together, these results demonstrate that β_2 AR trafficking is altered in the presence of the β_1 AR.

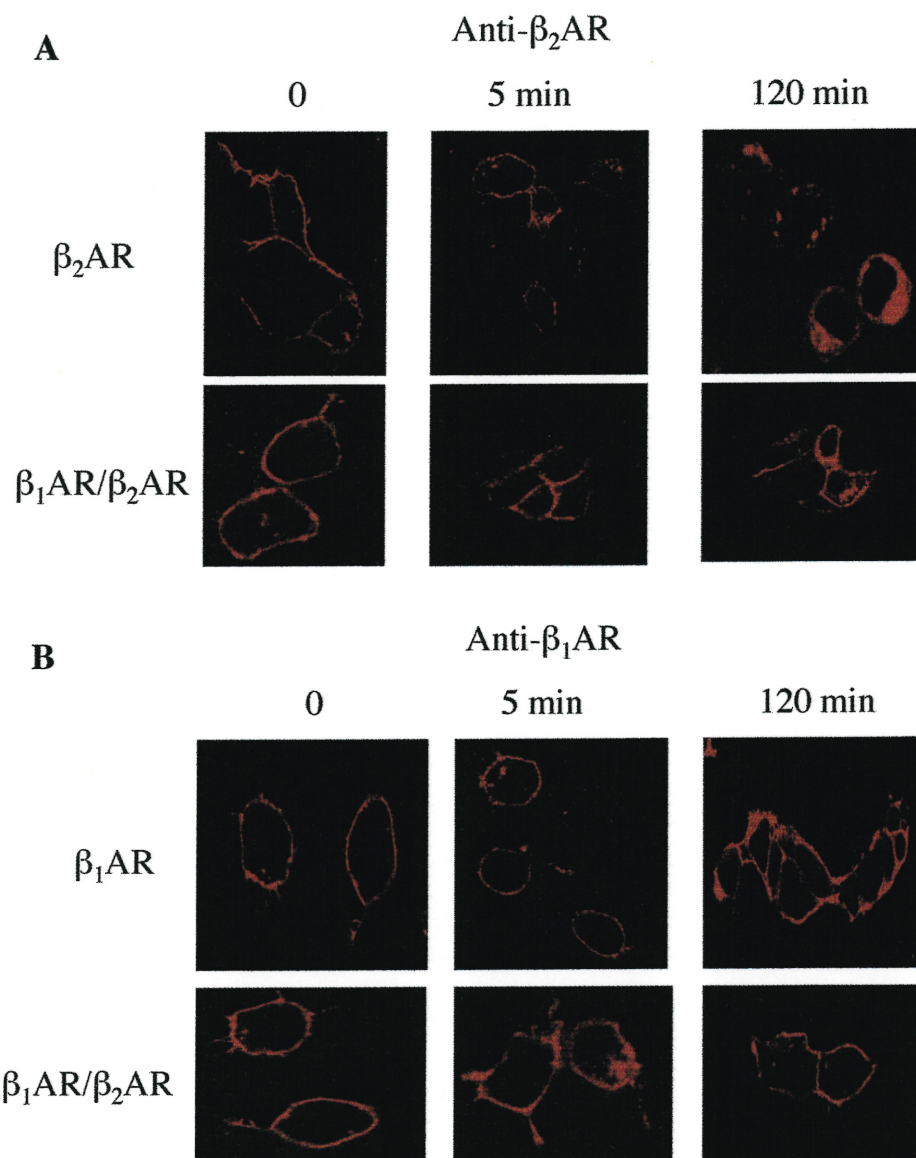


Figure 2.6: *Distribution and trafficking of β_1 AR or β_2 AR when expressed alone or as part of a putative heterodimer. Confocal images were taken from fixed and permeabilized HEK 293 cells expressing β_1 AR, β_2 AR or the two receptors together after 0, 5 and 120 minutes of stimulation with 1 μ M isoproterenol. A) Distribution of β_2 AR when the receptor is expressed alone (Top panel) or with the β_1 AR (Bottom panel). B) Distribution of β_1 AR when the receptor is expressed alone (Top panel) or with the β_2 AR (Bottom panel). These images are representative of three separate experiments. In addition to confocal microscopy, we also confirmed the presence of both receptors by Western blotting (data not shown) to assure that both receptors are represented in the double transfections.*

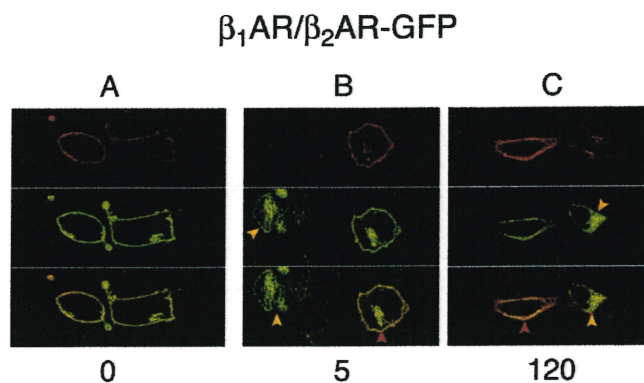


Figure 2.7: Colocalization of transiently co-transfected β_1 AR and β_2 AR-GFP in HEK 293 cells in response to agonist stimulation. Confocal images were taken from fixed and permeabilized cells expressing β_2 AR-GFP and β_1 AR before (A) and after (B, C) stimulation for various times with 10 μ M isoproterenol. Images of GFP fluorescence and staining with CY5-conjugated secondary antibody following labelling with anti- β_1 AR. Shown in order from top to bottom are anti- β_1 AR signals, GFP signals and the overlay. A representative image is shown for A) unstimulated cells which demonstrates cell surface colocalization of both receptors, B) 5 minutes and C) 120 minutes after stimulation with 10 μ M isoproterenol. Note that, in cells expressing both receptors, receptors remain colocalized at the cell surface (red arrows) while cells expressing only or predominately β_2 AR show rapid receptor internalization (yellow arrows).

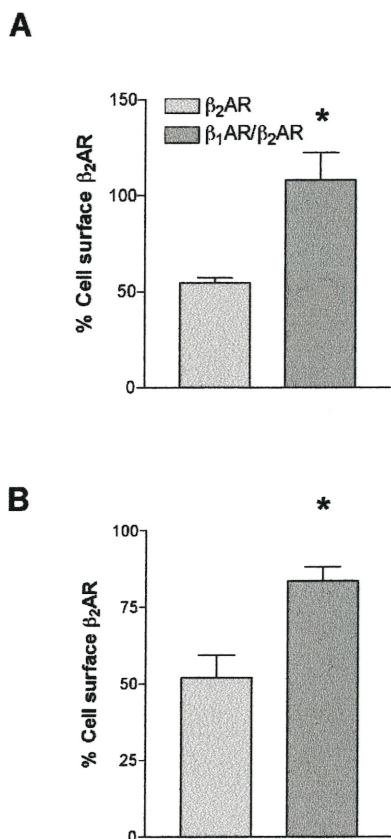


Figure 2.8: Quantification of β_2 AR internalization in absence and presence of co-transfected β_1 AR. A) Loss of cell surface (CGP 12177) binding to β_2 AR after 120 minutes of stimulation at 37° C with 10 μ M isoproterenol was determined in the presence of 5 X 10⁻⁸ M betaxolol to isolate the β_2 AR signal. Shown are mean +/- SEM for % cell surface β_2 AR remaining after agonist stimulation in the presence and absence of co-expressed β_1 AR (n=3 for both conditions). Data were compared with cell surface binding in unstimulated cells, which was normalized to a value of 100%. Samples were controlled for changes in total receptor binding as determined with CYP. B) ELISA to measure cell surface β_2 AR. Shown are mean +/- SEM for % N-terminally tagged myc- β_2 AR-Rluc receptors remaining at the cell surface after 60 minutes of agonist stimulation at 37° C in the presence and absence of co-expressed β_1 AR-GFP10 (n=3 for both conditions). Data are shown relative to cells stimulated with vehicle. Expression levels in all of the experiments were between 1-3 pmol of total β AR.

2.5 Discussion

We have demonstrated that, in addition to forming homodimers, β_1 AR and β_2 AR can also form heterodimers when co-expressed in HEK 293 cells. These interactions were shown both by co-immunoprecipitation and BRET assays in living cells. Cell surface co-immunoprecipitation experiments revealed that the heterodimer was expressed at the plasma membrane. Further, an analysis of the processing of receptors, as assessed by their sensitivity to endoglycosidase H or PNGase F (data not shown) indicated that fully mature receptors were forming dimers.

We have demonstrated that co-expression of the two receptors leads to altered functional properties in the putative heterodimer, suggesting that the β_1 AR and β_2 AR interact as a heterodimer to yield a novel β AR subtype with unique functional properties. This is manifested by the complete loss of ERK1/2 MAP kinase stimulation by isoproterenol when the two receptors were co-expressed. Given that the β_1 AR, when expressed alone, was also incapable of stimulating ERK1/2, our results suggest that the heterodimers display a coupling pattern characteristic of the β_1 AR. Previous studies have also demonstrated that the β_1 AR is less effective than β_2 AR in stimulating ERK1/2 MAP kinase (Chesley *et al.*, 2000; Sabri *et al.*, 2000). To our knowledge, however, this is the first report indicating that cells co-expressing the two receptors may have blunted ERK1/2 responses to β -adrenergic stimulation.

Both the β_1 AR and β_2 AR are expressed in the cardiovascular system and more particularly, both receptors are co-expressed in cardiomyocytes. One potential consequence of this crosstalk regulation of the ERK1/2 pathway through receptor heterodimerization may manifest itself in the modulation of signaling by β -adrenergic stimulation. For example, recent reports have demonstrated that phospholipase A₂ (PLA₂) translocation to the plasma membrane, stimulated by the β_2 AR, is an important mediator of β_2 AR-mediated positive inotropy in embryonic chick cardiomyocytes (Pavoine *et al.*, 1999; Magne *et al.*, 2001). In these cells, β_2 AR stimulation leads to arachidonic acid release via PLA₂ resulting in an increased release of calcium from sarcoplasmic reticulum stores. Further, these authors have also demonstrated that this β_2 AR response is ERK1/2-dependent. These effects of β_2 AR stimulation on intracellular free calcium and positive inotropy in embryonic

chick heart myocytes might be masked by activation of β_1 AR and this possibility was considered by the authors of the studies cited above (Magne *et al.*, 2001). It is likely that this type of regulation may also occur in mammalian cardiomyocytes as well. It has been demonstrated that β AR stimulation of ERK1/2 may play a role in the development of cardiac hypertrophy (Zou *et al.*, 1999). Upregulation of a β_2 AR-specific signal may also be important when one considers the pro-apoptotic effects of β_1 AR stimulation and the anti-apoptotic effects of β_2 AR stimulation on the myocardium (Chesley *et al.*, 2000; Communal *et al.*, 1998). This may be particularly important during the progression to heart failure when the β_1 AR is selectively down-regulated, potentially unmasking and increasing the impact of signaling pathways specific to the β_2 AR.

Several lines of evidence derived from transgenic and knockout mice also support the functional importance of β_1 AR/ β_2 AR heterodimerization. For example, high levels of β_2 AR overexpression led to an impairment of cardiac β_1 AR function which is relieved using β_2 AR inverse agonists such as ICI 118,551 (Zhang *et al.*, 2000). Also, responses to β_2 -specific agonist stimulation were lost in mice with homozygous deletion of the β_1 AR, even though cardiac β_2 AR number and distribution remained similar to WT animals (Rohrer *et al.*, 1996) and Zhu *et al.*, (unpublished observations¹). Taken together, these data are consistent with the notion that each receptor in some way depends on the other for function.

The fact that β_1 AR and β_2 AR had similar abilities to modulate adenylyl cyclase precludes determination of whether or not heterodimerization effects this pathway. Previous studies had suggested that the β_1 AR had a reduced efficacy to stimulate adenylyl cyclase when compared with the β_2 AR (Rousseau *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1993). It was later demonstrated that this decreased efficacy was characteristic of a particular β_1 AR variant (glycine at position 389) whereas the most common polymorphism (R389) has similar efficacy as the β_2 AR (Mason *et al.*, 1999). As we were using the R389 β_1 AR variant, it is not surprising that β_1 AR and β_2 AR had similar abilities to stimulate adenylyl cyclase. In the case of p38 MAP kinase, we

¹ Zhu, W., C. Lavoie, J.-F. Mercier, M. Bouvier, T.E. Hébert, Lakatta, E.G. and R.-P. Xiao, manuscript in preparation.

again demonstrate that the β_1 AR phenotype dominates over the β_2 AR when the two receptors are co-expressed in HEK 293 cells, although β -adrenergic stimulation of p38 MAP kinase is much more modest than for ERK1/2 MAP kinase. We could not detect stimulation of p38 MAP kinase via the β_2 AR alone. This may not be the case for all cell types, as stimulation of both β_1 AR and β_2 AR were shown to be coupled to the activation of p38 MAP kinase in adult murine cardiomyocytes (Zheng *et al.*, 2000;Zhu *et al.*, 2001).

We have demonstrated that the loss of p42/44 ERK MAP kinase stimulation in the heterodimer is accompanied by a reduced ability for the receptor to be internalized. A number of previous studies have demonstrated that internalization of the β_2 AR is required for these distal signaling events to occur (Jordan *et al.*, 2001;Pierce *et al.*, 2000;Luttrell *et al.*, 1999;Tsao and Von Zastrow, 2001). Further experiments will be needed to determine if the presence of the β_1 AR in the putative heterodimer is directly responsible for the alteration in receptor trafficking and ERK activation. Another recent study has shown that a β_2 AR/ δ -opioid receptor heterodimer was also defective for both p42/44 ERK MAP kinase activation and agonist-mediated receptor internalization (Jordan *et al.*, 2001). These authors also showed that a β_2 AR/ δ -opioid receptor heterodimer which could be internalized could still stimulate the ERK pathway. Taken together these results suggest that novel heterodimeric receptors can have altered trafficking itineraries which have functional consequences.

Several studies have demonstrated that β_2 AR-stimulated ERK1/2 activity requires the recruitment of β -arrestin which acts as a scaffolding protein to assemble the ERK1/2 signaling cascades (see (Miller and Lefkowitz, 2001) for review). The fact that the β_1 AR has been shown to recruit β -arrestin much less efficiently than the β_2 AR (Shiina *et al.*, 2000;Shiina *et al.*, 2001) may provide a mechanistic explanation for the inhibitory effect of receptor heterodimerization on ERK1/2 activation. The heterodimer may therefore also have a reduced ability to promote the assembly of the ERK1/2 signaling complex.

Although co-expression of the β_1 AR completely inhibited β_2 AR-stimulated ERK1/2 MAP kinase activity in HEK 293 cells, β_2 AR stimulation does result in MAP kinase activation in cardiac tissue and in isolated cardiomyocytes. Given that these cells express both β_1 AR and β_2 AR, there must be a mechanism of sequestering the β_2 AR away from the β_1 AR. One can suppose that there are specialized targeting events which exclude the β_1 AR from subcellular domains where the β_2 AR is found. Interestingly, agonist stimulation causes translocation of the β_2 AR out of caveolae in neonatal cardiomyocytes while the relative distribution of the β_1 AR between caveolae and the bulk plasma membrane remains constant (Rybin *et al.*, 2000; Ostrom *et al.*, 2001). This may provide a mechanism for physical segregation of the β_2 AR allowing it to escape dominant negative regulation by the β_1 AR which in cardiomyocytes may outnumber the β_2 AR by a factor of 3.

Putative functional importance for GPCR heterodimerization is not limited to the β_1 AR/ β_2 AR. For example, obligate heterodimerization is required for signaling via GABA_B receptors (see (Billinton *et al.*, 2001) for review) and for mammalian taste receptors (Nelson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002). Another example of crosstalk between signaling pathways involving heterodimerization is provided by observation that AT₁ and AT₂ angiotensin II receptor association negatively regulates signaling via AT₁ receptors (AbdAlla *et al.*, 2001). Alterations in ligand binding properties have also been attributed to the formation of heterodimers. For instance, co-expression of μ - and δ -opioid receptors (George *et al.*, 2000) or of D2 and D3 dopamine receptors (Scarselli *et al.*, 2001) leads to novel ligand binding properties not seen when either single receptor was expressed alone.

In summary, our results demonstrate that β AR subtypes can form heterodimers with altered functional properties. Given the wide distribution of β_1 AR and β_2 AR, it will be critical to assess the importance of heterodimerization in the trafficking, subcellular distribution and signaling of each receptor subtype in native tissues. In view of the increasing number of reports of GPCR heterodimerization, crosstalk between receptor subtypes that involves oligomerization may represent a general regulatory mechanism.

2.6 Acknowledgements

TEH is a MacDonald Scholar of the Heart and Stroke Foundation of Canada. MB holds a Canada Research Chair in Molecular and Cellular Pharmacology. This work was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Québec and the Canadian Institutes for Health Research to TEH and MB. CL was supported by a scholarship from the Institut de Cardiologie de Montréal and J-FM was supported by a scholarship from the Fonds de Formation Chercheurs et Aide Recherche/ Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FCAR-FRSQ). We would like to thank Bruce Allen, Stéphane Angers, Benoit Boivin and Nathalie Ethier for helpful discussions, Sylvain Durocher for assistance with graphics and Mireille Caron for the β_1 AR-Rluc construct.

Chapitre 3: Deuxième article

Ma contribution à cet article est très importante. En effet, j'ai réalisé toutes les études de BRET entre β_1 et β_2 AR. Les courbes de saturation de BRET et les droites de corrélation Binding/Luminescence ou Binding/Fluorescence ont été réalisées dans le cadre du projet d'hétéro-dimérisation entre β_1 et β_2 AR. Dans le cadre du projet de détermination du nombre de dimères dans la population totale de β_2 AR, j'ai autant contribué à cette étude que mon collègue Ali Salahpour. De plus, j'ai entièrement écrit cet article sous la supervision de mon directeur de recherche, Michel Bouvier.

Quantitative Assessment of β_1 and β_2 -Adrenergic Receptor Homo and Hetero-Dimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer.

Jean-François Mercier*, Ali Salahpour*, Stéphane Angers, Andreas Breit and Michel Bouvier†

Département de Biochimie and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal, Qc H3C 3J7 Canada

* These authors contributed equally to the manuscript.

Running Title: Energy Transfer Analysis of β -Adrenergic Receptor Dimers

† To whom correspondence should be addressed

Michel Bouvier

Département de Biochimie, Université de Montréal

C.P. 6128, succursale Centre-Ville

Montréal, Qc

Canada H3C 3J7

Phone (514) 343-6372

Fax (514) 343-2210

E-mail: michel.bouvier@umontreal.ca

3.1 Abstract

Quantitative Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) analysis was applied to the study of β_1 and β_2 -adrenergic receptor homo and hetero-dimerization. In order to assess the relative affinity between each of the protomers, BRET saturation experiments were carried out in HEK-293T cells. β_1 and β_2 -adrenergic receptors were found to have similar propensity to engage in homo- and heterotropic interactions suggesting that, at equivalent expression levels of the two receptor subtypes, equal proportion of homo and hetero-dimers would form. Analysis of the data also revealed that, at equimolar expression levels of energy donor and acceptor, more than 80% of the receptor molecules exist as dimers and that this high incidence of receptor dimerization is insensitive to receptor density for expression levels varying between 400 fmol and 14.5 pmol of receptor/mg of membrane protein. Taken together, these results indicate that most of the receptors expressed in cells exist as constitutive dimers and that, at least in undifferentiated fibroblasts, the proportion of homo and hetero-dimers between the closely related β_1 and β_2 -adrenergic receptors is determined by the law of mass action.

3.2 Introduction

G protein-coupled receptors (GPCR)² represent the largest family of transmembrane receptors involved in cell signaling. In the past few years, many studies indicated that GPCRs dimerization can occur between two identical receptors (homo-dimerization), between two different receptor subtypes of the same family or even between receptors that are only distantly related (hetero-dimerization) (for a review, see (Bouvier, 2001;Angers *et al.*, 2002)). In most instances, co-immunoprecipitation was used as the primary experimental evidence supporting the existence of such dimers. More recently, however, light resonance energy transfer techniques such as Fluorescence and Bioluminescence Resonance Energy Transfer (FRET and BRET) were also used. These “non-invasive” proximity-based assays confirmed that GPCR dimerization does not represent biochemical artifacts due to receptor solubilization and can occur in living cells. They have been used to demonstrate homo-dimerization of the β_2 -adrenergic (Angers *et al.*, 2000), the yeast alpha mating factor (Overton and Blumer, 2000), the SST5 somatostatin (Rocheville *et al.*, 2000b), the gonadotropin releasing hormone (Cornea *et al.*, 2001), the luteinizing hormone (Roess *et al.*, 2000), the δ -opioid (McVey *et al.*, 2001), the thyrotropin-releasing hormone (Kroeger *et al.*, 2001), the cholecystokinin (Cheng and Miller, 2001) and the melatonin (Ayoub *et al.*, 2002) receptors as well as hetero-dimerization between somatostatin receptor subtypes (Rocheville *et al.*, 2000b), somatostatin and dopamine receptors (Rocheville *et al.*, 2000a), melatonin receptor subtypes (Ayoub *et al.*, 2002) and opioid receptor subtypes (Ramsay *et al.*, 2002).

An advantage of BRET and FRET over co-immunoprecipitation approaches lies in the more quantitative nature of the assay. However, relatively few studies exploited this quantitative potential for the study of GPCR dimerization. For the melatonin receptors, Ayoub *et al.* recently used BRET competition assays to determine that the transfer of energy resulted from the formation of dimers and not of

² GPCR, G protein-coupled receptor; BRET, Bioluminescence resonance energy transfer; FRET, Fluorescence resonance energy transfer; β_1 AR, β_1 -adrenergic receptor; β_2 AR, β_2 -adrenergic receptor; MTR, Melatonin receptor; GFP, Green fluorescent protein; Rluc, *Renilla* luciferase; CYP, Cyanopindolol.

higher order oligomers (Ayoub *et al.*, 2002). They also showed that ligand binding did not alter the dimerization state of the receptors. However, other questions that could theoretically be addressed by quantitative energy transfer analysis such as the relative affinity of the dimer partners for each other and the relative proportion of receptors engaging in dimer formation have not yet been addressed.

β_2 and β_1 -adrenergic receptors (β_2 AR and β_1 AR) have previously been shown to exist as homo-dimers (Hebert *et al.*, 1996;Angers *et al.*, 2000;McVey *et al.*, 2001;Xu *et al.*, 2001). The high level of sequence identity existing in domains proposed to contribute to the dimerization interface (i.e. transmembrane helices) (Hebert *et al.*, 1996;George *et al.*, 1998) makes them a system of choice to study their potential hetero-dimerization and the relative affinity of the protomers within homo- and heterotropic complexes. Although direct *in vivo* demonstration for the co-localization of the two receptor subtypes in the same cell is still lacking, the presence of β_1 and β_2 AR in the same cell types has been taken as evidence for their co-expression in transitional and mid-nodal cells of the atrio-ventricular node, nerve processes of the atrio-ventricular and ventricular conduction systems as well as in vascular smooth muscle cells of the kidney (Petrecca and Shrier, 1998;Boivin *et al.*, 2001). The fact that the two receptor subtypes are also found together in a large number of tissues, including liver, lung, and fat (Sano *et al.*, 1993), gives further support to the idea that hetero-dimerization could occur in native tissues and warrants investigations aiming to assess the likelihood of such intermolecular complexes.

Here, quantitative BRET approaches were applied to the study of β_1 and β_2 -adrenergic receptors dimerization in a heterologous mammalian expression system. In particular, BRET saturation experiments were carried out to estimate the relative affinity of each receptor subtype to engage into homo- and heterotropic interactions. The influence of receptor density on the proportion of receptor molecules forming dimers was also assessed. Here, we report that β_1 and β_2 AR can form homo and hetero-dimers and that the two receptors have similar affinities for each other and for themselves suggesting that hetero-dimers are likely to form in cells expressing both subtypes. The proportion of receptor molecules forming dimers was also found to be

greater than 80% at low receptor density and was constant over a 20 fold expression range.

3.3 Experimental Procedures

Receptor constructs

β_1 AR-GFP10. The β_1 AR coding sequence without its stop codon was amplified from the pBC12BI-human β_1 AR plasmid (Frielle *et al.*, 1987) using sense and antisense primers harboring unique *SacI* and *AgeI* sites. The fragment was then subcloned in-frame into the *SacI/AgeI* site of the blue variant GFP-sapphire vector (pGFP-N1-Sapphire; Packard Bioscience) to give the plasmid pGFP-N1- β_1 AR-Sapphire. Finally, the GFP-Sapphire was replaced by a green GFP variant (GFP10) containing the following mutations: P64L, S147P, and S202P. For this purpose, an *AgeI/BsrGI* fragment of the GFP10 was subcloned into the *AgeI/BsrGI* site of the pGFP-N1- β_1 AR-Sapphire to finally yield pGFP-N1- β_1 AR-GFP10. *β_2 AR-GFP10*. The GFP10 *AgeI/BsrGI* fragment was subcloned into the *AgeI/BsrGI* site of pGFP-N1-His β_2 AR-YFP (Angers *et al.*, 2000). For simplicity sake, GFP10 will be referred to as GFP in the remainder of the text. *β_1 AR-Rluc*. The pcDNA3.1- β_1 AR:6aa:hRluc was a generous gift from BioSignal Packard. This fusion protein contains a linker of 6 amino acids (YGPPGS) linking the carboxyl tail of the human β_1 AR and the humanized Rluc. *β_2 AR-Rluc*. The humanized Rluc coding sequence (pRluc(h); Packard Bioscience) was amplified using sense and antisense primers and subcloned into the PCR Blunt II Topo vector (Invitrogen). The hRluc fragment was excised by digestion with *KpnI/XbaI* and subcloned into the *KpnI/XbaI*-digested pcDNA3.1 Zeo vector to generate the pcDNA3.1 Zeo/hRluc plasmid. The human His β_2 AR coding sequence was amplified without its stop codon using sense and antisense primers. The PCR product was subcloned into PCR Blunt II Topo Vector, then excised by double digestion with *HindIII/KpnI* and ligated into the *HindIII/KpnI*-digested expression vector pcDNA3.1Zeo/hRluc. The resulting construct encodes a six amino acid linker (GSGTGS) between the carboxyl terminal of the β_2 AR and the humanized Rluc sequence.

Cell culture and transfection

HEK-293T cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine (all from Wisent). For transfection experiments, cells were seeded at a density of 2×10^6 cells per 100-mm

dish and cultured for 24 hours. Transient transfections were then performed using the calcium phosphate precipitation protocol (Mellon *et al.*, 1981). 24 hours after transfection, DMEM medium was replaced and the cells were then cultured in the same medium for an additional 24 hours.

Forty-eight hours post-transfection, cells were washed twice with PBS, detached with PBS/EDTA and resuspended in PBS/glucose 0.1%. On a routine basis, the protein concentration of the samples was determined to control for the number of cells using Bio-Rad's Bradford assay kit with bovine serum albumin as a standard.

BRET measurement

We have used a slight modification of the previously published BRET assay (Xu *et al.*, 1999; Angers *et al.*, 2000). The new BRET² technology (BioSignal Packard) takes advantage of the spectral properties of a luciferase substrate known as Deep Blue coelenterazine (DeepBlueC; Packard Bioscience) that allows a better separation between the *Renilla* luciferase (*Rluc*) and the Green Fluorescent Protein (GFP) emission spectra. Upon the catalytic degradation of DeepBlueC, the energy donor *Rluc* emits light with a peak at 400 nm that allows the excitation of the energy acceptor, GFP. Once excited, GFP then reemits fluorescence with a peak at 510 nm if the donor and acceptor molecules are within BRET permissive distance (< 100 Å).

Following harvesting, cells were distributed in 96-well microplates (white Optiplate from Packard Bioscience) at a density of ~ 100,000 cells per well. DeepBlueC was added at a final concentration of 5 μM, and readings were collected using a modified Top-count apparatus (BRETCount; Packard Bioscience) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370-450 and 500-530 nm windows using filters with the appropriate band pass (Chroma). The BRET signal is determined by calculating the ratio of the light emitted by the Receptor-GFP (500-530 nm) over the light emitted by the Receptor-*Rluc* (370-450 nm). The values were corrected by subtracting the background signal detected when the Receptor-*Rluc* constructs were expressed alone.

Fluorescence and Luminescence measurement

Cells were distributed in 96-well microplates (white Costar plate with clear bottom) at a density of ~ 100,000 cells per well. The total fluorescence of cells was measured using a FluoroCount (Packard Bioscience) with an excitation filter at 400 nm, an emission filter at 510 nm and the following parameters: Gain 1; PMT 1100 V; Time 1.0 sec. After the fluorescence measurement, the same cells were incubated for 10 min with Coelenterazine H (Molecular Probe) at a final concentration of 5 μ M and the total luminescence of cells measured using a LumiCount (Packard Bioscience) with the following parameters: Gain 1; PMT 700 V; Time 0.5 sec. For both measurements, the mean of duplicate wells was calculated. The total fluorescence was then divided by the background determined in wells containing untransfected cells. Fluorescence was expressed in fold over background. The background being negligible for the luminescence measurements, these were expressed as absolute values.

Radioligand Binding Assay

Forty-eight hours after transfection, ~ 10,000 cells (2 μ g of proteins) were incubated in a final volume of 500 μ l of PBS containing 0.1% BSA with a saturating concentration (250 pM) of the β -adrenergic antagonist [125 I]-Cyanopindolol ([125 I]-CYP). Non-specific binding was determined as the residual binding observed in the presence of 10 μ M alprenolol (Sigma). Binding reactions were carried out at room temperature for 90 min and stopped by rapid filtration over Whatman GF/C glass-fiber filters. Receptor densities are expressed in femtomoles of receptor per milligrams of total cell proteins assuming one binding site per receptor molecule. Linear regression curves between the luminescence and fluorescence signals and the number of receptor determined by radio-ligand binding were then generated from cells expressing each of the constructs individually. To determine receptor surface density, the surface of HEK-293T cells was determined by measuring the average length and width of the cells under phase contrast microscopy.

Light emission/receptor binding correction factor

Given that the correlations between receptor numbers and the luminescence or fluorescence levels were intrinsic characteristics of each of the constructs, comparison between receptor densities derived from the light measurements

required a correcting factor. This correction was achieved using the linear regression generated for each constructs (see legend to figure 3.2) and by normalizing the light emission/receptor number as a function of the steeper slope factor obtained for both *Rluc* and GFP. These corrected receptor number values were then used to generate the corrected BRET saturation curves presented in figure 3.3.

3.4 Results and Discussion

Homo and hetero-dimerization of the β_1 and β_2 AR were investigated by quantitative BRET analysis. For this purpose, human β_1 and β_2 AR cDNAs were fused at their C-terminus to the energy donor *Rluc* and acceptor GFP. The affinity of the fusion proteins for the antagonist cyanopindolol and the agonist isoproterenol as well as the potency of isoproterenol to stimulate adenylyl cyclase were undistinguishable from those of the wild-type receptors (data not shown).

BRET and FRET approaches have been used in several studies to assess GPCR homo and hetero-dimerization (Angers *et al.*, 2002). In most cases, little attention has been paid to the ratio of donor/acceptor molecules that was used in the assays and thus the interpretation of the data remained rather qualitative. However, controlling this parameter is essential for proper quantitative analysis. Indeed, the level of energy transfer detected for a given concentration of donor should rise with increasing concentration of the acceptor until all donor molecules are engaged by an acceptor. It follows that the energy transfer should reach a plateau and that saturation curves could theoretically be constructed. The maximal level reached should be a function of the total number of dimers formed and of the distance between the donor and acceptor within the dimers while the concentration of acceptor giving 50% of energy transfer ($BRET_{50}$) should be a reflection of the relative affinity of the acceptor-fusion for the donor-fusion proteins. Here, we applied this theoretical framework to the study of β_1 and β_2 AR homo and hetero-dimerization by constructing BRET saturation curves in cells co-transfected with a constant amount of receptor-*Rluc* construct and increasing concentrations of the receptor-GFP plasmids. As shown in figure 3.1, significant BRET signals were observed for the β_2 AR/ β_2 AR and β_1 AR/ β_1 AR pairs confirming previous findings that both receptor subtypes can form homo-dimers (Hebert *et al.*, 1996; Angers *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001). Albeit to a lower extent, co-expression of the two subtypes also led to a sizable BRET signal for the two transfer orientations (i.e. β_1 AR-*Rluc*/ β_2 AR-GFP and β_2 AR-*Rluc*/ β_1 AR-GFP). In all cases, BRET increased as a hyperbolic function of the concentration of the GFP-fusion construct added (assessed by the fluorescence

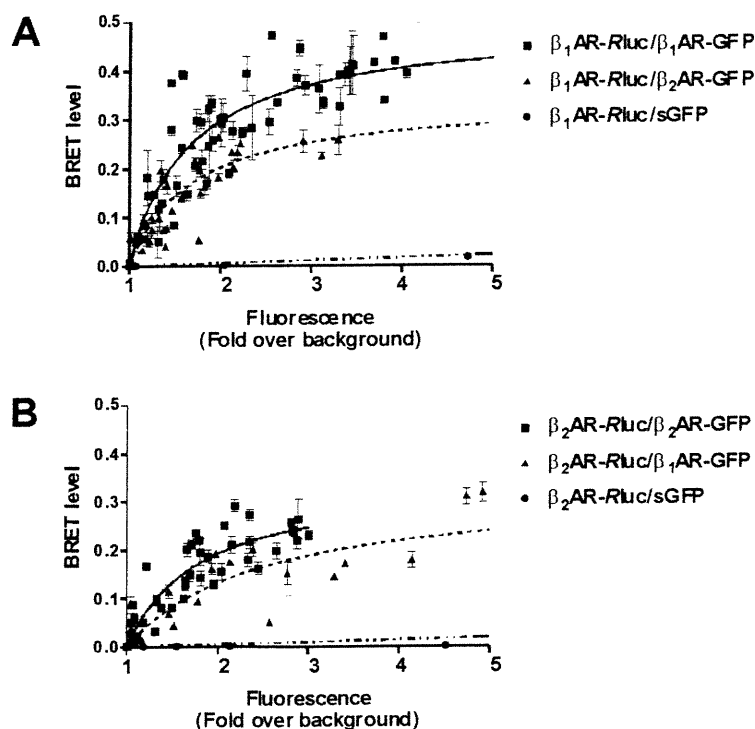


Figure 3.1: BRET saturation curves. HEK-293T cells were co-transfected with a constant DNA concentration of $\beta_1\text{AR-Rluc}$ (A) or $\beta_2\text{AR-Rluc}$ (B) and increasing DNA concentrations of $\beta_1\text{AR-GFP}$, $\beta_2\text{AR-GFP}$ or soluble GFP. The BRET, total luminescence and total fluorescence were measured forty-eight hours after transfection. BRET levels are plotted as a function of the total fluorescence signal (fold over background) used as an index for the concentration of receptor-GFP constructs expressed. The results are expressed as the mean \pm S.E.M. of 3-10 independent experiments carried out in triplicates. The curves were fitted using a non-linear regression equation assuming a single binding site (GraphPad Prism).

emitted upon direct excitation at 400 nm) reaching an asymptote at the highest concentrations used. Co-expression of β_2 or $\beta_1\text{AR-Rluc}$ with soluble GFP led to marginal signals that increased linearly with increasing amount of GFP added. Stimulation with the agonist isoproterenol did not promote any consistent change in the BRET saturation curves (data not shown) indicating that the dimers form constitutively and that receptor activation does not affect their oligomerization state. However, one cannot exclude the possibility that agonist stimulation could promote assembly/disassembly cycles that do not affect the steady-state proportion of receptors engaged in dimers. The modest agonist-promoted increase in BRET, previously reported for the $\beta_2\text{AR}$ homo-dimer using BRET¹ (Angers *et al.*, 2000), most likely reflected conformational changes that could not be detected using

BRET². Indeed, the better resolution between the emission peaks of *Rluc* and GFP with BRET² discussed in the *Experimental Procedures* is not the only difference between the two generations of BRET. In particular, the quantum yield of the *Rluc*/DeepBlueC coelenterazine couple is lower than that of *Rluc*/coelenterazine H and the extent of overlap between the emission spectra of *Rluc* and the excitation of the GFPs is better for BRET² than BRET¹. These parameters can influence the sensitivity of the assays to detect small changes in distance between energy donors and acceptors. The notion that certain BRET configurations but not others allow the detection of conformational changes induced by ligands is also well exemplified by the recent observation that agonist and antagonist binding increased the BRET between the melatonin MTR1-*Rluc* and MTR2-GFP but not between MTR2-*Rluc* and MTR1-GFP (Ayoub *et al.*, 2002).

Although the curves generated concur with the theoretical behavior predicted above, quantitative analysis is complicated by the lack of direct information provided by the fluorescence and luminescence measurements on the precise concentration of receptor molecules expressed. In the absence of such information, determining the relative affinity of the protomers for each other, based on these saturation isotherms, would require that the correlations between light emission and the number of receptor-GFP and -*Rluc* fusion molecules are linear and identical for the two receptors considered. To directly test this supposition, cells were transfected with increasing concentrations of receptor-GFP and -*Rluc* constructs. For each DNA concentrations, the receptors expression level was determined using [¹²⁵I]-CYP binding while the total luminescence and total fluorescence emitted by the *Rluc* and GFP fusion proteins were measured following addition of the *Rluc* substrate coelenterazine H and direct laser excitation of the GFP at 400 nm respectively. Figure 3.2 illustrates the correlation obtained between the number of binding sites and either the luminescence or fluorescence emitted by each of the receptor fusion molecules. Even though the regression curves were highly linear, their slopes were different for the two receptors considered. Indeed, the GFP and *Rluc* signals increased more rapidly with receptor number for the β_1 than the β_2 AR. Although the exact cause for this difference remains unknown, this obviously complicates the analysis of the data since this difference must be taken into account to assess the relative affinity of the receptors for each other in BRET saturation curves. The linear

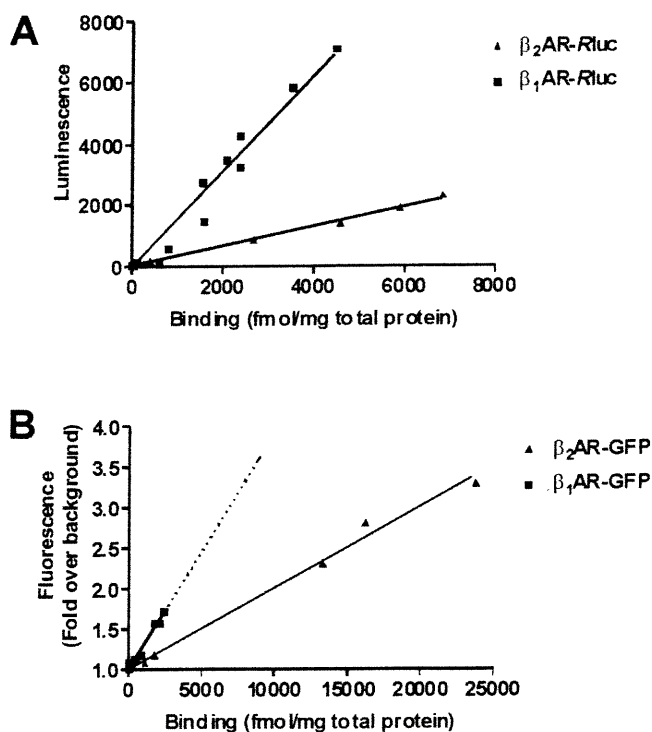


Figure 3.2: Linear relationship between total luminescence (A) or total fluorescence (B) and receptor density. HEK-293T cells were transfected with increasing DNA concentrations of β_1 or β_2 AR-Rluc (A) or -GFP (B) fusions. Receptor density was determined by radioligand binding assays using [125 I]-CYP as the tracer. The total fluorescence was measured following excitation at 400 nm and detection at 510 nm while the total luminescence was recorded following the addition of the Rluc substrate, coelenterazine H. The linear regression curve was generated using GraphPad Prism. The dotted line corresponds to the extrapolation of the linear regression for the β_1 AR-GFP. The linear regression equations used to calculate the receptor amount for a given luminescence or fluorescence intensity are as follows: β_1 AR-Rluc: $y = 1.5540(x) + 20.00$; β_2 AR-Rluc: $y = 0.3192(x) + 20.00$; β_1 AR-GFP: $y = 0.0002902(x) + 1.00$; β_2 AR-GFP: $y = 0.0001004(x) + 1.00$.

regression equations derived from figure 3.2 were thus used to transform the luminescence and fluorescence value in receptor number. Although the BRET saturation curves were carried out using a fixed concentration of the Rluc-fusion partners, co-transfecting an increasing quantity of the GFP constructs introduces some levels of variability in the amount of receptor-Rluc expressed in each case. To rule out the influence of this variable, the BRET levels were plotted as a function of the ratio between the receptor-GFP/receptor-Rluc numbers.

As shown in figure 3.3, the BRET saturation curves generated following these corrections also behaved as hyperbolic functions reaching a saturation level. The aspect of these curves greatly contrasts with that of the curve predicted if the observed BRET resulted from random collisions promoted by a high receptor density. Indeed, a quasi-linear curve would be expected if such “bystander” BRET was taking place (Kenworthy and Edidin, 1998; Zacharias *et al.*, 2002). The schematic illustration of the predicted distribution of the energy donor and acceptor in the case of dimerization vs. random collision, presented in figure 3.3C, allows to intuitively appreciate the difference between the two situations. To allow comparison, the progression of bystander BRET as a function of increasing concentration of the receptor-GFP in a given surface was modeled for the β_2 AR homo-dimer. A quasi-linear curve would be expected for bystander BRET, reaching saturation at a very high β_2 AR-GFP/ β_2 AR-Rluc ratio (Figure 3.3D). The experimental data obtained for the β_2 AR homo-dimer show that the BRET signal reaches its maximal at a β_2 AR-GFP/ β_2 AR-Rluc ratio of 2.4, ruling out the possibility that the BRET observed could reflect bystander BRET. The aspect of the experimental curve and the level of saturation of the signal thus indicate a clustering of the energy donor and acceptor molecules within BRET permissive distances that most likely reflects receptor oligomerization.

In an effort to distinguish between dimers and higher order oligomers, we modeled the BRET saturation curves using an equation (modified from (Veatch and Stryer, 1977)) that describes the probability of forming BRET competent complexes as a function of the number of receptors within a complex (i.e.: dimer vs. trimer vs. tetramer, etc). Figure 3.3D shows that the experimental curve fits much better to the theoretical dimer curve than that predicted for a trimer suggesting that the BRET obtained from co-expression of β_2 AR-Rluc and β_2 AR-GFP results from the formation of dimeric complexes of this receptor.

When comparing the BRET saturation curves obtained for the β_1 and β_2 AR homo and hetero-dimers (Figure 3.3A and B), similar BRET₅₀ values were obtained for all pairs considered (Table III.I) indicating that the receptors had similar relative affinities for one another. This has important implications since it suggests that, under basal conditions, β_1 and β_2 AR homo and hetero-dimers have similar

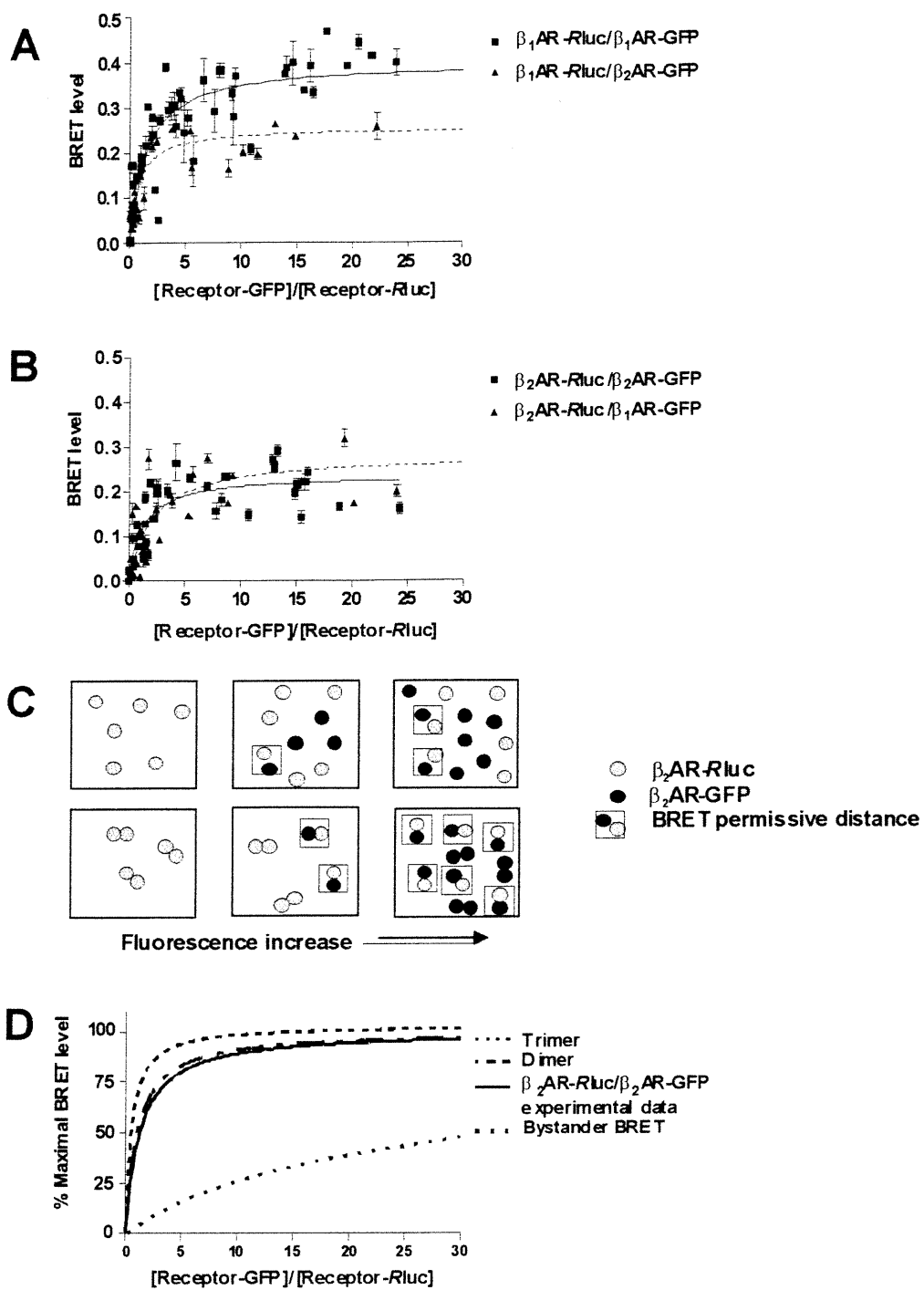


Figure 3.3: A-B) Corrected BRET saturation curves. The fluorescence and luminescence data from figure 3.1 were transformed into receptor numbers using equations from figure 3.2 and taking the slope factor into account as indicated in the *Experimental Procedures*. The BRET levels are plotted as a function of the ratio of [Receptor-GFP]/[Receptor-Rluc]. The total number of receptors expressed ranged from: $\beta_1\text{AR}/\beta_1\text{AR}$ 0.8-23 pmol/mg; $\beta_1\text{AR}/\beta_2\text{AR}$ 0.8-17 pmol/mg; $\beta_2\text{AR}/\beta_1\text{AR}$ 0.3-37 pmol/mg; $\beta_2\text{AR}/\beta_2\text{AR}$ 0.3-8 pmol/mg. The curves were fitted using a non-linear regression equation assuming a single binding site (GraphPad Prism). C) Schematic representation of the distribution of the energy donor (Receptor-Rluc) and acceptor (Receptor-GFP) in the case of random collision (upper panel) vs. dimerization (lower panel) when the density of energy donor is maintained constant while that of the acceptor is increased. D) Modeling of the evolution of BRET resulting from random collision between energy donor and acceptor ("bystander BRET") as a function of increased acceptor surface density. The experimentally determined surface density of the cells was used for the modeling and a distance of 100 Å was used as the minimum BRET permissive distance. The experimental data of $\beta_2\text{AR-Rluc}/\beta_2\text{AR-GFP}$ presented in B are also compared with the expected BRET saturation curve for trimeric and dimeric complexes using an equation that describes the probability of forming BRET competent complexes [BRET competent complex = $(n \cdot d^{n-1} \cdot a + n \cdot d \cdot a^{n-1}) / (n \cdot d^n + n \cdot d^{n-1} \cdot a + n \cdot d \cdot a^{n-1})$] where "n" is the number of receptor molecule in the complex, "d" is the number of receptor-Rluc (energy donor) and "a" the number of receptor-GFP (energy acceptor).

probability of forming when the two receptors are heterologously expressed in HEK-293T cells. Co-localization of the two β -adrenergic receptors has been documented in numerous tissues (Brodde *et al.*, 1983; del Monte *et al.*, 1993; Sano *et al.*, 1993). Although it has not been easy to experimentally demonstrate co-localization in the same cells, their expression in the same cell types has been taken as evidence for the coexistence of the two receptor subtypes (Petrecca and Shrier, 1998; Boivin *et al.*, 2001). Thus, the equal chance of forming homo and hetero-dimers found in the present study could have important physiological consequences. However, future studies will be required to determine if hetero-dimerization can occur in native tissues.

The high likelihood of hetero-dimer formation between homologous receptors has also been suggested by the recent observations of Ramsay *et al.* showing that homo and hetero-dimerization of the δ and κ -opioid receptors occurred at comparable levels of receptor expression (Ramsay *et al.*, 2002). Although hetero-dimerization could also be observed between the distantly related opioid and β_2 -adrenergic receptors (McVey *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2001), this apparently takes

| | BRET _{Max} ± S.E.M. | BRET ₅₀ ± S.E.M. | |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------|
| β_1 AR-Rluc/ β_1 AR-GFP | 0.40 ± 0.015 | 1.4 ± 0.26 | n = 10 |
| β_1 AR-Rluc/ β_2 AR-GFP | 0.26 ± 0.015 | 0.76 ± 0.16 | n = 7 |
| β_2 AR-Rluc/ β_1 AR-GFP | 0.28 ± 0.029 | 2.2 ± 0.77 | n = 6 |
| β_2 AR-Rluc/ β_2 AR-GFP | 0.24 ± 0.015 | 1.2 ± 0.33 | n = 7 |

Table III.I: The BRET_{Max} is the maximal BRET obtained for a given pair and the BRET₅₀ corresponds to the concentration of acceptor giving 50% of the BRET_{Max}. The results are expressed as the mean ± S.E.M. of 6-10 independent experiments and were derived from the data presented in Figure 3.3.

place only at much higher receptor expression levels indicating that heterodimerization is more likely to occur between receptors sharing significant sequence homology.

When considering the maximal BRET values obtained in the present study, only the β_1 AR-Rluc/ β_1 AR-GFP pair was found to be significantly different from the others. Indeed, the BRET_{Max} obtained for this pair was ~ 1.5 times that observed for the other combinations (Table III.I). As indicated above, this could indicate either that a larger proportion of β_1 AR than β_2 AR can engage in dimerization or else that the relative position of Rluc and GFP within the β_1 AR homo-dimer is more permissive to energy transfer (shorter distance and/or better orientation of the dipoles). Given that the relative affinities between each of the partners were found to be very similar (Table III.I), the second hypothesis is more likely.

One of the major concerns when considering the physiological relevance of GPCR dimerization is the possibility that the high expression levels used in most studies could cause spurious interactions between receptors. If this was the case, one would expect that increasing the total level of receptor expression would lead to a proportional increase in dimer formation. In contrast, if dimerization can occur independently of receptor overexpression, no such relation should be expected. In order to distinguish between these two possibilities, BRET between β_2 AR-Rluc and β_2 AR-GFP was determined for expression levels ranging from 0.44 pmol/mg to 46.6

pmol/mg of protein. As indicated by the saturation curves presented above (see also (Kenworthy and Edidin, 1998)), such comparison can only be carried out if the donor/acceptor ratio is maintained constant for the different expression levels tested. For this purpose, the transfection experiments were set-up so to obtain equimolar expression of the β_2 AR-Rluc and β_2 AR-GFP. The expression levels were monitored by measuring the total luminescence and fluorescence signals and the receptor number calculated using the equations derived from figure 3.2. As shown in figure 3.4, constant BRET signals were obtained for total β_2 AR levels ranging from ~ 1.4 pmol/mg to ~ 26 pmol/mg when equimolar concentrations of β_2 AR-Rluc and β_2 AR-GFP were expressed. This indicates that a similar percentage of receptors engage in dimer formation over a 20 fold range in expression levels. The fact that the BRET signal is largely independent from receptor density also confirms that it originates from dimerization and not random collision events (Kenworthy and Edidin, 1998). Increases in the BRET signals were observed only when the total β_2 AR was expressed at 47 pmol/mg or above. Such increases in BRET at these very high expression levels may result from random collisions between evenly dispersed donor and acceptor molecules already engaged in dimers (Kenworthy and Edidin, 1998) or could represent artefactual aggregation occurring only at unusually high receptor numbers. Interestingly, 47 pmol/mg corresponds to a receptor surface density of 2.4 receptors/10,000 \AA^2 representing an average distance of less than 100 \AA between each receptor dimer; a distance that would be permissive to bystander BRET. These results emphasize the importance of carefully monitoring receptor expression levels in these types of studies.

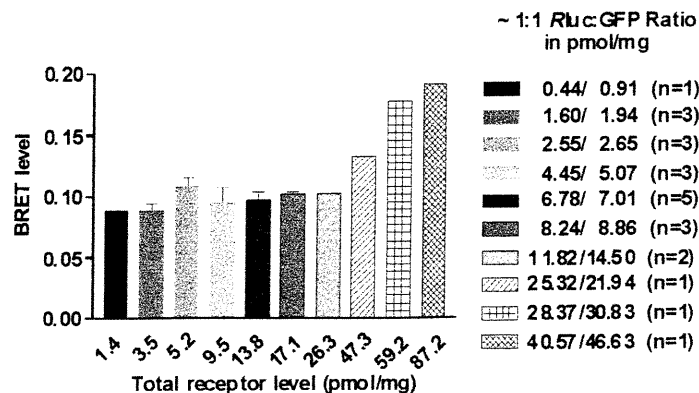


Figure 3.4: Effect of receptor expression levels on BRET determined at ~ equimolar [donor]/[acceptor] ratios. HEK-293T cells were co-transfected with increasing quantities of β_2 AR-Rluc and β_2 AR-GFP. The transfection conditions were established so that both receptor constructs were expressed at ~ equimolar levels, as determined by the total fluorescence and luminescence of the fusion proteins. BRET is expressed as a function of the total number of receptor expressed. The amount of β_2 AR-GFP and β_2 AR-Rluc are also indicated (right part of the panel). The data presented were obtained for a total of 23 independent transfections. The BRET values were then grouped according to the expression levels determined. When the data from more than two transfections were grouped, BRET values are presented as the mean \pm S.E.M. (n= 3-5).

The lowest level of receptor expression allowing the detection of BRET in the present study was 0.3 pmol/mg of protein (see legend of Figure 3.3). Such expression level is comparable to those observed in dog heart tissue (~ 0.5 pmol/mg) and only 3.75 fold over those reported for human heart tissue (~ 0.080 pmol/mg) (Laurent *et al.*, 2001;Steinfath *et al.*, 1992;Bristow, 1993;Brodde *et al.*, 1998;Brodde and Michel, 1999). Taken together, these data therefore suggest that dimerization can occur at physiologically relevant expression levels and that over-expression is not responsible for this process. Consistent with this notion, homo and hetero-dimerization has been documented in native tissues for a few endogenously expressed GPCR using co-immunoprecipitation (Kaupmann *et al.*, 1998) or Western blot analysis (Ng *et al.*, 1996;Ciruela *et al.*, 1995;Vila-Coro *et al.*, 2000;Rodriguez-Frade *et al.*, 1999;Vila-Coro *et al.*, 1999;Garzon *et al.*, 1995). The lack of adequate antibodies for co-immunoprecipitating native receptors does not allow such experiments for the endogenously expressed β_1 and β_2 AR.

In addition to confirm that the BRET signal observed did not result from an artifact of over-expression, the data presented in figure 3.4 permit to make some

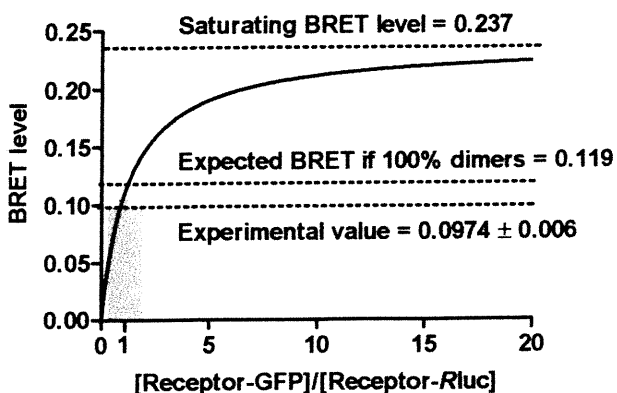


Figure 3.5: Schematic representation of the estimated percentage of β_2 AR dimers in living cells. Corrected BRET saturation curves indicated that a $BRET_{Max}$ of 0.237 could be obtained for the β_2 AR-Rluc/ β_2 AR-GFP pair. Assuming a free equilibrium between the two constructs, only 50% of the dimers should contribute to the BRET signal when donor and acceptor are expressed at equimolar concentrations. Thus a BRET signal of 0.119 would be expected if 100% of the β_2 AR existed as dimers. The average BRET value of 0.0974 experimentally observed upon expression of β_2 AR-Rluc and β_2 AR-GFP at $\sim 1:1$ ratio ($n = 20$) indicates that $82 \pm 10\%$ of the total β_2 AR population exist as dimers.

estimates of the proportion of receptors engaged in dimerization. Indeed, BRET saturation experiments presented in figure 3.3 have already indicated that the maximal level of BRET that can be obtained when all β_2 AR-Rluc are bound to a β_2 AR-GFP partner is 0.237 ± 0.015 (see the reported curve in figure 3.5). Assuming a free equilibrium between the Rluc and GFP fusion proteins, one would predict that, at equimolar concentration of the two partners, only 50% of the dimers can produce BRET (β_2 AR-Rluc/ β_2 AR-GFP dimer) while the other half cannot (β_2 AR-Rluc/ β_2 AR-Rluc and β_2 AR-GFP/ β_2 AR-GFP dimers). It follows that, if 100% of the receptors form dimers, the maximal BRET value observed at equimolar expression levels should be 0.1185 (i.e.: $0.237 \div 2$). An experimental value of 0.0974 ± 0.006 (figure 3.5) was obtained when averaging 20 BRET values recorded for equimolar expression of β_2 AR-Rluc and -GFP fusions at total expression levels varying from ~ 1.3 pmol/mg to ~ 26 pmol/mg. Based on these calculations, $82 \pm 10\%$ of the cellular contingent of β_2 AR exist as dimers.

3.5 Conclusion

Our results clearly show that, in addition to forming homo-dimers, β_1 and β_2 -adrenergic receptors form hetero-dimers at nearly physiological expression levels. The similar propensity of the receptor subtypes to form homo and hetero-dimers (ie the comparable BRET₅₀ found) could have important impact on the β_1 and β_2 AR profile in cells co-expressing the two subtypes. Indeed, relatively modest changes in the expression of one subtype should have repercussions not only on the relative proportion of the hetero-dimer but also on the amount of homo-dimers of each subtype. However, the total number of receptors engaged in dimerization should not be affected since we found that the ratio of dimer/total receptor is independent of the expression levels and remains stable at >80% for receptor concentrations spanning a 20 fold range. Although several studies suggested that GPCR can exist as constitutive dimers (Angers *et al.*, 2002), the relatively high proportion of dimeric receptor found in the present study is the first indication that dimers may be the predominant species under basal conditions. The currently available techniques do not allow to assess whether constitutive homo and hetero-dimerization occurs to a similar extent in cells endogenously expressing β_1 and β_2 AR. However, the fact that various cardiovascular diseases are associated with changes in the relative expressions of the two subtypes in heart tissues could have important impacts on the repertoire of homo and hetero-dimers expressed in a given cell (Bristow *et al.*, 1982; Bristow *et al.*, 1986; Brodde, 1991; Nguyen *et al.*, 1995). Future studies will thus be required to assess the possible functional and pathophysiological consequences of β AR homo and hetero-dimerization.

3.6 Acknowledgements

The authors are thankful to BioSignal Packard and in particular to Mireille Caron and Erik Joly for their kind gift of the β_1 AR-Rluc plasmid. We also thank Dr. Monique Lagacé for helpful advices. J-F.M. held a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, A.S. and S.A. hold studentships from the Canadian Institute for Health Research (CIHR). M.B. holds a Canada Research Chair in Molecular and Cellular Pharmacology. This work was supported by grants from the CIHR and the Heart and Stroke Foundation of Canada to M.B.

Chapitre 4: Résultats additionnels

Au cours des dernières années, mes travaux de maîtrise m'ont amené à réaliser un certain nombre d'expériences dont les résultats n'ont pas été publiés dans les deux articles scientifiques présentés précédemment. Ces résultats supplémentaires, présentés dans ce chapitre, permettent une meilleure compréhension du rôle potentiel de l'hétéro-dimère β_1 AR/ β_2 AR.

4.1 Localisation sub-cellulaire de l'hétéro-dimère β_1/β_2 -adrénergique

4.1.1 Procédures expérimentales

Afin de fractionner et isoler les membranes plasmiques et celles du réticulum endoplasmique, nous avons modifié le protocole de Hurt et al. (Hurt *et al.*, 2000) pour l'appliquer à notre type cellulaire. Brièvement, des cellules HEK-293T co-exprimant de façon transitoire β_2 AR-Rluc/ β_1 AR-GFP ou β_2 AR-Rluc/ β_2 AR-GFP sont cultivées dans des pétris de 100 mm pendant les 48 h suivant la transfection. Les cellules d'un pétri de 100 mm sont ensuite lavées avec du PBS froid, puis lysées avec 2 ml de tampon hypotonique (20 mM HEPES pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 6 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml Benzamine, 5 μ g/ml Soybean trypsin inhibitor) à 4^o C. Le lysat cellulaire récupéré est homogénéisé par 30 coups de potter. Les débris cellulaires et les cellules non lysées sont éliminés à la suite d'une centrifugation de 1000 g pendant 5 min à 4^o C. Le surnageant est récupéré et complété d'une solution de sucrose («saccharose») 2 M pour obtenir une concentration finale de sucrose 0,2 M. Le tampon hypotonique décrit précédemment est utilisé pour dissoudre le sucrose afin d'obtenir un gradient discontinu de sucrose composé de six couches de 5 ml aux concentrations molaires suivantes : 0,5; 0,9; 1,2; 1,35; 1,5; 2,0. Le lysat cellulaire, complété à 0,2 M sucrose, est ajouté sur le dessus du gradient. Les gradients de sucrose sont ensuite centrifugés dans un rotor Beckman SW28 pendant 16 h à 27 000 g. Trente-deux fractions de 1 ml sont prélevées à partir du dessus du gradient discontinu de sucrose.

Pour déterminer quelles fractions sont enrichies en membranes du RE ou en membranes plasmiques, un échantillon de chaque fraction impaire est prélevé et les protéines de cet échantillon sont précipitées. Ces protéines sont ensuite analysées

par gel SDS-PAGE, puis un immunobuvardage Western est réalisé en utilisant les anticorps anti-Calnexine (Stressgen Biotechnologies Corp.) pour localiser les membranes du RE ou anti- Na^+K^+ -ATPase (Sigma) pour localiser les membranes plasmiques.

Afin de déterminer la localisation des homo et hétéro-dimères βAR , des mesures de BRET et de luminescence totale ont été réalisées. Un volume de 90 μl de chacune des fractions impaires de sucrose est déposé en duplicata dans des plaques 96 puits (Optiplate; Packard Biosciences). Les mesures de BRET, telles que décrites précédemment (section 3.3), sont démarrées à la suite de l'ajout de la coelenterazine DeepBlueC à une concentration finale de 5 μM . Pour la localisation du $\beta_2\text{AR-Rluc}$, un volume de 90 μl des fractions impaires de sucrose est déposé en duplicata dans des plaques 96 puits (plaques blanches à fond transparent; Costar) et une mesure de la luminescence totale est déterminée dans un LumiCount, tel que décrit précédemment (section 3.3).

4.1.2 Résultats

Il a déjà été démontré que la dimérisation de certains RCPG était requise pour leur acheminement vers la membrane plasmique. En effet, l'hétéro-dimérisation des récepteurs $\text{GABA}_B\text{R1/GABA}_B\text{R2}$ permet de masquer un signal de rétention dans le RE qui est localisé dans la queue C-terminale du $\text{GABA}_B\text{R1}$. Cette hétéro-dimérisation permet ainsi l'expression d'un récepteur fonctionnel à la surface extracellulaire. De nombreuses observations sur d'autres RCPG permettent de penser que la dimérisation de certains membres de cette grande famille de récepteurs surviendrait très tôt lors de leur biosynthèse.

Pour les récepteurs β -adrénergiques, de nombreux résultats accumulés au cours des années dans notre laboratoire suggèrent que la dimérisation de ces récepteurs surviendrait dans les premières étapes de leur biosynthèse. Dans le but d'étudier le lieu de formation des dimères βAR , nous avons utilisé un protocole permettant d'isoler les membranes du RE et les membranes plasmiques grâce à un gradient discontinu de sucrose dont la concentration varie entre 0,2 et 2 M. Les

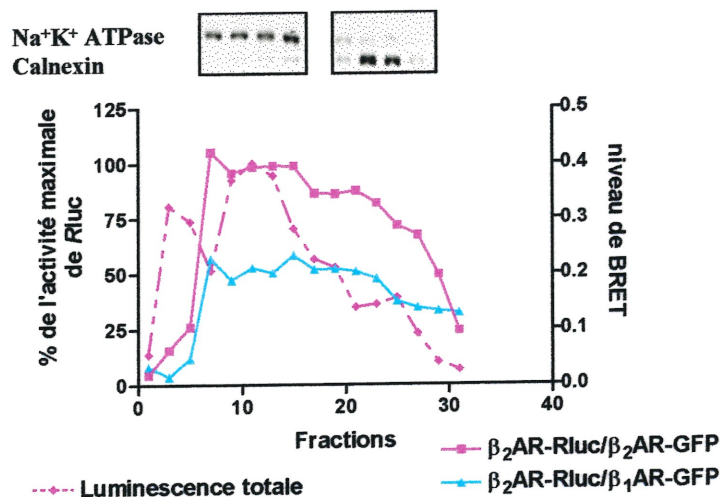


Figure 4.1: Des homogénats de cellules HEK-293T co-exprimant transitoirement $\beta_2\text{AR-Rluc}/\beta_2\text{AR-GFP}$ ou $\beta_2\text{AR-Rluc}/\beta_1\text{AR-GFP}$ sont séparés sur un gradient discontinu de sucrose. 32 fractions sont récupérées et les compartiments de la surface cellulaire (Na^+K^+ -ATPase) et du RE (Calnexine) sont identifiés. Les mêmes fractions sont utilisées pour mesurer l'activité de la Rluc et le niveau de BRET afin de déterminer respectivement la distribution du récepteur et la dimérisation de l'homo ou de l'hétéro-dimère. Cette expérience est représentative de trois expériences indépendantes.

fractions enrichies en membranes du RE ont été déterminées en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine résidante du RE, soit la Calnexine, tandis qu'un anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine localisée seulement à la membrane plasmique (Na^+K^+ -ATPase) a été utilisé pour déterminer les fractions enrichies en membranes de la surface cellulaire. Sur la figure 4.1, nous pouvons remarquer que les membranes plasmiques sont localisées dans les fractions légères du gradient de sucrose (fractions # 7 à 13) tandis que les fractions lourdes du gradient de sucrose (fractions # 19 à 25) sont enrichies en membranes du RE.

La localisation des récepteurs dans les fractions du gradient discontinu de sucrose a été déterminée par l'activité de la Rluc qui est fusionnée à la queue C-terminale du $\beta_2\text{AR}$. La figure 4.1 montre que l'activité de la Rluc, qui est proportionnelle à la densité de $\beta_2\text{AR}$, est localisée principalement dans les fractions

enrichies de membranes plasmiques et en plus faible proportion dans les fractions enrichies de membranes du RE. Cette localisation de $\beta_2\text{AR-Rluc}$ n'est pas modifiée par la co-expression de $\beta_1\text{AR-GFP}$ ou $\beta_2\text{AR-GFP}$ et le profil de distribution du récepteur fusionné à la GFP est sensiblement le même que celui du $\beta_2\text{AR-Rluc}$ (résultats non montrés).

Le niveau de BRET a été mesuré sur chacune des fractions impaires du gradient discontinu de sucrose pour l'homo-dimère $\beta_2\text{AR}$ ou pour l'hétéro-dimère $\beta_2\text{AR}/\beta_1\text{AR}$. La figure 4.1 montre que les deux couples de BRET dimérisent aussi bien à la surface cellulaire que dans le RE puisqu'un niveau de BRET non négligeable est détecté dans toutes les fractions correspondant aux membranes plasmiques et ainsi qu'à celles du RE. Aucun signal de BRET n'est détecté lorsque le $\beta_2\text{AR}$ est co-exprimé avec un récepteur non apparenté, $\text{GABA}_B\text{R2}$ (résultats non montrés). Comme nous l'avions précédemment démontré (figure 3.1B), le niveau de BRET mesuré sur le gradient discontinu de sucrose pour $\beta_2\text{AR-Rluc}/\beta_1\text{AR-GFP}$ est également plus faible que celui mesuré pour l'homo-dimère $\beta_2\text{AR}$. Ces résultats de localisation membranaire suggèrent donc que les homo et hétéro-dimères βAR sont déjà formés dans le RE et existent sous forme dimérique à la surface cellulaire, tout comme nous l'avions précédemment démontré par co-immunoprécipitation de surface (figure 2.1).

4.2 Recrutement de la β -arrestine par β_1 et $\beta_2\text{AR}$ en présence de ligands sélectifs ou non-sélectifs

4.2.1 Procédures expérimentales

Le recrutement de GFP-arrestine 3 par β_1 ou $\beta_2\text{AR-Rluc}$ est détecté par l'essai de BRET tel que décrit par Angers et al (Angers *et al.*, 2000). Brièvement, des cellules HEK-293T, ensemencées 24 heures auparavant dans des pétris de 100 mm, sont transfectées transitoirement avec $\beta_1\text{AR-Rluc}$ ou $\beta_2\text{AR-Rluc}$ en présence ou non de GFP-arrestine 3 (GFP- β -arrestine 2). 48 heures après la transfection, les cellules sont décollées et préparées pour une expérience de BRET, tel que décrit précédemment (section 3.3).

Un volume de 70 μl de cellules est transféré en duplicata dans des plaques 96 puits (Optiplate). Dans un volume final de 90 μl , les cellules sont incubées en présence ou en absence d'agonistes (isoproterenol, xamoterol, procaterol) pour des temps variants de 0 à 15 minutes. Pour certaines expériences, une combinaison de l'agoniste non-sélectif isoproterenol et d'un antagoniste (propranolol, betaxolol, ICI 118,551) a également été utilisée pour des durées d'incubation de 0 à 15 minutes. À la fin de l'incubation, le niveau de BRET est mesuré dans un BRETCount après l'ajout de DeepBlueC (section 3.3).

4.2.2 Résultats

Notre laboratoire a récemment développé une nouvelle approche permettant de détecter l'interaction entre les RCPG et la β -arrestine au cours de la désensibilisation et de l'internalisation du récepteur. En effet, Angers et al. a démontré que le niveau de BRET détecté entre le $\beta_2\text{AR}$ et la β -arrestine augmentait de façon dose-dépendante à la suite d'une stimulation du récepteur avec l'agoniste non-sélectif isoproterenol (Angers *et al.*, 2000).

À la suite de cette observation qui suggérait que le BRET pouvait être utilisé pour détecter des interactions favorisées par un agoniste lors de l'activation de RCPG, nous avons ensuite voulu observer si différents agonistes et antagonistes β -adrénergiques, sélectifs ou non-sélectifs, pouvaient moduler le recrutement de la β -arrestine vers différents sous-types β -adrénergiques. Pour cela, nous avons utilisé trois agonistes différents. L'un de ces agonistes (isoproterenol) a la même affinité pour les sous-types β_1 et $\beta_2\text{AR}$, tandis que le xamoterol et le procaterol sont des agonistes sélectifs pour le β_1 et le $\beta_2\text{AR}$ respectivement. Trois antagonistes ont également été utilisés. Le propranolol peut lier les deux sous-types avec une affinité similaire, tandis que le betaxolol et le ICI-118,551 lient de façon sélective le β_1 et le $\beta_2\text{AR}$ respectivement. Pour ces agonistes et antagonistes sélectifs, nous avons utilisé une concentration qui ne bloquait pas plus de 15% des sites du sous-type pour lequel le ligand n'est pas sélectif.

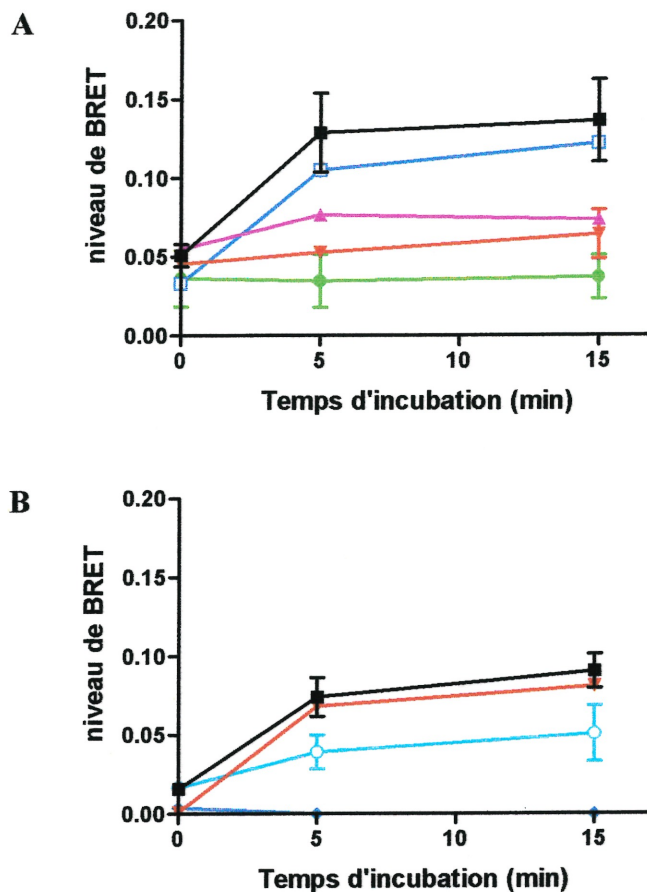


Figure 4.2 : Des cellules HEK-293T exprimant de façon transitoire GFP- β -arrestine et β_1 AR-Rluc (A) ou GFP- β -arrestine et β_2 AR-Rluc (B) sont incubées pendant 5 ou 15 min avec différents ligands β -adrénergiques. Le niveau de BRET est déterminé à la fin de la période d'incubation. Le temps 0 correspond au niveau basal de BRET détecté entre les deux protéines en absence de ligand. ■ Isoproterenol 1 μ M; ▲ Isoproterenol 1 μ M + Propranolol 100 nM; ▼ Isoproterenol 1 μ M + Betaxolol 100 nM; □ Isoproterenol 1 μ M + ICI-118,551 100 nM; ● Xamoterol 540 nM; ○ Procaterol 410 nM. Ces résultats représentent la moyenne \pm S.E.M de 3 expériences indépendantes.

La figure 4.2 représente le recrutement, mesuré par BRET, de la β -arrestine par β_1 ou β_2 AR en absence de ligand (0 min) ou à la suite d'une stimulation de 5 ou 15 minutes avec un agoniste en présence ou non d'un antagoniste. Sur la figure 4.2A, nous pouvons remarquer que l'agoniste non-sélectif isoproterenol permet au β_1 AR de recruter la β -arrestine, comme le démontre la différence entre le niveau de BRET mesuré après 5 minutes de stimulation et celui mesuré en absence de ligand.

Ce recrutement stimulé par l'isoproterenol peut être bloqué par les antagonistes non-sélectif propranolol ou sélectif betaxolol, mais n'est pas affecté significativement par l'antagoniste β_2 -sélectif ICI-118,551 lorsque ce dernier est utilisé à une concentration ne liant pas plus de 15% des sites du β_1 AR. Ces observations confirment donc que la β -arrestine est recrutée par un récepteur qui se trouve dans une conformation activé. Toutefois, cette conformation activé du β_1 AR ne semble pas être suffisante pour recruter la β -arrestine lorsque le récepteur est stimulé par l'agoniste β_1 -sélectif xamoterol à une concentration de 540 nM. Cette observation n'est pas due à une concentration trop faible de l'agoniste ou à une incapacité du β_1 AR à lier ce ligand, puisqu'une concentration saturante de 10 μ M de xamoterol ne permet pas au récepteur de recruter la β -arrestine et que ce ligand peut compétitionner la liaison de l'antagoniste cyanopindolol sur le β_1 AR avec une constante d'inhibition (K_i) similaire à celle rapportée dans la littérature (résultats non présentés). De plus, une stimulation de 30 minutes avec le xamoterol n'a permis aucun recrutement de la β -arrestine vers le β_1 AR (résultats non présentés).

Tel que démontré précédemment par BRET (Angers *et al.*, 2000), l'isoproterenol permet au β_2 AR de recruter la β -arrestine (figure 4.2B). Ce recrutement de la β -arrestine est complètement bloqué lorsque cet agoniste non-sélectif est combiné avec l'antagoniste β_2 -sélectif ICI-118,551, tandis qu'aucun effet sur le niveau de BRET est observé lorsque le β_2 AR est stimulé par l'isoproterenol en présence d'une concentration d'antagoniste β_1 -sélectif betaxolol ne bloquant pas plus de 15% des sites de liaison du β_2 AR. De plus, contrairement à l'agoniste β_1 -sélectif xamoterol sur le β_1 AR, l'agoniste β_2 -sélectif procaterol stimule le β_2 AR et permet ainsi un recrutement de la β -arrestine vers ce récepteur. Tous ces résultats confirment donc que la β -arrestine est recrutée par β_1 et β_2 AR à la suite de leur stimulation et que leur mécanisme d'internalisation est clathrine-dépendant. Ces résultats suggèrent également que certains agonistes sélectifs, pour une raison non-identifiée encore, ne permettent pas le recrutement de la β -arrestine vers le sous-type récepteuriel qui a été stimulé par ce ligand. De plus, il a été démontré que le recrutement agoniste-dépendant de la β -arrestine vers le récepteur peut être bloqué par des antagonistes sélectifs ou non-sélectifs.

À la suite de ces résultats, nous avons voulu vérifier si la stimulation par des agonistes sélectifs d'un seul récepteur composant l'hétéro-dimère β_1AR/β_2AR pouvait permettre le recrutement de la β -arrestine par le second récepteur formant l'hétéro-dimère. En co-exprimant la GFP- β -arrestine, un récepteur fusionné à la *Rluc* et un récepteur sans épitope, puis en stimulant sélectivement le récepteur ne participant pas au transfert d'énergie, nous pouvions ainsi déterminer s'il y avait interaction directe entre les deux sous-types réceptoriels formant le dimère. Cependant, ces expériences n'ont pas été concluantes puisque les meilleures conditions de détection, telles que le ratio d'expression entre les deux sous-types βAR ou entre les sous-types et la β -arrestine, n'ont pas été bien déterminées avant la fin de cette maîtrise. La cinétique du recrutement de la β -arrestine aurait également dû être mieux étudiée.

Chapitre 5: Discussion

5.1 L'aspect fonctionnel de l'hétéro-dimérisation $\beta_1\text{AR}/\beta_2\text{AR}$

Au cours des dernières années, il a été démontré que de nombreux RCPG pouvaient former des homo ou hétéro-dimères. Toutefois, par les études présentées dans les trois chapitres précédents, nous sommes les premiers à démontrer que les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques peuvent former des hétéro-dimères et que ces hétéro-dimères présentent des caractéristiques fonctionnelles particulières. Nous avons utilisé deux approches différentes pour démontrer l'hétéro-dimérisation entre ces deux sous-types, la co-immunoprécipitation et le BRET, et nous avons étudié diverses propriétés fonctionnelles telles que leur habileté à internaliser à la suite d'une stimulation par un agoniste ainsi que pour activer la voie des MAP kinases.

5.1.1 La formation des hétéro-dimères $\beta_1\text{AR}/\beta_2\text{AR}$

Tout d'abord, nous avons utilisé la co-immunoprécipitation afin de démontrer que β_1 et $\beta_2\text{AR}$ pouvaient hétéro-dimériser, tout comme cela avait été précédemment démontré pour les homo-dimères β_1 et $\beta_2\text{AR}$ (Hebert *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2001). La co-immunoprécipitation de surface des complexes hétéro-dimériques $\beta_1\text{AR}/\beta_2\text{AR}$ (figure 2.1) nous a permis de démontrer qu'ils étaient exprimés à la surface cellulaire sous forme de récepteurs entièrement glycosylés. Leur expression sous forme dimérique à la membrane plasmique a également été observée par BRET à la suite d'un fractionnement cellulaire par gradient discontinu de sucrose (figure 4.1). Nous avons en effet observé un important signal de BRET dans les fractions correspondant aux membranes plasmiques. De plus, nous avons détecté d'importants niveaux de BRET dans des cellules vivantes co-exprimant β_1 et $\beta_2\text{AR}$ (figure 3.1). Ces observations permettent donc de penser que l'hétéro-dimère $\beta_1\text{AR}/\beta_2\text{AR}$ est présent à la surface cellulaire de cellules vivantes et pourrait former un complexe fonctionnel à la membrane plasmique.

En plus d'être exprimés à la surface cellulaire, nous avons également détecté la présence d'homo-dimères $\beta_2\text{AR}$ et d'hétéro-dimères $\beta_1\text{AR}/\beta_2\text{AR}$ dans le réticulum

endoplasmique. En effet, par fractionnement des membranes cellulaires sur gradient discontinu de sucrose, nous avons observé qu'un important signal de BRET était détecté dans les fractions correspondant aux membranes du RE tout comme dans celles correspondant aux membranes plasmiques (figure 4.1). Cette utilisation du BRET permet de déterminer la localisation cellulaire des interactions protéine-protéine détectées. Cette observation suggère que les dimères β AR se forment dans le RE, tel que précédemment suggéré pour d'autres RCPG (Samson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Benkirane *et al.*, 1997; Zhu and Wess, 1998; Lee *et al.*, 2000; Karpa *et al.*, 2000; Morello *et al.*, 2000; Issafras *et al.*, 2002). Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que la formation de ces dimères survient tôt dans leur biosynthèse et qu'ils pourraient ensuite être acheminés à la surface cellulaire sous forme dimérique. La formation de dimère pourrait donc être nécessaire à leur expression à la surface cellulaire, tout comme c'est le cas pour l'hétéro-dimère GABA_BR1/GABA_BR2 (White *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; Kuner *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 2000). Pour ce dernier, la formation de l'hétéro-dimère dans le RE permet de masquer un signal de rétention dans le RE qui est localisé dans la queue C-terminale du GABA_BR1 (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000). Le masquage de ce motif de rétention facilite ainsi la glycosylation complète du GABA_BR1 et son acheminement à la surface cellulaire avec le GABA_BR2 pour former un complexe récepteuriel entièrement fonctionnel. Dans le cas des β AR, des résultats non publiés du laboratoire suggèrent que des mutations dans le motif de dimérisation (GxxxGxxxL) du β_2 AR, précédemment démontré comme étant impliqué dans la formation d'homo-dimères β_2 AR (Hebert *et al.*, 1996), empêchent son homo-dimérisation et bloquent également son expression à la surface cellulaire³. Ces récepteurs mutants, dont la dimérisation est affectée dans des proportions diverses, s'accumulent ainsi dans le RE et seulement une faible proportion de la population totale de β_2 AR est exprimée à la membrane plasmique. Les récepteurs ne pouvant pas être acheminés à la surface cellulaire sont probablement dégradés dans le protéasome, tout comme cela a été démontré pour le δ OR (Petaja-Repo *et al.*, 2000; Petaja-Repo *et al.*, 2001). Ces dernières observations suggèrent un lien direct entre la dimérisation des β AR et leur expression à la surface cellulaire.

³ Dimerization of β_2 AR is a pre-requisite for cell surface targeting. A. Salahpour, S. Angers, J-F. Mercier, M. Bouvier. En préparation.

Le lien entre la dimérisation des β AR et leur expression à la surface cellulaire permet de suggérer un mécanisme de régulation étroit entre la transcription et la traduction des récepteurs. En effet, cette régulation ne permettrait que la formation des complexes dimériques qui sont requis au fonctionnement d'un type cellulaire donné. Ainsi, dans le cas des sous-types β AR, une transcription-traduction prédominante de β_2 AR par rapport à β_1 AR entraînerait principalement la formation d'homo-dimères β_2 AR et d'hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR, tandis qu'une transcription-traduction simultanée et dans des proportions similaires (ratio de 1 :1) de β_1 et β_2 AR permettrait la formation et l'expression à la surface cellulaire d'homo-dimères β_1 et β_2 AR ainsi que des hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR dans une proportion de 25/50/25 (β_1 AR/ β_1 AR, β_1 AR/ β_2 AR, β_2 AR/ β_2 AR) respectivement. Cependant, il est également possible que le mécanisme de régulation de l'expression de dimères soit situé au niveau de l'exportation des protéines à l'extérieur du RE. Dans ce cas, seuls les complexes dimériques ayant un rôle fonctionnel important pour un type cellulaire donné seraient exportés du RE vers la membrane plasmique alors que les dimères n'ayant aucun rôle physiologique pour la lignée cellulaire dans laquelle ils sont exprimés seraient directement acheminés vers le protéasome pour dégradation.

5.1.2 La voie MAPK et l'internalisation des récepteurs

La co-existence cellulaire d'homo-dimères β_1 et β_2 AR et d'hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR pourrait engendrer une signalisation intracellulaire distincte. Nous avons en effet démontré que, dans un type cellulaire donné, la co-expression de β_1 et β_2 AR dans des proportions similaires (ratio de 1 :1) engendrait une fonctionnalité particulière différente de celle des homo-dimères β_1 et β_2 AR qui résulterait probablement de l'hétéro-dimérisation de ces deux sous-types. La caractérisation de la voie MAPK ERK1/2 et de l'internalisation agoniste-dépendante dans des cellules co-exprimant dans des proportions égales β_1 et β_2 AR nous a amené à observer une modification de leur fonctionnalité. Notamment, l'activation de la voie MAPK ERK1/2 est complètement bloquée à la suite d'une stimulation des récepteurs par l'agoniste non-sélectif isoproterenol (figures 2.4-2.5). Cette observation intéressante concorde bien avec celle de Jordan et al. démontrant que l'hétéro-

dimérisation de β_2 AR et κ OR bloque l'activation β -adrénergique de ERK1/2 (Jordan *et al.*, 2001). Dans le cas d'une co-expression de β_1 et β_2 AR dans un ratio de 1:1, nous pourrions nous attendre à observer une activation de la voie ERK1/2 qui serait stimulée par la population d'homo-dimères β_2 AR. Cependant, il se peut que l'activation de la voie ERK1/2 par β_2 AR soit inférieure aux niveaux détectables étant donné la faible proportion d'homo-dimères β_2 AR (25%). Il se pourrait également que l'hétéro-dimère bloque entièrement l'activation de cette voie de signalisation par un processus encore indéterminé sans permettre à l'homo-dimère β_2 AR de générer une réponse agoniste-dépendante.

Nous avons également observé que le profil d'internalisation de ces deux récepteurs est affecté lorsqu'ils sont co-exprimés dans la même cellule. En effet, nos résultats démontrent que, dans les cellules co-exprimant les deux récepteurs, l'internalisation du β_2 AR est bloquée presque totalement (figure 2.8). Les images de microscopie confocale démontrent également que seulement les cellules co-exprimant les deux sous-types présentent ce nouveau profil d'internalisation, tandis que les cellules exprimant seulement le β_2 AR présentent le profil d'internalisation rapide de ce dernier (figures 2.6-2.7). Le β_1 AR empêche donc le β_2 AR d'internaliser au même rythme que dans les cellules n'exprimant que ce dernier. Cette observation est également similaire à celle présentée par Jordan *et al.* qui ont montré que la co-expression de β_2 AR et κ OR empêchait l'internalisation de ces deux récepteurs à la suite d'une stimulation par des agonistes β -adrénergiques et opioïdes sélectifs (Jordan *et al.*, 2001). Ces deux séries d'observations semblent donc suggérer que le β_1 AR impose au β_2 AR ses propriétés d'internalisation et d'activation de certaines voies intracellulaires.

5.1.3 Le recrutement de la β -arrestine

Le recrutement de la β -arrestine vers les β AR a été démontré comme étant important pour la désensibilisation de ces récepteurs et leur internalisation dans les vésicules tapissées de clathrine (Ferguson *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1996; Laporte

et al., 2000). Il a été établi précédemment que le patron d'interaction de la β -arrestine était différent entre β_1 et β_2 AR. En effet, Shiina *et al.* ont confirmé que la β -arrestine était transloquée à la membrane plasmique à la suite de la stimulation de β_2 AR (Shiina *et al.*, 2000). Dans le cas du β_1 AR, une stimulation de ce dernier permettait à la β -arrestine de rapidement être transloquée à la membrane plasmique de la cellule. Cependant, la β -arrestine retournait dans le cytoplasme plus rapidement dans le cas d'une stimulation du β_1 AR que dans celle du β_2 AR. De plus, ils ont démontré que la liaison de la β -arrestine à la troisième boucle intracellulaire et à la queue C-terminale du β_1 AR était plus faible qu'à celles du β_2 AR.

L'observation selon laquelle β_1 et β_2 AR induisent la translocation de la β -arrestine nous a amené à l'hypothèse selon laquelle le complexe hétéro-dimérique β_1 AR/ β_2 AR pouvait co-réguler le recrutement de la β -arrestine à ce dernier. En effet, il était intéressant de savoir si chacune des deux sous-unités de l'hétéro-dimère pouvait permettre à l'autre sous-unité de recruter la β -arrestine. Ces expériences auraient ainsi permis de suggérer que l'hétéro-dimère formait un complexe fonctionnel comprenant deux sous-unités interagissant en synergie l'une avec l'autre pour signaler. Pour ces expériences, nous voulions tirer profit de la possibilité d'utiliser divers agonistes sélectifs pour β_1 ou β_2 AR. En co-exprimant dans un ratio de 1:1 les deux sous-types et en stimulant sélectivement l'un ou l'autre des deux récepteurs, nous voulions détecter par BRET la translocation de la β -arrestine vers le récepteur n'ayant pas été stimulé directement. L'utilisation d'antagonistes sélectifs nous aurait également permis de vérifier le blocage sélectif du recrutement de la β -arrestine vers le récepteur participant au BRET après avoir stimulé sélectivement l'autre sous-unité de l'hétéro-dimère ou non-sélectivement les deux récepteurs. Cependant, nos expériences préliminaires n'ont permis d'obtenir aucun résultat concluant à ce sujet. Le ratio d'expression des deux sous-types est très important dans ces expériences. Nous devons trouver les bonnes quantités d'ADN à transfecter pour obtenir environ la même densité de β_1 et β_2 AR exprimés dans la cellule. De plus, la co-transfection de β -arrestine avec ces deux sous-types ajoute un élément de complexité dans la co-expression transitoire de ces trois protéines.

Toutefois, cette série d'expériences a permis d'observer que la stimulation des récepteurs avec certains agonistes sélectifs n'était pas suffisante pour permettre la translocation de la β -arrestine vers ceux-ci. En effet, l'utilisation de l'agoniste sélectif xamoterol pour stimuler le β_1 AR n'a pas permis d'observer le recrutement de la β -arrestine vers ce récepteur au cours d'une stimulation continue de 30 minutes (figure 4.2A). Cette particularité du xamoterol peut s'expliquer par le fait que ce ligand est un agoniste partiel du β_1 AR, contrairement à l'isoproterenol qui est un agoniste complet pour β_1 et β_2 AR. Son efficacité réduite à stimuler le récepteur pourrait ainsi entraîner une translocation plus faible de la β -arrestine vers ce sous-type. Toutefois, l'agoniste β_2 -sélectif procaterol est également un agoniste partiel pour le β_2 AR et nous avons détecté un recrutement de la β -arrestine vers ce sous-type, quoiqu'il soit inférieur à celui mesuré après stimulation avec l'isoproterenol (figure 4.2B). Cette dernière observation permet d'envisager que la β -arrestine et le β_1 AR peuvent interagir à la suite d'une stimulation avec le xamoterol. Cependant, il a été proposé par Shiina et al. que la translocation de la β -arrestine vers le β_1 AR est transitoire et peu stable par rapport à celle vers le β_2 AR (Shiina *et al.*, 2000). Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle nous ne détectons aucun recrutement stimulé par le xamoterol. Une stimulation trop faible du β_1 AR, combinée à une interaction transitoire de ce récepteur avec la β -arrestine pourrait être inférieure au niveau d'interaction détectable par le BRET.

Cette utilisation du BRET afin de détecter la translocation de la β -arrestine vers un RCPG a un potentiel énorme. Malgré l'observation que certains agonistes partiels ne permettent pas de détecter un recrutement de la β -arrestine par BRET, cette approche pourrait être utilisée pour cribler de nouveaux ligands capables d'activer des RCPG déjà connus ou des récepteurs orphelins. De plus, alors que les études précédentes utilisaient des agonistes non-sélectifs, nous avons démontré que le recrutement de la β -arrestine pouvait être stimulée par des agonistes sélectifs et que cette translocation pouvait également être bloquée par des antagonistes sélectifs. Ceci augmente donc les possibilités de criblage de nouveaux ligands ou récepteurs.

5.1.4 L'effet du ligand sur la dimérisation

Dans notre étude sur l'hétéro-dimérisation de β_1 et β_2 AR, nous avons été incapables de détecter un effet du ligand sur la dimérisation de ces sous-types. En effet, aucune augmentation significative du signal de BRET n'a été observée à la suite d'une stimulation des récepteurs avec l'agoniste isoproterenol (chapitre 2). Cette observation contraste avec celles présentées pour l'homo-dimérisation du β_2 AR (Hebert *et al.*, 1996; Angers *et al.*, 2000). Cependant, tel qu'expliqué dans le chapitre 1, l'effet des ligands sur la dimérisation des RCPG est un sujet très controversé. Alors que certains groupes préconisent que la liaison du ligand induit la dimérisation des RCPG (Rocheville *et al.*, 2000b; Horvat *et al.*, 2001; Kroeger *et al.*, 2001), certains autres groupes suggèrent que les RCPG forment des dimères constitutifs (Ayoub *et al.*, 2002; Issafras *et al.*, 2002) et que des changements de conformation à l'intérieur des récepteurs dimériques à la suite de la liaison du ligand expliqueraient la variation positive ou négative du signal correspondant à la forme dimérique des récepteurs. C'est cette dernière hypothèse que nous préconisons maintenant, puisque la formation de dimères β AR est constitutive et ces dimères existent déjà dans le réticulum endoplasmique. Selon cette hypothèse, les légères augmentations non significatives du signal de BRET pour l'homo-dimère β_2 AR (Angers *et al.*, 2000) suggèrent donc que le ligand induit un changement de conformation dans les récepteurs conduisant à une modification mineure de la distance entre le donneur (Rluc) et l'accepteur d'énergie (GFP) plutôt qu'à une augmentation du nombre de dimères β AR.

Les diverses observations présentées dans cette section 5.1 ont toutes été réalisées dans des systèmes hétérologues. Il serait intéressant de mieux caractériser ces voies de signalisation dans des cellules co-exprimant β_1 et β_2 AR de façon endogène pour déterminer si l'hétéro-dimère β_1 AR/ β_2 AR joue un rôle important dans la fonctionnalité de ces cellules puisqu'il a été démontré que la stimulation β AR de la voie ERK1/2 pouvait jouer un rôle dans l'hypertrophie cardiaque (Zou *et al.*, 1999). De plus, les effets pro-apoptotiques de la stimulation de β_1 AR et anti-apoptotiques de celle de β_2 AR sur le myocarde (Chesley *et al.*, 2000; Communal *et*

al., 1998) font que leur co-expression pourrait jouer un rôle important dans l'évolution de la défaillance cardiaque.

5.2 La quantification des interactions protéine-protéine dans un dimère

5.2.1 Les courbes de saturation de BRET

Au cours de notre étude sur l'hétéro-dimérisation de β_1 et β_2 AR, nous avons développé les courbes corrigées de saturation de BRET dans le but de déterminer une affinité relative ($BRET_{50}$) entre deux récepteurs co-exprimés ensemble. Ces valeurs de $BRET_{50}$ permettent de déterminer si l'interaction entre deux récepteurs donnés est plus favorable que celle entre deux autres récepteurs. Par cette approche, nous avons démontré que β_1 et β_2 AR avaient autant d'affinité l'un pour l'autre que pour eux-mêmes dans la formation de dimères (figure 3.3 et tableau III.I). Ainsi, les hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR ont autant de probabilité d'exister que les homo-dimères β_1 et β_2 AR. Cette observation est intéressante puisque cela suggère que, lorsque les deux sous-types sont co-exprimés dans un ratio d'environ 1 :1 dans une cellule donnée, il pourrait effectivement y avoir formation d'hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR ainsi que d'homo-dimères β_1 et β_2 AR, respectivement dans des proportions de 50/25/25. Par ailleurs, des études ont démontré que ces deux récepteurs étaient co-localisés dans un même type cellulaire pour certains tissus (Petrecca and Shrier, 1998; Boivin *et al.*, 2001). Ceci laisse présumer que les hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR pourraient exister dans ces cellules. Dans une même cellule, il pourrait donc y avoir la présence d'au moins trois dimères différents : des homo-dimères β_1 et β_2 AR ainsi que des hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR. Ceci est sans compter la possible présence dans la même cellule d'hétéro-dimères β_2 AR- δ OR et β_2 AR- κ OR dont l'existence a déjà été démontrée par co-immunoprécipitation (Jordan *et al.*, 2001) et par transfert d'énergie en cellule vivante (Ramsay *et al.*, 2002). Cependant, Ramsay *et al.* ont démontré que la formation d'hétéro-dimères entre des récepteurs d'une même famille (δ OR, κ OR, μ OR) est favorisée par rapport à la formation d'hétéro-dimères entre différentes familles de récepteurs dont les séquences sont moins similaires (Ramsay *et al.*, 2002). En effet, dans le cas des

hétéro-dimères entre les récepteurs opioïdes et β_2 AR, une plus grande quantité de récepteurs doit être exprimée en système hétérologue pour observer une dimérisation que dans le cas des hétéro-dimères entre les différents sous-types opioïdes. Ces observations laissent donc présumer qu'il doit exister un mécanisme de régulation très précis pour la formation des dimères dans un type cellulaire donné, tel que nous l'avons suggéré précédemment. De plus, certains de ces complexes dimériques doivent avoir une plus grande importance physiologique que certains autres.

Ces courbes corrigées de saturation de BRET (figure 3.3) nous renseignent également sur le fait que les dimères β AR constitutivement formés ne sont pas issus d'interactions aléatoires. En effet, tel que le suggèrent Kenworthy et al., le fait d'observer une saturation du signal de BRET lorsque le ratio de la densité accepteur d'énergie : donneur d'énergie est augmenté suggère que l'interaction détectée provient d'un groupement pré-déterminé entre deux molécules (Kenworthy and Edidin, 1998). Or, pour l'homo-dimère β_2 AR, nous obtenons une saturation du BRET à un ratio d'environ 2,5 (correspond à deux fois le $BRET_{50}$; tableau III.1). Par contre, si la formation de dimères était aléatoire, le signal de BRET suivrait une courbe quasi-linéaire, dont la saturation ne serait détectée qu'à un ratio accepteur : donneur de loin supérieur à celui obtenu dans nos expériences. Selon ce modèle, l'énergie détectée dans des interactions aléatoires serait seulement dépendante de la densité d'accepteur d'énergie, tandis que dans le cas d'interactions non-aléatoires, l'énergie serait dépendante du ratio accepteur : donneur d'énergie. Nous pouvons également lier ces remarques faites par Kenworthy et al. à nos observations relatives à l'existence de β AR dimériques dès le réticulum endoplasmique. En effet, d'après notre hypothèse voulant que les récepteurs soient synthétisés sous forme dimérique, la surexpression du récepteur-GFP par rapport au récepteur-Rluc (ratio accepteur : donneur élevé) permettrait seulement la formation de dimères récepteur-Rluc/récepteur-GFP. Ainsi, à des niveaux élevés de ratio accepteur : donneur, la population entière de donneur serait sous forme dimérique avec un accepteur et contribuerait au signal de BRET. Toutefois, une plus grande expression de récepteur-GFP ne permettrait pas un signal de BRET plus important puisque tous les récepteurs-Rluc seraient déjà couplés à un accepteur.

En plus de permettre de déterminer des affinités entre deux molécules ainsi que de suggérer un modèle d'interaction non-aléatoire, les courbes de saturation corrigées de BRET permettent également de vérifier si les β AR forment des complexes dimériques ou oligomériques de plus haut niveau. En effet, nous avons démontré que la courbe de saturation corrigée expérimentale de l'homo-dimère β_2 AR corrélait mieux avec la courbe modélisée d'un dimère qu'avec celle d'un trimère (figure 3.3). Or, puisque les courbes de saturation corrigées pour l'homo-dimère β_1 AR ainsi que pour l'hétéro-dimère β_1 AR/ β_2 AR adoptent la même forme que celle de l'homo-dimère β_2 AR, nous pouvons penser que la forme dimérique est également privilégiée par rapport à la forme trimérique pour ces complexes. Du nombre important d'études démontrant que des RCPG peuvent former des oligomères (voir section 1.3), certaines d'entre elles ont suggéré que ces oligomères étaient composés de seulement deux (Ayoub *et al.*, 2002) ou plus que deux protomères (Elmhurst *et al.*, 2000; George *et al.*, 2000). Dans le cas des deux dernières études, des expériences de radio-liaison ou de co-immunoprécipitation suivie d'immunobuvardage Western ont permis d'arriver à ces conclusions alors qu' Ayoub *et al.* ont utilisé le BRET en cellules vivantes pour conclure à la formation de dimères pour les récepteurs mélatonines (Ayoub *et al.*, 2002). Nos résultats concordent bien avec ceux décrits pour les récepteurs mélatonines, malgré une approche différente utilisant le BRET. En effet, Ayoub *et al.* ont effectué des expériences de compétition de BRET utilisant une concentration équimolaire constante de MTR-Rluc et MTR-GFP et des concentrations croissantes d'un MTR sans aucun épitope. Par cette approche, ils ont observé que leur courbe de compétition corrélait mieux avec la courbe modélisée d'un dimère que celles de trimère ou tétramère. Ces études de modélisation de l'oligomérisation des RCPG utilisant le BRET reflètent probablement plus ce qui existe vraiment dans la cellule. En effet, le BRET détermine des interactions protéine-protéine se produisant dans des cellules vivantes, tandis que les immunobuvardages Western requièrent la lyse des cellules et la solubilisation des protéines. De plus, dans ce dernier cas, la détermination exacte des formes de haut poids moléculaire sur gel SDS-PAGE est ardue. C'est notamment le cas pour la forme de haut poids moléculaire de l'hétéro-dimère β_1 AR/ β_2 AR et de l'homo-dimère β_2 AR (figure 2.1) qui semble plus corrélérer avec un complexe trimérique que dimérique. Toutefois, il est préférable de demeurer prudent puisque aucune méthode actuellement utilisée ne permet de

confirmer hors de tout doute la véritable nature des formes oligomériques des RCPG.

5.2.2 La proportion de dimères

Comme nous l'avons présenté précédemment (section 1.3.4), certains groupes suggèrent que les RCPG existent sous forme monomérique et que leur dimérisation est induite par la liaison d'un ligand sur le récepteur. Or, pour les β AR, nous avons précédemment discuté du fait qu'ils formaient des dimères constitutifs et que leur dimérisation était possiblement requise pour leur expression à la surface cellulaire. Dans le but de confirmer que la population réceptrielle de la cellule était composée majoritairement de dimères, nous avons réalisé des expériences permettant de quantifier cette proportion. Tout d'abord, nous avons démontré qu'une même proportion de la population réceptrielle cellulaire était engagée dans la formation de dimères pour des niveaux d'expression totale variant sur une échelle de 20 fois (figure 3.4). En effet, le niveau constant de BRET détecté lorsque β_2 AR-Rluc et β_2 AR-GFP sont co-exprimés dans un ratio de 1 :1 suggère qu'un même nombre de récepteur existe sous forme dimérique. De plus, par ces expériences, nous avons démontré que plus de 80% des β_2 AR étaient engagés dans la formation d'un complexe dimérique (figure 3.5). Ceci signifie donc que la majorité des récepteurs exprimés dans la cellule existent sous forme dimérique. Cette très grande proportion de dimères parmi la population totale de β_2 AR peut également être expliquée par l'hypothèse selon laquelle la dimérisation des RCPG est requise pour l'expression de ceux-ci à la surface cellulaire. Ainsi, tous les récepteurs synthétisés dans la cellule seraient pairés avec un récepteur du même sous-type ou d'un autre sous-type lors d'une étape de leur repliement dans le RE et ceci permettrait aux récepteurs d'adopter la conformation requise pour leur acheminement vers la membrane plasmique.

Nos expériences permettant de déterminer la proportion de dimères dans la population réceptrielle supportent aussi le modèle d'interaction non-aléatoire dans lequel l'énergie détectée est dépendante du ratio donneur : accepteur. En effet,

malgré une augmentation de la densité de donneur et d'accepteur d'énergie entre une expression de 0,4 et 14,0 pmol de récepteur/mg de protéine (β_2 AR-Rluc), nous ne détectons aucune augmentation du BRET lorsque le ratio donneur : accepteur demeure à environ 1 :1. Une augmentation du BRET n'est détectée qu'à des niveaux d'expression très importants, soit supérieurs à environ 25 pmol/mg (figure 3.4). C'est seulement à ces niveaux élevés d'expression que le modèle d'interaction aléatoire entre deux molécules devient effectif puisque l'énergie détectée devient indépendante du ratio de la densité de donneur : accepteur et seulement dépendante de la densité de l'accepteur.

5.2.3 Les niveaux d'expression cellulaire des récepteurs dimériques

Les techniques permettant de détecter des interactions protéine-protéine se sont grandement améliorées au cours des dernières années. En effet, celles-ci sont devenues de plus en plus sensibles et permettent, grâce aux approches biophysiques de transfert d'énergie telles le FRET et le BRET, de détecter des interactions entre deux protéines dans des systèmes cellulaires intacts. De plus, il est de plus en plus fréquent que des études démontrent l'existence de RCPG dimériques lorsque ces derniers sont exprimés à des niveaux équivalents à ceux détectés dans les cellules exprimant de façon endogène ces protéines. C'est notamment le cas pour les homo et hétéro-dimères β_1 et β_2 AR qui peuvent être détectés lorsqu'ils sont exprimés à un niveau aussi faible que celui mesuré dans le tissu de cœur canin (chapitre 3). D'autres groupes ont également démontré que certains RCPG dimérisaient à de très faibles niveaux d'expression (Ciruela *et al.*, 1995; Garzon *et al.*, 1995; Ng *et al.*, 1996; Kaupmann *et al.*, 1998; Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Vila-Coro *et al.*, 1999; Vila-Coro *et al.*, 2000; Ayoub *et al.*, 2002; Issafras *et al.*, 2002). Ayoub *et al.* ont entre autres démontré que les homo et hétéro-dimères MT1R et MT2R pouvaient être détectés à des niveaux aussi faibles que 20 fmol de récepteurs/mg de protéines, soit des niveaux similaires à ce qui peut être mesuré dans le tissu de la rétine (70 fmol/mg) (Ayoub *et al.*, 2002). La détection d'interactions protéine-protéine à de faibles niveaux d'expression, comme le permet le BRET et le FRET, résout également la question voulant que les dimères de RCPG soient seulement un artéfact causé par une surexpression de ces protéines dans

des systèmes hétérologues. Cette plus grande sensibilité des techniques de détection pourrait ainsi expliquer le nombre accru de différents homo et hétéro-dimères de RCPG qui ont été décrits au cours des dernières années puisqu'il devient plus facile d'étudier ces interactions qu'auparavant.

En étudiant la dimérisation de β_1 et β_2 AR, nous avons donc développé des méthodes permettant de mieux quantifier les interactions protéine-protéine. En effet, il est maintenant plus facile de déterminer si deux protéines ont une bonne affinité l'une pour l'autre relativement à une autre protéine. De plus, il est possible de quantifier le nombre de dimères dans une population de récepteurs et de déterminer la nature de la forme oligomérique. Au cours des prochaines années, le développement de méthodes plus sensibles et une meilleure compréhension de ces approches permettra probablement d'en apprendre encore plus sur les interactions protéine-protéine.

5.3 Conclusion

La dimérisation est un sujet très actuel dans le monde des RCPG. Le nombre grandissant de forme homo ou hétéro-dimérique entre différents RCPG qui sont rapportés dans la littérature semble suggérer que leur existence est la norme et non l'exception. Dans ce mémoire, nous avons présenté différents arguments démontrant que les hétéro-dimères entre les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques existent. Ces démonstrations de l'existence d'hétéro-dimères β_1 AR/ β_2 AR sont supportées par une caractérisation de différentes propriétés fonctionnelles de ces récepteurs, suggérant que leur co-expression dans un même type cellulaire crée un nouveau type récepteuriel avec ses caractéristiques propres. Cependant, l'existence d'hétéro-dimères entre β_1 et β_2 AR demeure à démontrer dans des tissus co-exprimant ces deux sous-types de façon endogène. Le rôle de ces hétéro-dimères pourrait effectivement être important dans certaines pathologies et leur étude pourrait entraîner le développement de nouveaux procédés permettant le traitement de ces maladies. Entre autres, des molécules permettant de bloquer la dimérisation de récepteurs pourraient être utilisées afin d'empêcher la formation de dimères entre

certains sous-types réceptoriels spécifiques qui auraient été démontrés comme ayant une fonction particulière dans l'évolution d'une pathologie.

Chapitre 6: Bibliographie

AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab A M and Quitterer U (2001) The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. *J Biol Chem* **276**: pp 39721-39726.

AbdAlla S, Lothar H and Quitterer U (2000) AT1-Receptor Heterodimers Show Enhanced G-Protein Activation and Altered Receptor Sequestration. *Nature* **407**: pp 94-98.

Alexanders SPM and Peters J A (1999) Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement. *Trends Pharmacol Sci* **10th ed.**

Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairat S, Chelsky D , Dennis M and Bouvier M (2000) Detection of Beta2-Adrenergic Receptor Dimerization in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: pp 3684-3689.

Angers S, Salahpour A and Bouvier M (2002) DIMERIZATION: An Emerging Concept for G Protein-Coupled Receptor Ontogeny and Function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: pp 409-435.

Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M and Jockers R (2002) Monitoring of Ligand-Independent Dimerization and Ligand-Induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* **277**: pp 21522-21528.

Bai M, Trivedi S and Brown E M (1998) Dimerization of the Extracellular Calcium-Sensing Receptor (CaR) on the Cell Surface of CaR-Transfected HEK293 Cells . *J Biol Chem* **273**: pp 23605-23610.

Barr, A. J., Brass, L. F., and Manning, D. R. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. *J Biol Chem* **272**, 2223-2229. 1997.

Benkirane M, Jin D Y, Chun R F, Koup R A and Jeang K T (1997) Mechanism of Transdominant Inhibition of CCR5-Mediated HIV-1 Infection by Ccr5delta32. *J Biol Chem* **272**: pp 30603-30606.

Billinton A, Ige A O, Bolam J P, White J H, Marshall F H and Emson P C (2001) Advances in the Molecular Understanding of GABA(B) Receptors. *Trends Neurosci* **24**: pp 277-282.

Bockaert J and Pin J P (1999) Molecular Tinkering of G Protein-Coupled Receptors: an Evolutionary Success. *EMBO J* **18**: pp 1723-1729.

Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, Ness W, Boege F and Lohse M J (2001) Immunofluorescent Imaging of Beta 1- and Beta 2-Adrenergic Receptors in Rat Kidney. *Kidney Int* **59**: pp 515-531.

Bormann BJ, Knowles W J and Marchesi V T (1989) Synthetic Peptides Mimic the Assembly of Transmembrane Glycoproteins. *J Biol Chem* **264**: pp 4033-4037.

Bouvier M (2001) Oligomerization of G-Protein-Coupled Transmitter Receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**: pp 274-286.

Bouvier M, Collins S, O'Dowd B F, Campbell P T, De Blasi A, Kobilka B K, MacGregor C, Irons G P, Caron M G and Lefkowitz R J (1989) Two Distinct Pathways for CAMP-Mediated Down-Regulation of the β_2 -Adrenergic Receptor: Phosphorylation of the Receptor and Regulation of Its mRNA Level. *J Biol Chem* **264**: pp 16786-16792.

Bristow MR (1993) Changes in Myocardial and Vascular Receptors in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* **22**: pp 61A-71A.

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti R S, Sageman W S, Lurie K, Billingham M E, Harrison D C and Stinson E B (1982) Decreased Catecholamine Sensitivity and Beta-Adrenergic-Receptor Density in Failing Human Hearts. *New Engl J Med* **307**: pp 205-211.

Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S and Stinson E B (1986) β_1 - and β_2 -Adrenergic-Receptor Subpopulations in Nonfailing and Failing Human Ventricular Myocardium: Coupling of Both Receptor Subtypes to Muscle Contraction and Selective β_1 -Receptor Down-Regulation in Heart Failure. *Circ Res* **59**: pp 297-309.

Bristow MR, Hershberger R E, Port J D, Gilbert E M, Sandoval A, Rasmussen R, Cates A E and Feldman A M (1990) β -Adrenergic Pathways in Nonfailing and Failing Human Ventricular Myocardium. *CIRCULATION* **82**: pp 1-12-1-25.

Brodde OE (1991) β_1 - and β_2 -Adrenoceptor in the Human Heart: Properties, Function, and Alterations in Chronic Heart Failure. *Pharmacol Rev* **43**: pp 203-242.

Brodde OE, Karad K, Zerkowski H R, Rohm N and Reidemeister J C (1983) Coexistence of Beta 1- and Beta 2-Adrenoceptors in Human Right Atrium. Direct Identification by (+/-)-[125I]iodocyanopindolol Binding. *Circ Res* **53**: pp 752-758.

Brodde OE and Michel M C (1999) Adrenergic and Muscarinic Receptors in the Human Heart. *Pharmacol Rev* **51**: pp 651-690.

Brodde OE, Vogelsang M, Broede A, Michel-Reher M, Beisenbusch-Schafer E, Hakim K and Zerkowski H R (1998) Diminished Responsiveness of Gs-Coupled Receptors in Severely Failing Human Hearts: No Difference in Dilated Versus Ischemic Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**: pp 585-594.

Brown EM, Segre G V and Goldring S R (1996) Serpentine Receptors for Parathyroid Hormone, Calcitonin and Extracellular Calcium Ions. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **10**: pp 123-161.

Cheng ZJ 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**: pp 48040-48047.

Chesley A, Lundberg M S, Asai T, Xiao R P, Ohtani S, Lakatta E G and Crow M T (2000) The Beta(2)-Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal to Cardiac Myocytes Through G(i)-Dependent Coupling to Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Circ Res* **87**: pp 1172-1179.

Ciruela F, Casado V, Mallol J, Canela E I, Lluís C and Franco R (1995) Immunological Identification of A1 Adenosine Receptors in Brain Cortex. *J Neurosci Res* **42**: pp 818-828.

Clark RB, Friedman J, Dixon R A F and Strader C D (1989) Identification of a Specific Site Required for Rapid Heterologous Desensitization of the β -Adrenergic Receptor by CAMP- Dependent Protein Kinase. *Mol Pharmacol* **36**: pp 343-348.

Communal C, Singh K, Pimentel D R and Colucci W S (1998) Norepinephrine Stimulates Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes by Activation of the Beta-Adrenergic Pathway. *CIRCULATION* **98**: pp 1329-1334.

Cornea A, Janovick J A, Maya-Nunez G and Conn P M (2001) Gonadotropin Releasing Hormone Microaggregation: Rate Monitored by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* **276**: pp 2153-2158.

Cvejic S and Devi L A (1997) Dimerization of the Delta Opioid Receptor: Implication for a Role in Receptor Internalization. *J Biol Chem* **272**: pp 26959-26964.

Daaka Y, Luttrell D K and Lefkowitz R J (1997) Switching of the Coupling of the Beta2-Adrenergic Receptor to Different G Proteins by Protein Kinase A. *Nature* **390**: pp 88-91.

del Monte F, Kaumann A J, Poole-Wilson P A, Wynne D G, Pepper J and Harding S E (1993) Coexistence of Functioning Beta 1- and Beta 2-Adrenoceptors in Single Myocytes From Human Ventricle. *CIRCULATION* **88**: pp 854-863.

Dohlman HG, Bouvier M, Benovic J L, Caron M G and Lefkowitz R J (1987) The Multiple Membrane Spanning Topography of the β_2 -Adrenergic Receptor: Localization of the Sites of Binding, Glycosylation and Regulatory Phosphorylation by Limited Proteolysis. *J Biol Chem* **262**: pp 14282-14288.

Dunigan CD, Curran P K and Fishman P H (2000) Detection of Beta-Adrenergic Receptors by Radioligand Binding. *Methods Mol Biol* **126**: pp 329-343.

Elmhurst JL, Xie Z, O'Dowd B F and George S R (2000) The Splice Variant D3nf Reduces Ligand Binding to the D3 Dopamine Receptor: Evidence for Heterooligomerization. *Brain Res Mol Brain Res* **80**: pp 63-74.

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren M-M, Patey G, Tate K M, Delavier-Klutchko C and Strosberg A D (1989) Molecular Characterization of the Human β_3 -Adrenergic Receptor. *Science* **245**: pp 1118-1121.

Ferguson SS, Downey W E 3, Colapietro A M, Barak L S, Menard L and Caron M G (1996) Role of Beta-Arrestin in Mediating Agonist-Promoted G Protein- Coupled Receptor Internalization. *Science* **271**: pp 363-366.

Ferguson SS, Menard L, Barak L S, Koch W J, Colapietro A M and Caron M G (1995) Role of Phosphorylation in Agonist-Promoted Beta 2-Adrenergic Receptor Sequestration. Rescue of a Sequestration-Defective Mutant Receptor by Beta ARK1. *J Biol Chem* **270**: pp 24782-24789.

Freedman NJ, Liggett S B, Drachman D E, Pei G, Caron M G and Lefkowitz R J (1995) Phosphorylation and Desensitization of the Human β_1 -Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **270**: pp 17953-17961.

Frielle T, Collins S, Daniel K, Caron M G, Lefkowitz R J and Kobilka B K (1987) Cloning of the cDNA for the Human β_1 -Adrenergic Receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: pp 7920-7924.

Frielle T, Daniel K W, Caron M G and Lefkowitz R J (1988) Structural Basis of β -Adrenergic Receptor Subtype Specificity Studied With Chimeric β_1/β_2 -Adrenergic Receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: pp 9494-9498.

Furthmayr H and Marchesi V T (1976) Subunit Structure of Human Erythrocyte Glycophorin A. *Biochemistry* **15**: pp 1137-1144.

Garzon J, Juarros J L, Castro M A and Sanchez-Blazquez P (1995) Antibodies to the Cloned Mu-Opioid Receptor Detect Various Molecular Weight Forms in Areas of Mouse Brain. *Mol Pharmacol* **47**: pp 738-744.

George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G and O'Dowd B F (2000) Oligomerization of Mu- and Delta-Opioid Receptors. Generation of Novel Functional Properties. *J Biol Chem* **275**: pp 26128-26135.

George SR, Lee S P, Varghese G, Zeman P R, Seeman P, Ng G Y and O'Dowd B F (1998) A Transmembrane Domain-Derived Peptide Inhibits D1 Dopamine Receptor Function Without Affecting Receptor Oligomerization. *J Biol Chem* **273**: pp 30244-30248.

Gether U (2000) Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein- Coupled Receptors. *Endocr Rev* **21**: pp 90-113.

Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela E I, Rondin S, Lew J Y, Watson S, Zoli M, Agnati L F, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K and Franco R (2000) Dopamine D1 and Adenosine A1 Receptors Form Functionally Interacting Heteromeric Complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: pp 8606-8611.

Gomes I, Jordan B A, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V and Devi L A (2000) Heterodimerization of Mu and Delta Opioid Receptors: A Role in Opiate Synergy. *J Neurosci* **20**: pp RC110.

Green SA, Holt B D and Liggett S (1992) β_1 - and β_2 -Adrenergic Receptors Display Subtype-Selective Coupling to Gs. *Mol Pharmacol* **41**: pp 889-893.

Green SA and Liggett S (1994) A Proline-Rich Region of the Third Intracellular Loop Imparts Phenotypic β 1- Versus β 2-Adrenergic Receptor Coupling and Sequestration. *J Biol Chem* **269**: pp 26215-26219.

Guimaraes S and Moura D (2001) Vascular Adrenoceptors: an Update. *Pharmacol Rev* **53**: pp 319-356.

Hebert TE, Moffett S, Morello J P, Loisel T P, Bichet D G, Barret C and Bouvier M (1996) A Peptide Derived From a β 2-Adrenergic Receptor Transmembrane Domain Inhibits Both Receptor Dimerization and Activation. *J Biol Chem* **271**: pp 16384-16392.

Heldin CH (1995) Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction. *CELL* **80**: pp 213-223.

Horvat RD, Roess D A, Nelson S E, Barisas B G and Clay C M (2001) Binding of Agonist but Not Antagonist Leads to Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Intrinsically Fluorescent Gonadotropin- Releasing Hormone Receptors. *Mol Endocrinol* **15**: pp 695-703.

Hovius R, Vallotton P, Wohland T and Vogel H (2000) Fluorescence Techniques: Shedding Light on Ligand-Receptor Interactions. *Trends Pharmacol Sci* **21**: pp 266-273.

Hurt CM, Feng F Y and Kobilka B (2000) Cell-Type Specific Targeting of the Alpha 2c-Adrenoceptor. Evidence for the Organization of Receptor Microdomains During Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *J Biol Chem* **275**: pp 35424-35431.

Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie 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*.

Jones KA, 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**: pp 674-679.

Jordan BA and Devi L A (1999) G-Protein-Coupled Receptor Heterodimerization Modulates Receptor Function. *Nature* **399**: pp 697-700.

Jordan BA, Trapaidze N, Gomes I, Nivarthi R and Devi L A (2001) Oligomerization of Opioid Receptors With Beta 2-Adrenergic Receptors: A Role in Trafficking and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: pp 343-348.

Karpa KD, Lin R, Kabbani N and Levenson R (2000) The Dopamine D3 Receptor Interacts With Itself and the Truncated D3 Splice Variant D3nf: D3-D3nf Interaction Causes Mislocalization of D3 Receptors [In Process Citation]. *Mol Pharmacol* **58**: pp 677-683.

Kaumann AJ, Hall J A, Murray K J, Wells F C and Brown M S (1989) A Comparison of the Effects of Adrenaline and Noradrenaline on Human Heart: The Role of β_1 - and β_2 -Adrenoceptors in the Stimulation of Adenylate Cyclase and Contractile Force. *Eur Heart J* **10**: pp 29-37.

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**: pp 683-687.

Kenworthy AK and Edidin M (1998) Distribution of a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein at the Apical Surface of MDCK Cells Examined at a Resolution of <100 Å Using Imaging Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J Cell Biol* **142**: pp 69-84.

Kobilka BK, Dixon R A F, Frielle T, Dohlman H G, Bolanowski M A, Sigal I S, Yang-Feng T L, Francke U, Caron M G and Lefkowitz R J (1987) CDNA for the Human β_2 -Adrenergic Receptor: A Protein With Multiple Membrane-Spanning Domains and Encoded by a Gene Whose Chromosomal Location Is Shared With That of the Receptor for Platelet-Derived Growth Factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: pp 46-50.

Kroeger KM, Hanyaloglu A C, Seeber R M, Miles L E and Eidne K A (2001) Constitutive and Agonist-Dependent Homo-Oligomerization of the Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor. Detection in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* **276**: pp 12736-12743.

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**: pp 74-77.

Laburthe M, Couvineau A, Gaudin P, Maoret J J, Rouyer-Fessard C and Nicole P (1996) Receptors for VIP, PACAP, Secretin, GRF, Glucagon, GLP-1, and Other Members of Their New Family of G Protein-Linked Receptors: Structure- Function Relationship With Special Reference to the Human VIP-1 Receptor. *Ann N Y Acad Sci* **805**: pp 94-109.

Laporte S, Oakley R, Zhang J, Holt J, Ferguson S S, Caron M G and Barak L S (1999) The Beta-2 Adrenergic Receptor/Beta-Arrestin Complex Recruits the Clathrin Adaptor AP2 During Endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: pp 3712-3717.

Laporte SA, Oakley R H, Holt J A, Barak L S and Caron M G (2000) The Interaction of Beta-Arrestin With the AP-2 Adaptor Is Required for the Clustering of Beta 2-Adrenergic Receptor into Clathrin-Coated Pits. *J Biol Chem* **275**: pp 23120-23126.

Laurent CE, Cardinal R, Rousseau G, Vermeulen M, Bouchard C, Wilkinson M, Armour J A and Bouvier M (2001) Functional Desensitization to Isoproterenol Without Reducing CAMP Production in Canine Failing Cardiocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**: pp R355-R364.

Lee SP, O'Dowd B F, Ng G Y, Varghese G, Akil H, Mansour A, Nguyen T and George S R (2000) Inhibition of Cell Surface Expression by Mutant Receptors Demonstrates That D2 Dopamine Receptors Exist As Oligomers in the Cell. *Mol Pharmacol* **58**: pp 120-128.

Lefkowitz RJ (1998) G Protein-Coupled Receptors. III. New Roles for Receptor Kinases and Beta-Arrestins in Receptor Signaling and Desensitization. *J Biol Chem* **273**: pp 18677-18680.

Lemire I, Allen B G, Rindt H and Hebert T E (1998) Cardiac-Specific Overexpression of Alpha1BAR Regulates BetaAR Activity Via Molecular Crosstalk. *J Mol Cell Cardiol* **30**: pp 1827-1839.

Lemmon MA, Flanagan J M, Hunt J F, Adair B D, Bormann B J, Dempsey C E and Engelman D M (1992a) Glycophorin A Dimerization Is Driven by Specific Interactions Between Transmembrane Alpha-Helices. *J Biol Chem* **267**: pp 7683-7689.

Lemmon MA, Flanagan J M, Treutlein H R, Zhang J and Engelman D M (1992b) Sequence Specificity in the Dimerization of Transmembrane Alpha- Helices. *Biochemistry* **31**: pp 12719-12725.

Lemmon MA, Treutlein H R, Adams P D, Brunger A T and Engelman D M (1994) A Dimerization Motif for Transmembrane Alpha-Helices. *Nat Struct Biol* **1**: pp 157-163.

Levy FO, Zhu X, Kaumann A J and Birnbaumer L (1993) Efficacy of β 1-Adrenergic Receptors Is Lower Than That of β 2- Adrenergic Receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: pp 10798-10802.

Liu R, Paxton W A, Choe S, Ceradini D, Martin S R, Horuk R, MacDonald M E, Stuhlmann H, Koup R A and Landau N R (1996) Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *CELL* **86**: pp 367-377.

Luttrell LM, Ferguson S S, Daaka Y, Miller W E, Maudsley S, Della Rocca G J, Lin F T, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell D K, Caron M G and Lefkowitz R J (1999) Beta-Arrestin-Dependent Formation of Beta-2-Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science* **283**: pp 655-661.

Magne S, Couchie D, Pecker F and Pavoine C (2001) Beta(2)-Adrenergic Receptor Agonists Increase Intracellular Free Ca(2+) Concentration Cycling in Ventricular Cardiomyocytes Through P38 and P42/44 MAPK-Mediated Cytosolic Phospholipase A(2) Activation. *J Biol Chem* **276**: pp 39539-39548.

Margeta-Mitrovic M, Jan Y N and Jan L Y (2000) A Trafficking Checkpoint Controls GABA(B) Receptor Heterodimerization. *NEURON* **27**: pp 97-106.

Mason DA, Moore J D, Green S A and Liggett S B (1999) A Gain-of-Function Polymorphism in a G-Protein Coupling Domain of the Human Beta1-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* **274**: pp 12670-12674.

McVey M, Ramsay D, Kellett E, Rees S, Wilson S, Pope A J and Milligan G (2001) Monitoring Receptor Oligomerization Using Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer and Bioluminescence Resonance Energy Transfer. The Human Delta -Opioid Receptor Displays Constitutive Oligomerization at the Cell Surface, Which Is Not Regulated by Receptor Occupancy. *J Biol Chem* **276**: pp 14092-14099.

Mellon PL, Parker V, Gluzman Y and Maniatis T (1981) Identification of DNA Sequences Required for Transcription of the Human α_1 -Globin Gene in a New SV40 Host-Vector System. *CELL* **27**: pp 279-288.

Miller WE and Lefkowitz R J (2001) Expanding Roles for Beta-Arrestins As Scaffolds and Adapters in GPCR Signaling and Trafficking. *Curr Opin Cell Biol* **13**: pp 139-145.

Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus M F, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet D G and Bouvier M (2000) Pharmacological Chaperones Rescue Cell-Surface Expression and Function of Misfolded V2 Vasopressin Receptor Mutants. *J Clin Invest* **105**: pp 887-895.

Muntz KH, Zhao M and Miller J C (1994) Downregulation of Myocardial Beta-Adrenergic Receptors. Receptor Subtype Selectivity. *Circ Res* **74**: pp 369-375.

Nelson G, Chandrashekar J, Hoon M A, Feng L, Zhao G, Ryba N J and Zuker C S (2002) An Amino-Acid Taste Receptor. *Nature* **416**: pp 199-202.

Nelson G, Hoon M A, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba N J and Zuker C S (2001) Mammalian Sweet Taste Receptors. *CELL* **106** : pp 381-390.

Ng GY, Clark J, Coulombe N, Ethier N, Hebert T E, Sullivan R, Kargman S, Chateaufneuf A, Tsukamoto N, McDonald T, Whiting, Mezey E, Johnson M P, Liu Q, Kolakowski L F J, Evans J F, Bonner T I and O'Neill G P (1999) Identification of a GABAB Receptor Subunit, Gb2, Required for Functional GABAB Receptor Activity. *J Biol Chem* **274**: pp 7607-7610.

Ng GY, O'Dowd B F, Lee S P, Chung H T, Brann M R, Seeman P and George S R (1996) Dopamine D2 Receptor Dimers and Receptor-Blocking Peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: pp 200-204.

Nguyen CT, De Champlain J and Bouvier M (1995) Tissue Specific Changes in β -Adrenergic Receptor Subtypes in DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Biomed J* **2**: pp 34-42.

Okamoto T, Murayama Y, Hayashi Y, Inagaki M, Ogata E and Nishimoto I (1991) Identification of a G_s Activator Region of the β_2 -Adrenergic Receptor That Is Autoregulated Via Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation. *CELL* **67**: pp 723-730.

Ostrom RS, Gregorian C, Drenan R M, Xiang Y, Regan J W and Insel P A (2001) Receptor Number and Caveolar Co-Localization Determine Receptor Coupling Efficiency to Adenylyl Cyclase. *J Biol Chem* **276**: pp 42063-42069.

Overton MC and Blumer K J (2000) G Protein Coupled Receptors Function As Oligomers *In Vivo*. *Curr Biol* **10**: pp 341-344.

Parmentier M, Libert F and Vassart G (1995) La Famille Des Récepteurs Couplés Aux Protéines G Et Ses Orphelins. *Médecine/Sciences* **11**: pp 222-231.

Pavoine C, Magne S, Sauvadet A and Pecker F (1999) Evidence for a Beta2-Adrenergic/Arachidonic Acid Pathway in Ventricular Cardiomyocytes. Regulation by the Beta1-Adrenergic/Camp Pathway. *J Biol Chem* **274**: pp 628-637.

Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Bhalla S, Walker P and Bouvier M (2001) Newly Synthesized Human Delta Opioid Receptors Retained in the Endoplasmic Reticulum Are Retrotranslocated to the Cytosol, Deglycosylated, Ubiquitinated, and Degraded by the Proteasome. *J Biol Chem* **276** : pp 4416-4423.

Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P and Bouvier M (2000) Export From the Endoplasmic Reticulum Represents the Limiting Step in the Maturation and Cell Surface Expression of the Human Delta Opioid Receptor. *J Biol Chem* **275**: pp 13727-13736.

Petrecca K and Shrier A (1998) Spatial Distribution of Nerve Processes and Beta-Adrenoreceptors in the Rat Atrioventricular Node. *J Anat* **192 (Pt 4)**: pp 517-528.

Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S , Kreienkamp H J, Holtt V and Schulz S (2001) Homo- and Heterodimerization of Somatostatin Receptor Subtypes. INACTIVATION OF Sst3 RECEPTOR FUNCTION BY HETERODIMERIZATION WITH Sst2A. *J Biol Chem* **276**: pp 14027-14036.

Pierce KL, Maudsley S, Daaka Y, Luttrell L M and Lefkowitz R J (2000) Role of Endocytosis in the Activation of the Extracellular Signal- Regulated Kinase Cascade by Sequestering and Nonsequestering G Protein- Coupled Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: pp 1489-1494.

Pitcher JA, Freedman N J and Lefkowitz R J (1998) G Protein-Coupled Receptor Kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: pp 653-692.

Ramsay D, Kellett E, McVey M, Rees S and Milligan G (2002) Homo- and Hetero-Oligomeric Interactions Between G Protein-Coupled Receptors in Living Cells Monitored by Two Variants of Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Biochem J* **365**, Pt 2: pp 429-440.

Reddy PS and Corley R B (1998) Assembly, Sorting, and Exit of Oligomeric Proteins From the Endoplasmic Reticulum. *Bioessays* **20**: pp 546-554.

Rocheville M, Lange D C, Kumar U, Patel S C, Patel R C and Patel Y C (2000a) Receptors for Dopamine and Somatostatin: Formation of Hetero-Oligomers With Enhanced Functional Activity. *Science* **288**: pp 154-157.

Rocheville M, Lange D C, Kumar U, Sasi R, Patel R C and Patel Y C (2000b) Subtypes of the Somatostatin Receptor Assemble As Functional. *J Biol Chem* **275**: pp 7862-7869.

Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro A J, de Ana A M, Albar J P, Martinez A and Mellado M (1999) The Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induces Functional Responses Through Dimerization of Its Receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: pp 3628-3633.

Roess DA, Horvat R D, Munnely H and Barisas B G (2000) Luteinizing Hormone Receptors Are Self-Associated in the Plasma Membrane. *Endocrinology* **141**: pp 4518-4523.

Rohrer DK, Desai K H, Jasper J R, Stevens M E, Regula D P, Jr., Barsh G S, Bernstein D and Kobilka B K (1996) Targeted Disruption of the Mouse Beta1-Adrenergic Receptor Gene: Developmental and Cardiovascular Effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: pp 7375-7380.

Romano C, Yang W L and O'Malley K L (1996) Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Disulfide-Linked Dimer. *J Biol Chem* **271**: pp 28612-28616.

Rousseau G, Nantel F and Bouvier M (1996) Distinct Receptor Domains Determine Subtype-Specific Coupling and Desensitization Phenotypes for Human β_1 - and β_2 -Adrenergic Receptors. *Mol Pharmacol* **49**: pp 752-760.

Rybin VO, Xu X, Lisanti M P and Steinberg S F (2000) Differential Targeting of Beta-Adrenergic Receptor Subtypes and Adenylyl Cyclase to Cardiomyocyte Caveolae. A Mechanism to Functionally Regulate the CAMP Signaling Pathway. *J Biol Chem* **275**: pp 41447-41457.

Sabri A, Pak E, Alcott S A, Wilson B A and Steinberg S F (2000) Coupling Function of Endogenous Alpha(1)- and Beta-Adrenergic Receptors in Mouse Cardiomyocytes. *Circ Res* **86**: pp 1047-1053.

Salahpour A, Angers S and Bouvier M (2000) Functional Significance of Oligomerization of G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Endocrinol Metab* **11**: pp 163-168.

Salomon Y, Londos C and Rodbell M (1974) A Highly Sensitive Adenylate Cyclase Assay. *Anal Biochem* **58**: pp 541-548.

Samson M, Libert F, Doranz B J, Rucker J, Liesnard C, Farber C M, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth R J, Collman R G, Doms R W, Vassart G and Parmentier M (1996) Resistance to HIV-1 Infection in Caucasian Individuals Bearing Mutant Alleles of the CCR-5 Chemokine Receptor Gene. *Nature* **382**: pp 722-725.

Sano M, Yoshimasa T, Yagura T and Yamamoto I (1993) Non-Homogeneous Distribution of Beta 1- and Beta 2-Adrenoceptors in Various Human Tissues. *Life Sci* **52**: pp 1063-1070.

Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A, Griffon N, Corsini G U, Sokoloff P, Levenson R, Vogel Z and Maggio R (2001) D2/D3 Dopamine Receptor Heterodimers Exhibit Unique Functional Properties. *J Biol Chem* **276**: pp 30308-30314.

Schlessinger J (2000) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *CELL* **103**: pp 211-225.

Shiina T, Kawasaki A, Nagao T and Kurose H (2000) Interaction With Beta-Arrestin Determines the Difference in Internalization Behavior Between Beta1- and Beta2-Adrenergic Receptors. *J Biol Chem* **275**: pp 29082-29090.

Shiina T, Nagao T and Kurose H (2001) Low Affinity of Beta1-Adrenergic Receptor for Beta-Arrestins Explains the Resistance to Agonist-Induced Internalization. *Life Sci* **68**: pp 2251-2257.

Steinfath M, Danielsen W, von der L H, Mende U, Meyer W, Neumann J, Nose M, Reich T, Schmitz W, Scholz H and . (1992) Reduced Alpha 1- and Beta 2-Adrenoceptor-Mediated Positive Inotropic Effects in Human End-Stage Heart Failure. *Br J Pharmacol* **105**: pp 463-469.

Sullivan R, Chateauneuf A, Coulombe N, Kolakowski L F, Jr., 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**: pp 460-467.

Summers RJ, Molnaar P, Russell F, Elnatan J, Jones C R, Buxton B F, Chang V and Hambley J (1989) Coexistence and Localization of Beta 1- and Beta 2-Adrenoceptors in the Human Heart. *Eur Heart J* **10 Suppl B**: pp 11-21.

Suzuki T, Nguyen C T, Nantel F, Bonin H, Valiquette M, Frielle T and Bouvier M (1992) Distinct Regulation of β_1 - and β_2 -Adrenergic Receptors in Chinese Hamster Fibroblasts. *Mol Pharmacol* **41**: pp 542-548.

Tarasova NI, Rice W G and Michejda C J (1999) Inhibition of G-Protein-Coupled Receptor Function by Disruption of Transmembrane Domain Interactions. *J Biol Chem* **274**: pp 34911-34915.

Tsao PI and Von Zastrow M (2001) Diversity and Specificity in the Regulated Endocytic Membrane Trafficking of G-Protein-Coupled Receptors. *Pharmacol Ther* **89**: pp 139-147.

Veatch W and Stryer L (1977) The Dimeric Nature of the Gramicidin A Transmembrane Channel: Conductance and Fluorescence Energy Transfer Studies of Hybrid Channels. *J Mol Biol* **113**: pp 89-102.

Vila-Coro AJ, Mellado M, Martin d A, Lucas P, del Real G, Martinez A and Rodriguez-Frade J M (2000) HIV-1 Infection Through the CCR5 Receptor Is Blocked by Receptor Dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: pp 3388-3393.

Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade J M, Martin d A, Moreno-Ortiz M C, Martinez A and Mellado M (1999) The Chemokine SDF-1 α Triggers CXCR4 Receptor Dimerization and Activates the JAK/STAT Pathway. *FASEB J* **13**: pp 1699-1710.

Von Zastrow M, Link R, Daunt D, Barsh G and Kobilka B (1993) Subtype-Specific Differences in the Intracellular Sorting of G Protein- Coupled Receptors. *J Biol Chem* **268**: pp 763-766.

Ward DT, Brown E M and Harris H W (1998) Disulfide Bonds in the Extracellular Calcium-Polyvalent Cation-Sensing Receptor Correlate With Dimer Formation and Its Response to Divalent Cations in Vitro. *J Biol Chem* **273**: pp 14476-14483.

Weiss A and Schlessinger J (1998) Switching Signals on or Off by Receptor Dimerization. *CELL* **94**: pp 277-280.

White JH, 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**: pp 679-682.

Xu J, Paquet M, Lau A G, Wood J D, Ross C A and Hall R A (2001) Beta 1-Adrenergic Receptor Association With the Synaptic Scaffolding Protein Membrane-Associated Guanylate Kinase Inverted-2 (MAGI-2). Differential Regulation of Receptor Internalization by MAGI-2 and PSD- 95. *J Biol Chem* **276**: pp 41310-41317.

Xu Y, Piston D W and Johnson C H (1999) A Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) System: Application to Interacting Circadian Clock Proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: pp 151-156.

Zacharias DA, Violin J D, Newton A C and Tsien R Y (2002) Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **296**: pp 913-916.

Zeng FY and Wess J (1999) Identification and Molecular Characterization of M3 Muscarinic Receptor Dimers. *J Biol Chem* **274**: pp 19487-19497.

Zhang SJ, Cheng H, Zhou Y Y, Wang D J, Zhu W, Ziman B, Spurgoen H, Lefkowitz R J, Lakatta E G, Koch W J and Xiao R P (2000) Inhibition of Spontaneous Beta 2-Adrenergic Activation Rescues Beta 1- Adrenergic Contractile Response in Cardiomyocytes Overexpressing Beta 2- Adrenoceptor. *J Biol Chem* **275**: pp 21773-21779.

Zheng M, Zhang S J, Zhu W Z, Ziman B, Kobilka B K and Xiao R P (2000) Beta 2-Adrenergic Receptor-Induced P38 MAPK Activation Is Mediated by Protein Kinase A Rather Than by Gi or Gbeta Gamma in Adult Mouse Cardiomyocytes. *J Biol Chem* **275**: pp 40635-40640.

Zhou X-M, Pak M, Wang Z and Fishman P H (1995) Differences in Desensitization Between Human β 1- and β 2- Adrenergic Receptors Stably Expressed in Transfected Hamster Cells. *Cell Signal* **7**: pp 207-217.

Zhu WZ, Zheng M, Koch W J, Lefkowitz R J, Kobilka B K and Xiao R P (2001) Dual Modulation of Cell Survival and Cell Death by Beta(2)-Adrenergic Signaling in Adult Mouse Cardiac Myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: pp 1607-1612.

Zhu X and Wess J (1998) Truncated V2 Vasopressin Receptors As Negative Regulators of Wild-Type V2 Receptor Function. *Biochemistry* **37**: pp 15773-15784.

Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Uozumi H, Kadowaki T and Yazaki Y (1999) Both Gs and Gi Proteins Are Critically Involved in Isoproterenol-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *J Biol Chem* **274**: pp 9760-9770.

