

Université de Montréal

# **Rôle du dimère G $\beta$ $\gamma$ dans l'organisation des systèmes de signalisation cellulaire**

par

Mélanie Robitaille

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

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

Novembre, 2009

© Mélanie Robitaille, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle du dimère  $G\beta\gamma$  dans l'organisation des systèmes de signalisation cellulaire

présentée par :  
Mélanie Robitaille

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur  
Terence E. Hébert, directeur de recherche  
Graciela Pineyro, membre du jury  
Jana Stankova, examinateur externe  
James Omichinski, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Selon le modèle classique, le signal reçu par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) se propage suite à des interactions transitoires et aléatoires entre les RCPGs, les protéines G et leurs effecteurs. Par les techniques de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET), de complémentation bimoléculaire de protéines fluorescentes (BiFC) et de co-immunoprécipitation, nous avons observé que les récepteurs, les protéines G et les effecteurs forment un complexe stable, avant et après l'activation des récepteurs. L'interaction entre l'effecteur Kir3 et le dimère  $G\beta\gamma$  se produit initialement au réticulum endoplasmique et est sensible à un agoniste liposoluble des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Bien que peu de spécificité pour les nombreux isoformes des sous-unités  $G\beta\gamma$  ait été observée pour l'activation du canal Kir3, les interactions précoces au RE sont plus sensibles aux différentes combinaisons de  $G\beta\gamma$  présentes. En plus de son rôle dans la régulation des effecteurs, le dimère  $G\beta\gamma$  peut interagir avec de nombreuses protéines possédant des localisations cellulaires autres que la membrane plasmique. Nous avons identifié une nouvelle classe de protéines interagissant avec la sous-unité  $G\beta$ , autant en système de surexpression que dans des extraits de cerveaux de rats, soit les protéines FosB et cFos, qui forment le complexe de transcription AP-1, suite à leur dimérisation avec les protéines de la famille des Jun. La coexpression du dimère  $G\beta\gamma$  réduit l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 induit par le phorbol 12-,myristate 13-acetate (PMA), sans toutefois interférer avec la formation du complexe Fos/Jun ou son interaction avec l'ADN. Toutefois, le dimère  $G\beta\gamma$  colocalise au noyau avec le complexe AP-1 et recrute les protéines histones déacétylases (HDAC) afin d'inhiber l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1.

**Mots-clés** : Protéine G hétérotrimérique, Kir3, BRET, BiFC, Complexe de signalisation, AP-1.

## Abstract

Based on the classical model of G protein activation, signal transduction occurs by transient and random interactions between the receptor, the G protein and the effectors. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET), bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC) and co-immunoprecipitation experiments revealed that receptor, heterotrimeric G proteins and effectors were found in stable complexes that persisted during signal transduction. Kir3 channel and G $\beta\gamma$  dimer interacts first in the endoplasmic reticulum (ER) and this interaction can be modulated by the membrane-permeable  $\beta_2$ -adrenergic agonist cimaterol. Little specificity has been reported for several isoforms of the G $\beta\gamma$  dimer in the activation of the Kir3 channel. However, we found that the “precocious” interaction in the ER is sensitive to the presence of different combination of G $\beta$  and G $\gamma$  subunits. Recently, a number of new proteins, which are not classical effectors at the plasma membrane have been shown to interact with G $\beta\gamma$ . These include histone deacetylases 4 and 5 (HDAC)[1, 2] and the glucocorticoid receptor. We identified a novel interaction between G $\beta\gamma$  subunit and the Fos proteins, which form the transcription factor AP-1 following their dimerization with Jun proteins. G $\beta\gamma$  and Fos interactions can be detected in HEK 293 cells overexpressing the two proteins as well as in brains from rats pre-treated with amphetamine. G $\beta\gamma$ /Fos interaction favours the nuclear translocation of G $\beta\gamma$  dimer and inhibits AP-1 transcriptional activity. G $\beta\gamma$  did not block Fos/Jun dimerization or the interaction of AP-1 with DNA but recruited HDACs to the AP-1 complex.

**Keywords** : Heterotrimeric G protein, Kir3, BRET, BiFC, Signalisation complex, AP-1

# Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
REMERCIEMENTS	XV
CHAPITRE 1	17
INTRODUCTION	17
1 <i>Protéine G hétérotrimérique</i>	18
1.1 Le dimère $G\beta\gamma$ et la régulation des effecteurs	19
1.2 Classification, structure et fonctions	20
2 <i>Effecteurs classiques de la signalisation par le dimère <math>G\beta\gamma</math></i>	23
2.1 Canaux Kir3	23
3 <i>Modèles de signalisation par les protéines G</i>	29
4 <i>L'acheminement des protéines</i>	32
4.1 Les manteaux protéiques	32
4.2 Formation du complexe COPII au RE	33
4.3 Formation du complexe COPI	34
4.4 Formation des puits tapissés de clathrine	34
4.5 Rôle des protéines Rabs	35
4.6 L'utilisation des petites protéines G dans l'étude des interactions protéiques	36
5 <i>Synthèse, assemblage et acheminement des récepteurs et des protéines G</i>	37
5.1 Les récepteurs	37
5.2 La dimérisation des récepteurs et l'ontogénèse.	37
5.3 L'acheminement des récepteurs	38

5.4	Synthèse et assemblage des protéines G	40
5.5	Acheminement des protéines G	47
6	<i>Spécificité des interactions selon le dimère Gβγ</i>	47
7	<i>Nouvelles protéines interagissant avec le dimère Gβγ</i>	49
7.1	Signalisation indépendante de l'activation d'un RCPG	49
7.2	Interconnexions entre le dimère Gβγ et d'autres voies de signalisation	50
7.3	Les effecteurs qui ne sont pas à la membrane plasmique	51
8	<i>Facteur de transcription de la famille des AP-1</i>	55
8.1	La famille des Fos	57
8.2	La famille des Jun	58
8.3	Mode de régulation du complexe AP-1	58
9	<i>L'étude des interactions protéiques par les techniques de BRET et de BiFC</i>	60
9.1	La technique de complémentation de fragments protéiques	60
9.2	Techniques de transfert d'énergie de résonance	64
9.3	Le BRET à 3 ou 4 partenaires	67
	HYPOTHESES DE LA THESE	69
	<b>CHAPITRE 2</b>	<b>70</b>
	HETEROTRIMERIC G PROTEINS AND THEIR EFFECTORS FORM STABLE COMPLEXES IN VIVO	70
	<i>Abstract</i>	71
	<i>Introduction</i>	72
	<i>Results</i>	74
	<i>Discussion</i>	83
	<i>Materials and Methods</i>	87
	<i>Acknowledgements</i>	94
	<i>References</i>	95
	<i>Figures</i>	101
	<b>CHAPITRE 3</b>	<b>113</b>
	INTRACELLULAR TRAFFICKING AND ASSEMBLY OF SPECIFIC KIR3 CHANNEL/G PROTEIN COMPLEXES	113
	<i>Abstract</i>	114
	<i>Introduction</i>	115
	<i>Materials and Methods</i>	117
	<i>Results</i>	121

<i>Discussion</i> -----	127
<i>Acknowledgements</i> -----	132
<i>References</i> -----	133
<i>Figures</i> -----	137
<b>CHAPITRE 4</b> -----	<b>158</b>
GB $\gamma$ IS A NEGATIVE REGULATOR OF AP-1 MEDIATED TRANSCRIPTION-----	158
<i>Summary</i> -----	159
<i>Introduction</i> -----	160
<i>Results</i> -----	162
<i>Discussion</i> -----	169
<i>Materials and Methods</i> -----	174
<i>Acknowledgments</i> -----	182
<i>References</i> -----	183
<i>Figures</i> -----	188
<b>CHAPITRE 5</b> -----	<b>204</b>
DISCUSSION-----	204
<i>Interaction constitutive entre les protéines G et leurs effecteurs</i> -----	205
<i>Interaction suivant l'activation des récepteurs</i> -----	207
<i>Les routes de l'acheminement à la membrane du canal 3.1/3.4</i> -----	208
<i>Les lieux d'interaction des complexes protéiques</i> -----	210
<i>Que deviennent les complexes une fois à la membrane plasmique?</i> -----	216
<i>Spécificité des complexes de signalisation</i> -----	217
<i>Rôles pour les différents sites de liaisons G<math>\beta\gamma</math>?</i> -----	219
<i>Un rôle pour le dimère G<math>\beta\gamma</math> dans la formation des complexes?</i> -----	221
<i>Les nouveaux rôles de G<math>\beta\gamma</math></i> -----	221
<i>La protéine G comme cible thérapeutique?</i> -----	223
CONCLUSION-----	226
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> -----	<b>227</b>
<b>ANNEXE</b> -----	<b>I</b>
LISTE DES PUBLICATIONS-----	I

## Liste des tableaux

TABLE I: Les petites protéines G employées pour étudier l'acheminement des complexes des voies de signalisation des RCPGs.....	36
TABLE II : Co-immunoprécipitation of RLuc-tagged effectors with GFP-G $\gamma_2$ .....	112



## Liste des figures

Figure 1 : <i>Le cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques.</i> .....	19
Figure 2 : <i>Structure tridimensionnelle de la protéine G hétérotrimérique.</i> .....	21
Figure 3 : <i>Structure d'une sous-unité formant le canal tétramérique Kir3.</i> .....	25
Figure 4 : <i>Les chaperones impliquées dans l'assemblage de la protéine G hétérotrimérique.</i> .....	46
Figure 5 : <i>Effecteurs classiques et nouvelles interactions du dimère <math>G\beta\gamma</math>.</i> .....	54
Figure 6 : <i>Les techniques de BiFC, FRET, BRET et BiFC/BRET.</i> .....	64
Figure 7 : <i>BRET à 4 partenaires</i> .....	68
Figure 8 : <i>Stimulation of Kir3.2 channels by co-expressed wild type and tagged <math>G\beta_1</math> and <math>G\gamma_2</math> subunits in <i>Xenopus</i> oocytes.</i> .....	101
Figure 9 : <i>Dose dependence of agonist-induced cAMP accumulation in cells co-expressing either AC and <math>G\gamma_2</math> or AC-RLuc and GFP-<math>G\gamma_2</math>.</i> .....	102
Figure 10 : <i>Co-immunoprecipitation of effectors with <math>G\beta\gamma</math>.</i> .....	103
Figure 11 : <i>BRET between AC-RLuc and either GFP-<math>G\gamma_2</math> or YFP-<math>G\beta_1\gamma_2</math>.</i> .....	105
Figure 12 : <i>BRET between Kir3.1-RLuc and either GFP-<math>G\beta_1</math>, GFP-<math>G\gamma_2</math> or YFP-<math>G\beta_1\gamma_2</math>.</i> .....	106
Figure 13 : <i>BRET between GFP-<math>G\gamma_2</math> and Kir3.1 is saturable and sensitive to receptor stimulation before surface targetting.</i> .....	108
Figure 14: <i>BRET between tagged effectors and <math>G\alpha</math> subunits is agonist-independent.</i> .....	110
Figure 15 : <i>The effects of varying protein expression levels on BRET between AC-RLuc and GFP-<math>G\gamma_2</math>.</i> .....	111
Figure 16. : <i>Kir3.4 subunit allows Kir3.1 subunit to reach the plasma membrane.</i> .....	137
Figure 17. <i>Sar 1 and Rab 1 dominant negative forms block channel trafficking to the cell surface.</i> .....	138
Figure 18. <i>Kir3.1/Kir3.4 expression levels and distribution in the presence of WT and DN Sar 1.</i> .....	139
Figure 19. <i>Kir3.1/3.4 trafficking is independent of Rabs 2,6,8,and 11.</i> .....	140

Figure 20. <i>DN Sar 1 did not prevent assembly of the channel heterotetramer.</i> .....	141
Figure 21. <i>Specific G<math>\beta</math> subunits interact with Kir3.1 in presence of G<math>\gamma</math>2.</i> .....	143
Figure 22. <i>G<math>\beta</math> subunits show different affinities for Kir3.1-RLuc.</i> .....	144
Figure 23. <i>G<math>\beta</math>III8E shows a reduced ability to compete for the GFP10-G<math>\beta</math>1/Kir3.1-Rluc interaction.</i> .....	146
Figure 24. <i>G<math>\beta</math> subunits show specificity in interactions with Kir3.2-RLuc.</i> .....	147
Figure 25. <i>Differential G<math>\gamma</math> subunit effects on Kir3.1/G<math>\beta</math><math>\gamma</math> interactions.</i> .....	148
Figure 26. <i>Interactions between Kir3.1 and G<math>\beta</math><math>\gamma</math> detected using co-immunoprecipitation.</i> .....	150
Figure 27. <i>Effect of soluble and membrane-localized <math>\beta</math>ARKct on Kir3.1/G<math>\beta</math><math>\gamma</math> interactions.</i> .....	151
Figure 28 (Supplementary). <i>Kir3.1/Kir3.4 expression levels and distribution in the presence of WT and DN Rab isoforms.</i> .....	153
Figure 29 (Supplementary). <i>Kir3.1 and G<math>\beta</math><math>\gamma</math> interact in the ER.</i> .....	154
Figure 30 (Supplementary). <i>Effects of DN Sar 1 and Rab 1 on Kir3.2 trafficking.</i> .....	155
Figure 31 (Supplementary). <i>Expression levels of BRET partners in experiments shown in Figure 23</i> .....	156
Figure 32 (Supplementary). <i>Expression levels of different HA-tagged G<math>\gamma</math> subunits used for experiments in Figure 24.</i> .....	157
Figure 33: <i>G<math>\beta</math>1 interacts with Fos.</i> .....	189
Figure 34: <i>AP-1 transcriptional activity is inhibited by co-expression of G<math>\beta</math><math>\gamma</math> dimer.</i> .....	191
Figure 35: <i>G<math>\beta</math><math>\gamma</math> and the AP-1 complex colocalize to the nucleus.</i> .....	192
Figure 36: <i>AP-1 dimerization is not blocked by G<math>\beta</math><math>\gamma</math> expression.</i> .....	194
Figure 37: <i>G<math>\beta</math><math>\gamma</math> does not change AP-1 DNA binding properties.</i> .....	196
Figure 38: <i>Interaction of HDAC isoforms and G<math>\beta</math><math>\gamma</math> is fostered by AP-1.</i> .....	197
Figure 39: <i>Recruitment of HDAC proteins by G<math>\beta</math><math>\gamma</math> inhibits AP-1 activity.</i> .....	200
Figure 40(Supplementary): <i>FosB does not interfere with G<math>\beta</math><math>\gamma</math> dimerization.</i> .....	202
Figure 41(Supplementary): <i>G<math>\beta</math><math>\gamma</math> does not change cFos/p300-HA interaction.</i> .....	203

Figure 42 : <i>L'interaction entre les récepteurs et les effecteurs est insensible aux DN des petites protéines G.</i> .....	211
Figure 43 : <i>L'interaction Kir3.1 et Gai est insensible à Sar1 et Rab1 DN.</i> .....	213
Figure 44 : <i>L'effet du cimatérol n'est pas inhibé par les protéines Sar1 DN.</i> .....	214
Figure 45 : <i>Effet de Sar1 H79G sur l'interaction entre le récepteur et le Gai.</i> .....	216

## Liste des abréviations

$\alpha_2$ aAR :	Récepteur $\alpha_2$ a-adrénergique
AA :	Acide aminé
AC :	Adénylate cyclase
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AGS :	Activateurs de la signalisation des protéines G
AMPC :	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 :	« Activator protein-1 »
ARN :	Acide ribonucléique
AT1R :	Récepteur de l'angiotensine de type II
$\beta_1$ AR :	Récepteur $\beta_1$ -adrénergique
$\beta_2$ AR :	Récepteur $\beta_2$ -adrénergique
BiFC :	Complémentation bimoléculaire de protéines fluorescentes
BRET :	Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence
CBP :	CREB-binding protein
CCT :	Complexe cytosolique de la chaperonine
CK2 :	« Casein kinase 2 »
CSP :	« J domain-containing cysteine string protein »
DN :	Dominant négatif
DRiP78 :	Protéine de 78 kDa interagissant avec le récepteur à la dopamine
FRET :	Transfert d'énergie de résonance de fluorescence
GABAB :	Récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique de type B
GAP :	Protéine stimulant la GTPase
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GDI :	Inhibiteur de la dissociation de GDP
GDP :	Guanosine diphosphate
GEF :	Facteur d'échange du GDP
GFP :	Protéine fluorescente verte

GIV :	« G $\alpha$ -interacting vesicle-associated protein »
GLuc :	Luciférase de <i>Gaussia princeps</i>
GTP :	Guanosine triphosphate
GTPase :	Enzyme hydrolysant le GTP
GR :	Récepteur aux glucocorticoïdes
HAT :	Histone acétyl transférase
HDAC :	Histone déacétylase
Hsp :	Protéine de choc thermique
MAPK:	Protéine kinase activée par des agents mitogènes
PhLP :	« Phosducin-like protein »
PIP2 :	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA :	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC :	Protéine kinase dépendante du calcium
PLC $\beta$ :	Phospholipase C $\beta$
PTX :	Toxine pertussique
RE :	Réticulum endoplasmique
ROS :	Segments externes des batônnets réiniens de bœuf
RCPG :	Récepteur couplé aux protéines G
RGS :	Régulateur de la signalisation des protéines G
RLuc :	Luciférase de <i>Renilla reniformis</i>
shRNA :	Petit ARN formant des boucles en épingles à cheveux
TGN :	Réseau du transgolgien
V2R :	Récepteur de la vasopressine de type 2
YFP :	Protéine fluorescente jaune

*À Lucette et Gaétan, qui on fait de  
l'éducation, une priorité pour leurs enfants*

## Remerciements

La rédaction de cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier infiniment.

Terry, le pilier central de mes recherches, qui par son enthousiasme débordant m'a permis de persévérer et de surmonter les moments de découragements. Son esprit créatif et innovateur et sa grandeur d'âme m'inspirent; j'aspire à lui ressembler lorsque je serai grande.

Dr. Victor Rebois, qui par son aide à distance, m'a permis de régler bien des problèmes. Sa rigueur et sa minutie exemplaires m'ont amenée à élever mes propres standards de travail. Je suis également reconnaissante pour tout le temps investi dans la rédaction de mes nombreuses lettres de référence.

Tous mes collègues de travail des dernières années : Phan, Nath, Carlis, Martin, Ale, Denis, Eugénie, Peter, Nitya et tous les autres. Un merci particulier à Darlaine, pour tous nos moments de filles le matin et à Isa pour le « comfort food ».

Ma famille : Julie, Lucette et Gaétan, pour leur support financier et moral et pour tous les moments agréables que nous avons passés ensemble.

François, correcteur en chef, partenaire de voyage et de vie, merci de m'avoir supportée (à double-sens) durant les dernières années et de toujours croire que j'ai le potentiel de réaliser mes rêves.

Hughes, pour sa fondation « parrainez un étudiant », qui m'a permis de manger chaud tous les dimanches soirs. Son imagination sans borne et sa vivacité d'esprit me divertissent toujours autant.

Les membres de mon comité de thèse, de mon examen prédoctoral ainsi que les membres du jury : Dr Michel Bouvier, Dr Nikolaus Heveker, Dr Stéphane Laporte, Dre Graciela Pineyro et Dre Jana Stankova.

Le FRSQ et l'Université de Montréal pour leur soutien financier.

Finalement phdcomics.com, qui reflète si bien la réalité des étudiants aux cycles supérieurs et qui a prouvé que les soupes Ramen étaient un repas digne de ce nom!



# Chapitre 1

## Introduction

Pour demeurer en vie, les cellules doivent répondre de façon adéquate à leur environnement. Dépendamment de leur localisation tissulaire, les cellules peuvent être en contact avec de nombreuses molécules physiologiques ou provenant de l'extérieur. Certaines molécules peuvent diffuser librement dans les cellules et créer une réponse simultanée, alors que d'autres ne peuvent pas passer la barrière lipidique de la membrane plasmique. La détection de ces dernières se fait à l'aide de récepteurs imbriqués dans la membrane plasmique qui achemineront le message de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur de la cellule (transduction de signal) par le déclenchement de modifications successives d'une série de protéines distinctes (cascade de signalisation). Une classe importante de récepteurs membranaires employée par les cellules est celle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Les RCPGs reconnaissent et répondent à un large éventail de modulateurs cellulaires tels que les : hormones, neurotransmetteurs, lipides, nucléotides, peptides, ions et photons [3, 4]. Ces signaux extracellulaires reçus par le récepteur sont transformés en signaux intracellulaires suite à l'activation des protéines G hétérotrimériques. Comme son nom l'indique, la protéine G hétérotrimérique est composée de trois sous-unités, soit les sous-unités  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . Puisque les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  forment un dimère dès leur biosynthèse et qu'elles ne seront jamais séparées en condition physiologique [5], elles sont normalement considérées comme une seule protéine. Sommairement, l'activation d'un RCPG par un agoniste conduit à l'activation de la protéine G hétérotrimérique. Celle-ci, sous sa forme activée, peut réguler l'activité de ses effecteurs cibles, ce qui provoque des changements immédiats dans les niveaux intracellulaires de seconds messagers qui pourront se traduire par des modifications dans la transcription de gènes cibles.

## 1 Protéine G hétérotrimérique

La protéine G hétérotrimérique tient le rôle de commutateur de la cascade de signalisation. Son cycle d'activation et de désactivation (Figure 1) peut être décrit comme suit. Sous sa forme inactive, la sous-unité  $G\alpha$  est liée à une molécule de guanosine diphosphate (GDP) et est associée au dimère  $G\beta\gamma$ . Le  $G\beta\gamma$  agit comme un inhibiteur de la dissociation de GDP (GDI= Guanine-nucleotide dissociation inhibitor) en ralentissant la vitesse de dissociation de la molécule de GDP [6, 7]. L'activation du récepteur, par un agoniste ou son activité constitutive, agit en tant que facteur d'échange (GEF=Guanine-nucleotide exchange factor) et favorise la relâche de la molécule de GDP liée à la sous-unité  $G\alpha$ . Le GDP sera remplacé par une molécule de guanosine triphosphate (GTP) puisque le taux cellulaire du GTP dépasse celui du GDP. La liaison de la molécule de GTP provoque un changement dans la conformation de la sous-unité  $G\alpha$  et permet une dissociation partielle ou totale du dimère  $G\beta\gamma$  (voir section 3). La protéine G, sous sa forme activée liant le GTP, peut réguler l'activité de certains effecteurs, en interagissant directement avec eux, tels que des enzymes ou des canaux ioniques. La sous-unité  $G\alpha$  possède une activité GTPasique intrinsèque qui lui permet d'hydrolyser son GTP en GDP et de retrouver sa forme inactive. L'activité des protéines stimulant la GTPase (GAP= Guanine-nucleotide activator protein) augmente la vitesse de l'hydrolyse du GTP. La description du cycle classique des protéines G décrit les modifications subies par la sous-unité  $G\alpha$ , mais qu'advient-il du dimère  $G\beta\gamma$  lorsque la sous-unité  $G\alpha$  est activée?

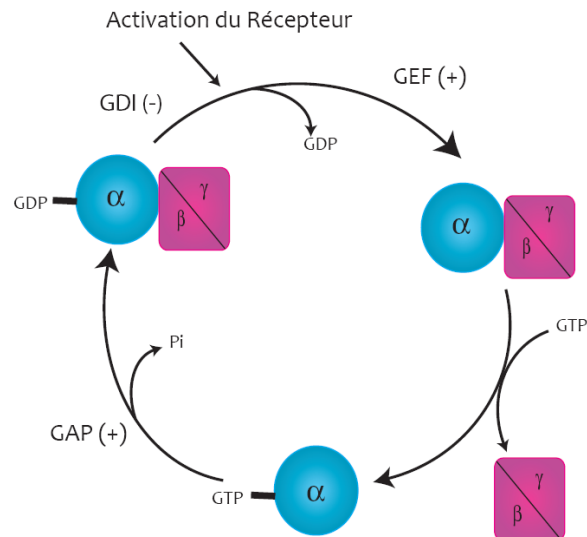


Figure 1 : *Le cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques.*

Au repos, la sous-unité  $G\alpha$  liée à une molécule de GDP forme un hétérotrimère avec le dimère  $G\beta\gamma$ . Suivant l'activation des récepteurs, la molécule de GDP sera libérée et remplacée par une molécule de GTP, favorisant la dissociation du complexe  $G\alpha/G\beta\gamma$ . L'hydrolyse du GTP en GDP permettra la réassociation du dimère  $G\beta\gamma$  et l'inactivation de la protéine G.

### 1.1 Le dimère $G\beta\gamma$ et la régulation des effecteurs

Lors de la découverte des protéines G hétérotrimériques, le seul rôle connu du dimère  $G\beta\gamma$  était celui de régulateur négatif de la signalisation par la sous-unité  $G\alpha$ . En gardant la sous-unité  $G\alpha$  liée au GDP, le dimère empêche son activation spontanée à l'état basal. La première preuve d'un rôle direct du dimère pour la régulation d'un effecteur fut découverte en 1987, lorsque le groupe de Clapham montra que des sous-unités  $G\beta\gamma$  purifiées à partir de cerveaux de bœufs étaient capables, à elles seules, d'activer un canal potassique cardiaque normalement activé par les récepteurs muscariniques suivant une relâche d'acétylcholine [8]. Depuis ce temps, la liste des effecteurs du dimère  $G\beta\gamma$  s'est considérablement allongée. Citons par exemple les canaux potassiques à rectification entrante de la famille des Kir3 tels que mentionnés ci-

haut [8], plusieurs isoformes de l'AC [9], la phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) [10, 11] et les canaux calciques à voltage dépendant [12]. La sous-unité G $\alpha$  et le dimère G $\beta\gamma$  partagent certains effecteurs, tels l'adénylate cyclase ou la PLC $\beta$  et la régulation de ces effecteurs se fait par une interaction physique directe.

## 1.2 Classification, structure et fonctions

### 1.2.1 La sous-unité G $\alpha$

Jusqu'à maintenant, chez les mammifères, 16 gènes codant pour la sous-unité G $\alpha$  ont été identifiés [13]. Cependant, en tenant compte des variants d'épissages et des modifications/clivages post-traductionnels, au moins 23 sous-unités G $\alpha$  sont présentes dans les cellules humaines [14]. La sous-unité G $\alpha$  contient deux domaines, soit un domaine GTPase, fortement conservé, qui est impliqué dans la liaison et l'hydrolyse du GTP ainsi qu'un domaine hélical unique. Le domaine hélical diverge au sein des différentes familles de G $\alpha$  et possède un rôle dans la spécificité du couplage avec les récepteurs et les effecteurs. La comparaison de la structure cristalline de Gat-GDP et de Gat-GTP $\gamma$ S a révélé la présence de 3 interrupteurs, désignés I, II et III, qui deviennent plus rigides et mieux ordonnés lorsque la sous-unité G $\alpha$  est liée au GTP [15, 16]. Le dimère G $\beta\gamma$  se lie dans une poche hydrophobe présente sur la sous-unité G $\alpha$  lorsque celle-ci est sous sa forme liant le GDP. La liaison du GTP supprime la poche hydrophobe et réduit donc l'affinité de G $\alpha$  pour le dimère G $\beta\gamma$  [16]. Les protéines hétérotrimériques peuvent être regroupées en quatre familles, selon l'homologie de séquence et la fonction de leurs sous-unités  $\alpha$ , soit Gs, Gi, Gq/11 et G12/13 [17, 18]. La liste des effecteurs de chaque classe de G $\alpha$  est très longue et peut varier au sein d'une même classe pour les différents isoformes. De façon générale, la classe G $\alpha$ s active l'AC et est activée par la toxine cholérique, la classe G $\alpha$ i inhibe l'activité de l'AC et est inhibée par la toxine pertussique (PTX), la classe G $\alpha$ q/11 active la PLC $\beta$  alors que la classe G12/13 est importante pour la régulation du cytosquelette, par son action sur la petite protéine G Rho.

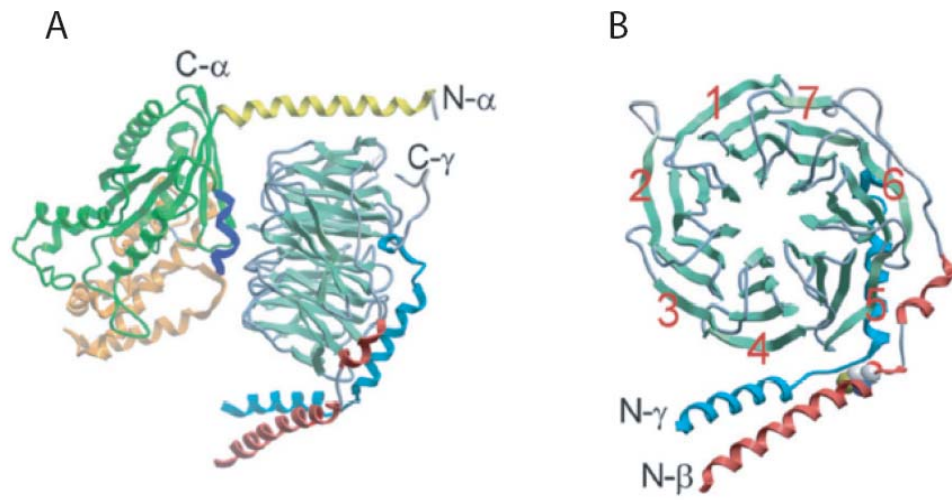


Figure 2 : *Structure tridimensionnelle de la protéine G hétérotrimérique.*

Figure tirée de [19]. A) Structure en ruban représentant la structure du cristal de l'hétérotrimère  $G\alpha\beta\gamma$ . L'extrémité N-terminale de la sous-unité  $G\alpha$  est représentée par une hélice jaune tandis que l'interrupteur numéro II est en bleu foncé. B) Structure en ruban du dimère  $G\beta\gamma$ , tournée de  $90^\circ$  par rapport à la structure présentée en A. L'extrémité C-terminale de la sous-unité  $G\beta$  est en rouge et forme une interaction en torsade d'hélice, avec la sous-unité  $G\gamma$ , représentée par le ruban bleu.

### 1.2.2 La sous-unité $G\beta$

Chez l'humain, 5 gènes codant pour les sous-unités  $G\beta$ , nommés  $G\beta 1-5$ , ont été identifiés [13]. Les sous-unités  $G\beta 1-4$  partagent une homologie de séquence de 78 à 88 % [20], alors que la sous-unité  $G\beta 5$ , structurellement différente des autres isoformes, ne partage que de 51 à 53 % d'homologie de séquence. La sous-unité  $G\beta 5$  possède aussi une séquence de 13 acides aminés de plus que les sous-unités  $G\beta 1-4$ . L'élucidation de la structure cristalline du dimère  $G\beta\gamma$  [21, 22] révèle que la sous-unité  $G\beta$  contient sept domaines en feuillets  $\beta$  organisés comme les pales d'une hélice (Figure 2). Son segment N-terminal contient une hélice  $\alpha$  de 25 résidus et une boucle qui fait la connexion entre l'hélice  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$ . Les structures en pales d'hélices comprennent chacune 4

feuillet  $\beta$ -antiparallèles. De plus, les sous-unités  $G\beta$  possèdent aussi sept domaines de répétition WD-40 [23]. Ce motif a été identifié dans environ 40 autres protéines impliquées dans la transduction de signal, la maturation moléculaire des acides ribonucléiques (ARN), la régulation génique, la fusion des vésicules et l'assemblage du cytosquelette [24]. Même si la structure de la sous-unité  $G\beta$  est répétitive, les répétitions ne sont pas identiques, suggérant une fonction unique pour chaque pale d'hélice, soit une interaction avec un effecteur spécifique.

La divergence de la sous-unité  $G\beta 5$  laisse présager des fonctions ou modes de régulation différents des autres sous-unités  $G\beta$ . Cette sous-unité est enrichie dans le cerveau [25, 26] et se retrouve dans les fractions membranaires et solubles des extraits de cerveau. En effet, entre 30 à 50 % des sous-unités  $G\beta 5$  se trouvent dans la fraction soluble, alors que les sous-unités  $G\beta 1-4$  sont principalement associées à la membrane plasmique [27]. Cette observation indique que la sous-unité  $G\beta 5$  possède probablement des partenaires d'interaction différents. Bien que  $G\beta 5$  puisse s'associer avec plusieurs sous-unité  $G\gamma$  [20, 21] son affinité pour celle-ci est moindre que ce qui est observé pour les autres sous-unités  $G\beta$ . La sous-unité  $G\beta 5$  possède aussi la capacité d'interagir avec les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS : regulator of G protein signaling), tel que la RGS11 [28] ou les RGS membres de la famille R7. Ces protéines, tout comme les sous-unités  $G\gamma$  contiennent un domaine d'interaction GGL ( $G\gamma$ -like domain) et c'est par ce domaine qu'elles se lient à  $G\beta 5$  [29].

### 1.2.3 La sous-unité $G\gamma$

Tout comme les sous-unités  $G\beta$ , les sous-unités  $G\gamma$  partagent une identité de séquence de presque 100% entre les différentes espèces de mammifères. Toutefois, les sous-unités  $G\gamma$  sont beaucoup plus différentes structurellement entre elles que les sous-unités  $G\beta$  et ne partagent que de 27 à 76% d'homologie de séquence. Cependant, les homologies de séquences augmentent grandement lorsque les sous-unités sont séparées en sous-famille. Chez l'humain, 11 gènes codant pour ces sous-unités ont été identifiés

[13]. La sous-unité  $G\gamma$  subit plusieurs modifications post-traductionnelles dont l'isoprénylation d'une cystéine conservée dans un motif CAAX à l'extrémité C-terminale de la protéine, une modification primordiale pour la localisation membranaire du dimère  $G\beta\gamma$ . La dimérisation entre une sous-unité  $G\beta$  et une sous-unité  $G\gamma$  non-prénylée résulte en la formation d'une protéine soluble [30]. La plupart des sous-unités  $G\gamma$  possèdent un résidu leucine à l'extrémité C-terminale qui permet l'addition d'un groupement géranylgeranyl alors que d'autres sous-unités ( $G\gamma 1$ ,  $G\gamma 8$ ,  $G\gamma 11$  et  $G\gamma 13$ ) possèdent un résidu sérine qui permet l'addition d'un groupement farnésyl [31-33]. Le groupement farnésyl est moins hydrophobe que le groupement géranyl alors, le dimère composé d'une sous-unité  $G\gamma 1$ , 8, 11 ou 13 est attaché plus faiblement à la membrane que les dimères comprenant les autres sous-unités  $G\gamma$ . La sous-unité  $G\gamma$  interagit avec la sous-unité  $G\beta$  par l'entremise d'un domaine en torsade d'hélices situé sur son extrémité N-terminale [23]. Jusqu'à maintenant, peu de fonctions ont été décrites pour la sous-unité  $G\gamma$ . La première indication d'un rôle de cette sous-unité dans l'activation des effecteurs fut en 2003 lorsqu'un groupe montra, par une approche employant des protéines chimères de levure et de mammifère, que l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $G\gamma 2$  était nécessaire à l'activation, induite par les protéines G, du canal Kir3 [34]. Le dimère  $G\beta\gamma$  peut interagir directement avec certains récepteurs tels que les  $\beta_1$ AR [35] ou le récepteur de la rhodopsine [36]. Cependant, la capacité du dimère  $G\beta\gamma$  à interagir avec le récepteur est influencée par le type de sous-unité  $G\gamma$  présente. En effet, le dimère  $G\beta 1\gamma 1$  peut supporter la liaison de la sous-unité  $G\alpha t$  au récepteur de la rhodopsine, alors que le dimère  $G\beta 1\gamma 2$  en est incapable [37].

## **2 Effecteurs classiques de la signalisation par le dimère $G\beta\gamma$**

### **2.1 Canaux Kir3**

Tel que mentionné précédemment, les canaux de la famille des Kir3 (canal potassique à rectification entrante) ont été les premiers effecteurs du dimère  $G\beta\gamma$  à avoir été identifiés. Ces canaux sont formés par l'assemblage de deux paires de sous-unités,

pour un total de quatre sous-unités par canal fonctionnel [38, 39]. Jusqu'à maintenant, quatre différentes sous-unités partageant une homologie de 60-80% ont été identifiées chez l'humain, soit les sous-unités Kir3.1, Kir3.2, Kir3.3 et Kir3.4 [40, 41]

Les canaux ioniques sont des protéines membranaires qui ont trois propriétés fonctionnelles essentielles, dont un pore qui laisse passer les ions selon leur gradient électrochimique, un filtre sélectif qui dicte quels ions peuvent passer le pore et un mécanisme qui permet de contrôler l'ouverture et la fermeture du pore. Chaque sous-unité des canaux Kir3, comprend deux segments transmembranaires nommés M1 et M2, une extrémité N et C-terminale du côté cytoplasmique ainsi que la région P formant le pore lorsque les sous-unités sont assemblées en tétramère (Figure 3). La région P comprend un motif Glycine-Tyrosine-Glycine qui constitue le filtre sélectif pour les ions  $K^+$ [42]. Ce motif est une signature bien particulière des canaux sélectifs pour les ions potassiques et est aussi trouvé sur d'autres canaux, tels que les canaux potassiques dépendant du voltage [43].

Ces canaux sont dit à rectification entrante, car au potentiel d'équilibre du potassium, ils ont l'habileté de laisser entrer plus d'ions potassium que d'en faire sortir. Cependant, en condition physiologique, la concentration des ions potassiques à l'intérieur de la cellule est d'environ 155 mM, alors que la concentration extérieure est d'environ 4 mM, créant ainsi un fort gradient électrochimique favorisant la sortie des ions potassiques. Le faible courant sortant provenant des canaux Kir3 influence le potentiel de repos membranaire et l'excitabilité de la membrane. Dans le cas des canaux Kir3, la rectification entrante est causée par des ions cytoplasmiques tels que des polyamines et le magnésium qui, à des voltages où la sortie des ions potassiques est favorisée, viennent bloquer le pore du canal sans toutefois être capable de passer le filtre de sélectivité [44-46]. Dans le contexte d'un potentiel d'action, l'ouverture des canaux potassiques à rectification entrante est responsable de la phase terminale d'hyperpolarisation de la membrane, prolongeant ainsi le potentiel d'action, c'est-à-dire l'intervalle possible entre deux événements de dépolarisation de la membrane. En



condition expérimentale, le courant entrant est généralement mesuré, puisque celui-ci est de plus grande amplitude que le courant sortant.

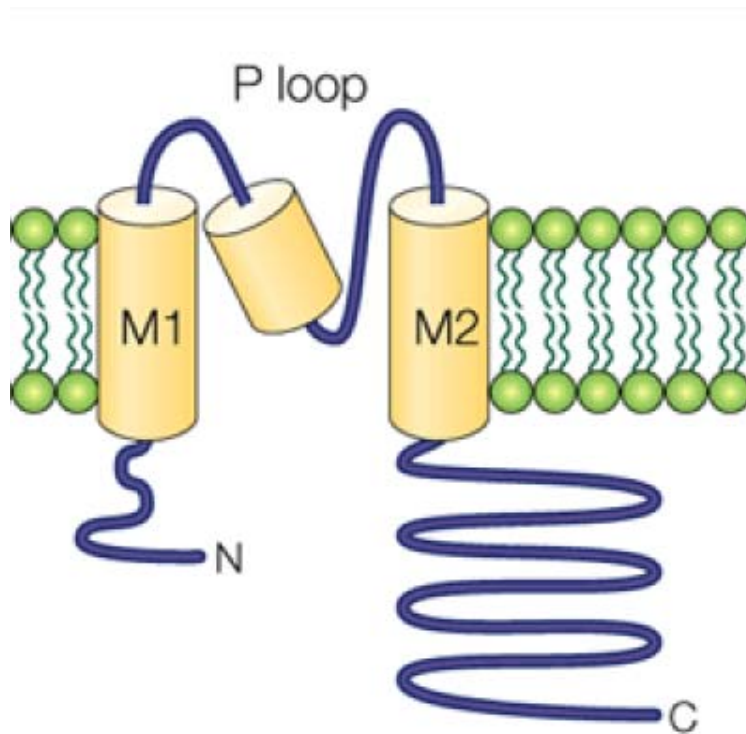


Figure 3 : Structure d'une sous-unité formant le canal tétramérique Kir3.

Figure tirée de [47]. Représentation d'une sous-unité des canaux Kir3. Chaque sous-unité contient deux segments transmembranaires nommés M1 et M2, une extrémité N et C-terminale intracellulaire ainsi qu'une région P qui formera le pore lorsque 4 sous-unités seront assemblées.

### 2.1.1 Fonction biologique et localisation tissulaire

L'importance de ces canaux peut être appréciée par le nombre de récepteurs membranaires qui utilisent ce système afin d'inhiber l'excitabilité des cellules dans différents organes tels que le cœur, le système nerveux et le système endocrinien. Parmi

ces récepteurs, citons les récepteurs muscariniques M2, A1 adénosine,  $\alpha$ 2-adrénérique, D2 dopamine,  $\mu$ -  $\delta$ - et  $\kappa$ -opioïd, 5-HT1A sérotonine, somatostatine, galanine, m-Glu, GABAB et sphingosine-1-phosphate [48-55]. Différentes combinaisons de Kir3.x sont retrouvées dans les différents tissus/cellules. Par exemple, le canal formé des sous-unités Kir3.1 et de Kir3.4 se retrouve principalement dans le cœur où son activation par des signaux provenant du système parasympathique diminue le rythme cardiaque [56, 57], alors que le canal formé des sous-unités Kir3.1 et Kir3.2 ou le canal homomérique Kir3.2 est prédominant dans le système nerveux où il provoque une action inhibitrice sur les neurotransmetteurs [58, 59]. Bien que des canaux homomériques Kir3.2 et Kir3.4 aient été trouvés dans les tissus natifs [60], l'expression exogène de ces canaux homomériques produit des canaux possédant une faible cinétique d'ouverture qui est différente des canaux natifs [61]. Les sous-unités Kir3.1 ne forment pas de canal homomérique fonctionnel, mais la surexpression des sous-unités Kir3.1 avec les sous-unités Kir3.2 et Kir3.4 se solde en des canaux hautement actifs qui possèdent des cinétiques identiques aux canaux natifs [62, 63].

### 2.1.2 Interaction avec les protéines G

Les canaux Kir3 sont activés par le dimère  $G\beta\gamma$  couplé aux sous-unités  $G\alpha$  qui sont sensibles au PTX, soit  $G_{ai}$  et  $G_{ao}$  [8, 64, 65]. Les sous-unités Kir3 possèdent de multiples sites permettant la liaison du dimère  $G\beta\gamma$  sur leur surface intracellulaire et c'est cette interaction physique qui est responsable de leur activation. Chaque sous-unité contient au moins un site de liaison du dimère  $G\beta\gamma$  sur l'extrémité N-terminale et un ou deux sites sur l'extrémité C-terminale [66], ce qui fait jusqu'à 12 sites de liaison du dimère  $G\beta\gamma$  par canal fonctionnel. Des études avec des agents de réticulation suggèrent que 4 sous-unités  $G\beta\gamma$  peuvent se lier à un hétérotétramère Kir3.1/3.4 ou à un homotétramère Kir3.4 [67]. Suivant l'activation par le dimère  $G\beta\gamma$ , les canaux Kir3.1/3.4 adoptent quatre modes fonctionnels qui sont caractérisés par différentes probabilités et durées moyennes d'ouverture. L'équilibre entre les quatre modes balance graduellement d'une faible à une haute efficacité d'ouverture, en relation avec

l'augmentation de la concentration de  $G\beta\gamma$  [68, 69]. Ce comportement serait en fait causé par la liaison d'un nombre différent de sous-unité  $G\beta\gamma$  sur quatre capteurs identiques, mais indépendants, se trouvant sur le canal [68]. Ce mécanisme permettrait au canal Kir3.1/3.4 de contrôler l'excitabilité de la membrane avec une grande précision, ce qui est un préalable pour l'intégration de signaux opposés.

En plus des sites de liaison du dimère  $G\beta\gamma$ , des sites de liaison pour les sous-unités  $G\alpha$  ont aussi été identifiés sur les sous-unités des canaux Kir3. Cette interaction aurait probablement pour rôle d'établir la spécificité de signalisation en faisant le lien entre les canaux et les RCPGs sensibles au PTX [70, 71].

### 2.1.3 *Autres modes de régulation*

En plus de leur activation par le dimère  $G\beta\gamma$  et de leur inhibition par les polyamines et le magnésium, l'activité des canaux de la famille Kir3 est modifiée physiologiquement par de nombreuses molécules et protéines.

#### 2.1.3.1 La phosphorylation et le rôle du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

L'activation des RCPGs qui sont couplés aux sous-unités  $G\alpha_q$  peut inhiber les canaux Kir3 autant *in vivo* que lorsque le canal est exprimé dans des cultures de cellules de mammifères. Le mécanisme moléculaire de l'inhibition relié à la sous-unité  $G\alpha_q$  inclut l'activation de la PLC et de la protéine kinase dépendante du calcium (PKC). Par la méthode de patch excisé, la présence de PKC purifiée inhibe les courants du canal Kir3 et le recouvrement du courant est prévenu par l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatase [72]. La phosphorylation du canal par la PKC diminue sa probabilité d'ouverture [73]. Pour sa part, l'activation de PLC cause une diminution de la concentration de phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) [74], qui est un régulateur de la fonction de plusieurs canaux et transporteurs [75], dont les canaux Kir3. Les sous-unités  $G\beta\gamma$  et le PIP2, se lient sur les extrémités C et N-terminales des sous-unités constituant les canaux, ce qui stabilise la forme active du canal [76]. Le PIP2 ne permet

pas d'activer le canal comme tel, mais stabilise le canal lorsque celui-ci est dans sa conformation laissant passer les ions. Le dimère  $G\beta\gamma$  ne peut pas activer le canal en absence de PIP2.

La phosphorylation des canaux n'a pas que des effets inhibiteurs. En effet, leur phosphorylation par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) permet la potentialisation de l'activité du canal et renforce l'interaction du canal avec le PIP2 [77]. Par spectrométrie de masse, la sérine 285 de l'extrémité C-terminale du canal Kir3.1 a été identifiée comme étant une cible pour la phosphorylation par la PKA. La mutation de cette sérine, par une alanine, diminue la sensibilité des courants à la forskoline ou le H89, des activateurs et inhibiteurs de la PKA [78].

#### 2.1.3.2 Les protéines RGS

Les cinétiques d'ouvertures et de fermetures des canaux Kir3 clonés, suivant l'activation d'un récepteur, sont significativement plus lentes que les cinétiques observées à partir de cardiomyocytes ou de neurones isolés [79, 80]. Il fut montré en 1988 que la vitesse du cycle d'échange GDP/GTP et l'hydrolyse du GTP est une étape limitante pour l'activation des canaux Kir3 cardiaques dépendant des récepteurs muscarinique [81]. La découverte des protéines RGS qui accélèrent l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $G\alpha$  a permis de reconstituer des systèmes, utilisant des canaux clonés, ayant les mêmes cinétiques d'activation et de désactivation que les cellules natives isolées [82, 83]. Ceci suggère donc que les protéines RGS sont des composantes intégrales du complexe cardiaque et neuronal formé par le récepteur, la protéine G et le canal Kir3.

#### 2.1.4 *Acheminement membranaire des sous-unités Kir3.1 et Kir3.4*

Même si aucun signal de rétention au RE n'a été identifié pour la sous-unité Kir3.1, celle-ci y réside lorsqu'elle est exprimée seule [84]. Les canaux Kir3.2 et Kir3.4 contiennent des signaux d'export du RE et peuvent atteindre la surface de la cellule efficacement en tant que canal homomérique [85]. Des études de délétions, sur la sous-

unité Kir3.4 ont permis d'identifier les régions responsables de son acheminement à la surface de la cellule. Les acides aminés, de la région N-terminale, 1 à 36 possèdent le signal d'export du RE [84]. La construction d'une protéine chimérique comprenant les 49 premiers acides aminés de la sous-unité Kir3.4 et les acides aminés 42-501 de la sous-unité Kir3.1 démontra que la présence du signal d'export du RE n'est pas suffisante pour amener la sous-unité Kir3.1 à la membrane plasmique [86]. Ceci suggère donc que des mécanismes supplémentaires au signal d'export du RE sont requis pour la localisation, à la surface de la cellule, des canaux Kir3. Les études de délétions sur la sous-unité Kir3.4 ont aussi permis de déterminer que la région 391-408, située sur la partie C-terminale, contrôle aussi le transport du canal entre le RE et la membrane plasmique. En effet, sa délétion favorise l'accumulation du canal dans des vésicules intracellulaires [84], soulignant l'implication d'au moins deux mécanismes distincts permettant l'acheminement membranaire de la sous-unité Kir3.4.

### **3 Modèles de signalisation par les protéines G**

Deux idées opposées circulent encore à savoir comment les récepteurs activés transmettent l'information à l'intérieur de la cellule. Le premier modèle élaboré, fut celui de « couplage par collision » [87]. Dans ce modèle, le récepteur, la protéine G hétérotrimérique et l'effecteur diffusent librement à la membrane plasmique. Le récepteur activé doit entrer en collision avec une protéine G hétérotrimérique afin de l'activer, qui, à son tour, doit entrer en collision avec l'effecteur pour transmettre le message du récepteur. Le système de transduction de signal par les protéines G a été largement étudié dans les segments externes des bâtonnets rétiens de bœufs (ROS : bovine retinal rod outer segments). Ces organelles sont facilement isolables et hautement enrichies en récepteurs (rhodopsine), protéines G (Gt ou transducine) et en effecteurs (phosphodiesterase). En effet, mis ensemble, le récepteur, la protéine G et l'effecteur comptent pour plus de 90% des protéines des disques des ROS [88] et serait le seul système couplé aux protéines G dans ces membranes. Une cellule photoréceptrice est capable de détecter un seul photon, ce qui fait de la phototransduction un mécanisme

extrêmement sensible. Ce niveau de sensibilité requiert évidemment une amplification de signal qui se produit lors de la deuxième étape de la transmission de signal. En effet, une seule molécule de rhodopsine peut interagir, à tour de rôle avec une centaine de molécules de transducine inactive, par un mécanisme de collision aléatoire [89]. Même s'il y a maintenant certaines indications qui suggèrent que ce système est plus organisé que ce qui avait été décrit en premier lieu, le modèle de couplage par collisions contribuerait à la sensibilité de la phototransduction. Cependant, il n'est pas certain qu'un mécanisme similaire se produit pour les autres voies de signalisation des RCPGs, même dans le cas des autres systèmes sensoriels qui sont eux aussi très sensibles aux stimuli extérieurs [90].

La plupart des cellules possèdent de nombreux récepteurs, protéines G et effecteurs différents. La rapidité de la transmission du signal et la spécificité des interactions observées ne peuvent pas être décrites par un modèle de couplage par collisions aléatoires. Par exemple, l'activation complète du canal Kir3 se fait en moins d'une seconde suivant l'ajout de l'agoniste [80, 91, 92]. La rapidité de la réponse suggère donc que les molécules de signalisation ne voyagent que sur de très courtes distances. Les myocytes de la veine porte des rats contiennent au moins 11 différents récepteurs qui sont capables d'activer 7 différentes sous-unités  $G\alpha$ , 5 différentes sous-unités  $G\beta$ , 8 différentes sous-unités  $G\gamma$  et 6 différents effecteurs couplés aux protéines G [93]. La spécificité des voies de signalisation observée doit, par conséquent, être contrôlée par un mécanisme quelconque autre que celui des interactions aléatoires entre les différents membres impliqués dans la signalisation. Depuis quelques années, un nouveau modèle s'impose tranquillement dans la communauté scientifique, soit le modèle de précouplage des complexes de signalisation. Selon cette hypothèse, les composantes impliquées dans la signalisation seraient déjà présentes sous la forme d'un complexe plus ou moins stable à la membrane plasmique, dans un état inactif, attendant l'activation du récepteur. De nombreuses études ont décrit une interaction stable en condition basale (en absence de stimulation du récepteur) entre les récepteurs et les

protéines G [94-96], les protéines G et les effecteurs [97] de même qu'entre les récepteurs et les effecteurs [98, 99].

Fait intéressant, en plus d'être sous la forme d'un complexe stable avant l'activation, certaines études suggèrent aussi que les complexes pourraient rester formés suivant l'activation des récepteurs, y compris le récepteur et la sous-unité  $G\alpha$  [94] et même les sous-unités  $G\alpha$  et le dimère  $G\beta\gamma$  de la protéine G hétérotrimérique [100]. Les premières études portant sur l'activation des protéines G hétérotrimériques montrèrent une réduction de leur taille apparente en solution [101] et une séparation entre la sous-unité  $G\alpha$  et le dimère  $G\beta\gamma$  par filtration sur gel [102], suggérant une dissociation de la protéine G hétérotrimérique suivant son activation. Cependant, ces études *in vitro* ne font pas directement la démonstration directe de la dissociation *in vivo*. Dans les cellules, les évidences supportant le mécanisme de dissociation ont été principalement réalisées à partir de l'étude de la translocation des protéines G suivant leur activation. Certaines de ces études montrèrent une différence dans la localisation sous cellulaire ou dans la vitesse de translocation pour les sous-unités  $G\alpha$  et le dimère  $G\beta\gamma$  [103-105], suggérant que les protéines G hétérotrimériques se dissocient, *in vivo*, suivant leur activation. Cependant, d'autres études *in vivo*, employant notamment la technique de transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) montra une augmentation inattendue du signal de FRET entre la sous-unité  $G\alpha$  et le dimère  $G\beta\gamma$ , suite à l'activation d'un récepteur, suggérant un réarrangement de la protéine G hétérotrimérique plutôt qu'une dissociation [100]. Les événements contrôlant la destinée, soit un changement conformationnel ou une dissociation, des protéines G suivant leur activation ne sont pas encore compris.

La découverte de ces complexes multiprotéiques soulève de nombreuses questions à savoir à quel moment et à quel endroit dans la cellule ces interactions se forment. Les premières études venant du laboratoire du Dr. Hébert à ce sujet suggèrent que les protéines membres de ces complexes interagissent ensemble très tôt durant leur biosynthèse. En effet, il fut montré que la sous-unité Kir3.1, exprimée seule (donc

localisée au RE), peut être immunoprécipitée avec des récepteurs de la dopamine [98]. Jusqu'à maintenant, on pensait que chaque protéine impliquée dans la signalisation des RCPGs était acheminée à la membrane plasmique de façon indépendante les unes des autres. Cependant, si les complexes de signalisation se forment durant la biosynthèse des protéines, il serait important de comprendre les mécanismes d'acheminement des complexes du lieu de formation jusqu'à la membrane plasmique.

## **4 L'acheminement des protéines**

Le lieu de synthèse d'une protéine dans la cellule correspond rarement à son lieu d'action. Par conséquent, les cellules possèdent des mécanismes permettant l'acheminement intracellulaire des protéines, depuis leur lieu de formation jusqu'à leur destination finale. Par exemple, les protéines membranaires sont synthétisées à la membrane du RE, où une machinerie sophistiquée s'occupe du repliement et de la topologie des protéines en synthèse (la partie cytoplasmique fera toujours face au cytoplasme). La protéine nouvellement synthétisée est transportée de compartiment en compartiment, où elle subit les dernières modifications posttraductionnelles nécessaires à son bon fonctionnement, pour ensuite être acheminée à son lieu final d'action. Les protéines à acheminer voyagent dans la cellule à bord de vésicules. Ces vésicules sont formées à partir de la membrane de l'organelle de départ et sont fusionnées avec la membrane de l'organelle réceptrice. Les protéines à acheminer sont concentrées dans un domaine membranaire bien précis appelé le site de sortie. Celui-ci est caractérisé par la formation d'un bourgeon, tapissé du côté cytoplasmique par une couche de protéines complexes et hétérogènes, appelée manteau protéique.

### **4.1 Les manteaux protéiques**

Suivant l'endroit cellulaire où la vésicule est formée, le manteau protéique est constitué de complexes de protéines différentes. Par exemple le COPI, contrôle le transport rétrograde du Golgi vers le RE et le transport intraGolgi [106], le COPII,



contrôle le transport antérograde entre le RE et le Golgi [107] et les puits tapissés de clathrine, contrôlent le transport post-Golgi et l'endocytose [108].

L'assemblage des manteaux protéiques COPI et COPII est contrôlé par les petites protéines G ARF et Sar1 respectivement. Ces petites protéines G sont similaires aux sous-unités  $G\alpha$  de la protéine G hétérotrimérique, du fait que leur activation/désactivation se fait aussi par l'interrupteur GTP/GDP. Arf et Sar1, sous leur forme inactive liant le GDP, sont essentiellement solubles et se retrouvent au cytoplasme. La transition GDP-GTP contrôle l'avidité de la protéine pour les membranes lipidiques, ce qui permet à la forme GTP de s'attacher fortement aux membranes. Cette liaison aux membranes sert de point d'ancrage aux manteaux protéiques [107, 109]. Le cycle d'assemblage et désassemblage des manteaux protéiques de type COPI et COPII est donc régi par le cycle GDP/GTP des petites protéines G.

## 4.2 Formation du complexe COPII au RE

L'assemblage du manteau protéique COPII est initié par l'échange de GDP pour une molécule de GTP sur la protéine Sar1. Le GEF de Sar1 est une protéine membranaire nommée Sec12 [110, 111]. La localisation intracellulaire de Sec12 est régulée de façon à ce que cette protéine ne se retrouve strictement qu'au RE, ce qui fait que la formation des complexes COPII est restreinte à ce compartiment [112-114]. L'échange du GDP/GTP favorise l'exposition de l'élément hydrophobe de la partie N-terminale de Sar1 qui peut alors s'insérer dans la membrane du RE [115, 116]. Sar1 activée recrute le complexe cytosolique Sec23/24 en se liant au Sec23, ce qui donne lieu au complexe de prébourgeonnement [117]. Le recrutement des protéines cytosoliques Sec13/31 favorise la déformation de la membrane et la création d'un bourgeon qui mène à la formation de la vésicule de type COPII [118].

Certaines protéines membranaires sont concentrées dans les vésicules de transport. Le court motif Asp-X-Glu sur ces protéines semble être reconnu par les

COPII. Ce motif est ainsi décisif pour l'acheminement de certains canaux potassiques suivant leur synthèse au RE [119].

### **4.3 Formation du complexe COPI**

L'échange de GDP pour une molécule de GTP, catalysé par un GEF, expose l'hélice N-terminale myristilée de Arf pour l'ancrage membranaire. Tout comme pour Sar1, l'échange GDP/GTP provoque un changement radical dans la structure de Arf. Seulement la forme Arf-GTP peut recruter le manteau protéique et permettre le bourgeonnement de la membrane. L'hydrolyse du GTP, stimulée par une GAP cause la rétraction de l'extrémité N-terminale myristilée et la dissociation subséquente de Arf des membranes.

### **4.4 Formation des puits tapissés de clathrine**

Les vésicules tapissées de clathrine contrôlent différentes étapes de transport entre le réseau transGolgien (trans-Golgi network : TGN) et la membrane plasmique. Ces vésicules sont composées de clathrine et de protéines adaptatrices, tels que AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, et les GGAs (Golgi-localizing,  $\gamma$ -adaptin ear domain homology, Arf-binding proteins). En plus de leur rôle dans la formation des vésicules de transport de type COPI, les protéines Arfs régulent aussi le recrutement des protéines adaptatrices de la clathrine AP-1, AP-3, AP-4 et GGAs au TGN et/ou aux endosomes. Exceptionnellement, AP-2 est recruté à la membrane plasmique par une interaction avec le PIP2.

La molécule de clathrine a la forme d'un triskèle, dont chaque pied possède une chaîne lourde de 180 kDa et une chaîne légère d'environ 34-40 kDa. Ce serait la polymérisation de la clathrine en un réseau au niveau de la face cytoplasmique des membranes qui induiraient le bourgeonnement de celles-ci.

## 4.5 Rôle des protéines Rabs

Une fois les protéines concentrées dans les sites d'export, les vésicules en formation doivent se détacher de la membrane de l'organelle de départ, être transportées à la membrane de l'organelle cible, s'attacher avec celle-ci et y fusionner. Ces processus sont en partie sous le contrôle des petites protéines G de la famille Rab [120]. Ces protéines, d'environ 20-30 kDa, font partie de la superfamille Ras. La famille des Rabs est composée de plus de 60 membres chez les mammifères. La comparaison de la séquence en acide aminés des protéines Rabs révèle une homologie d'environ 30-50% entre les différents membres. Règle générale, les Rabs diffèrent le plus dans leur région C-terminale, aussi connue sous le nom de région hypervariable, alors que les régions impliquant la liaison des guanines sont assez bien conservées. La partie C-terminale serait impliquée dans le ciblage des Rabs vers des organelles sous-cellulaires spécifiques. En effet, une des caractéristiques de cette famille est que chaque isoforme est trouvée dans un compartiment cellulaire bien distinct. Par exemple, la protéine Rab1b est localisée au RE [121], Rab3a est associée avec les vésicules synaptiques [122], Rab6 est trouvée au Golgi [123], alors que Rab8 est associée avec les vésicules de la voie de sécrétion constitutive [124].

Plusieurs protéines Rabs ont une expression ubiquitaire alors que d'autres sont spécifiques pour certaines cellules ou types de tissus. Par exemple, les isoformes Rab3 (Rab3A, 3B, 3C et 3D) sont présents dans les neurones, les cellules endocrines et exocrines [122, 125, 126] alors que la forme Rab17 est exprimée exclusivement dans les cellules épithéliales [127]. Chaque protéine Rab régule une étape du transport intracellulaire bien spécifique [120, 128].

Tel Arf et Sar1, les protéines Rabs-GDP cytoplasmiques sont converties en Rabs-GTP membranaires par une GEF. La forme GTP permet le recrutement de protéines moteurs à la vésicule afin de guider son mouvement à l'intérieur de la cellule [129]. L'association des vésicules à la membrane cible est renforcée par l'interaction des

protéines SNAREs. La protéine v-SNARE associée à la vésicule de transport interagira avec la protéine t-SNARE portée par la membrane acceptrice.

#### 4.6 L'utilisation des petites protéines G dans l'étude des interactions protéiques

Les petites protéines G Sar 1 et celles de la famille des Rabs sont maintenant utilisées comme outils afin d'étudier les voies d'acheminement de diverses protéines. En effet, les mutants dominants négatifs (DN) de ces protéines peuvent être employés pour caractériser les itinéraires des protéines durant leur biosynthèse, leur acheminement intracellulaire, de même que les voies empruntées pendant l'endocytose. Nous avons utilisé un certain nombre de ces protéines mutantes (TABLE I) afin d'étudier les voies d'acheminement à la membrane ou les lieux d'interactions entre les diverses protéines des voies de signalisation des protéines G (récepteur, protéine G, effecteur)

TABLE I: Les petites protéines G employées pour étudier l'acheminement des complexes des voies de signalisation des RCPGs

Petites protéines G	Dominants Négatifs	Fonctions
Sar 1	Sar1 T39N/ Sar1 H79G	RE→Golgi
Rab1	Rab1 S25N/ Rab1 N124I	RE→Golgi et Intra-golgi
Rab2	Rab2 S20N	Voie alternative RE→Golgi
Rab 6	Rab6 T27N	Intra-golgi
Rab8	Rab8 T22N	Réseau TGN→membrane plasmique
Rab11	Rab11 S25N	Réseau TGN↔membrane plasmique

Liste de différentes formes dominantes négatives de Sar1 et des Rabs en relation avec leurs fonctions dans l'acheminement des protéines membranaires.

## **5 Synthèse, assemblage et acheminement des récepteurs et des protéines G**

La localisation appropriée des protéines de signalisation à la surface de la cellule est requise afin de permettre aux ligands d'accéder aux récepteurs et d'ainsi transmettre le signal. La localisation à la surface des cellules est gouvernée par deux mécanismes prédominants : la livraison des protéines à un site particulier et la rétention de ces protéines à ce site.

### **5.1 Les récepteurs**

Les RCPGs représentent près de la moitié du marché des agents thérapeutiques et constituent des revenus annuels de plus de 40 milliards de dollars [130]. L'étude des séquences du génome humain a montré que le nombre total de gènes codant pour les RCPGs excède 950 et que la moitié sont des récepteurs impliqués dans l'odorat et le goût [131]. Les RCPGs partagent tous des caractéristiques communes soient : sept domaines transmembranaires, trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires ainsi qu'une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire.

### **5.2 La dimérisation des récepteurs et l'ontogénèse.**

Même si quelques études au courant des décennies 70 et 80 avait proposé que les RCPGs puissent exister sous forme de dimère ou d'oligomère, ce n'est que vers la fin des années 1990 que les études intensives sur le sujet commencèrent. En 1996, il fut montré, pour la première fois, que des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques ( $\beta_2$ AR) portant des étiquettes différentes pouvaient être co-immunoprécipités [132]. Par la suite, l'utilisation des techniques de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence ou de fluorescence (BRET: bioluminescence resonance energy transfert, FRET: fluorescence resonance energy transfert) (voir la section 10 pour la description de la technique de

BRET) a permis d'étudier la dimérisation des récepteurs dans des cellules vivantes. Plusieurs fonctions ont été attribuées au processus d' homo- et hétérodimérisation des RCPGs dont un rôle dans leurs propriétés pharmacologiques et la transduction du signal, mais aussi pour l'ontogenèse de ceux-ci.

L'export des récepteurs hors du RE est une étape cruciale dans le contrôle de l'expression des protéines à la surface de la cellule [133]. En effet, seulement les récepteurs correctement repliés pourront sortir du RE, les autres, étant reconnus par le système de contrôle de qualité du RE, seront retenus et dégradés [134]. L'exemple le plus souvent utilisé pour illustrer le rôle de la dimérisation dans l'ontogenèse des récepteurs est celui des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique de type B (GABAB : metabotropic  $\gamma$ -aminobutyric acid b receptor). Suivant le clonage moléculaire du récepteur GABA-B1 [135], les nombreux efforts pour mesurer la fonction de ce récepteur dans un système hétérologue furent infructueux. Il fut montré, par la suite, que la co-expression d'une deuxième sous-unité du récepteur GABA-B, soit la sous-unité GABA-B2 est nécessaire au couplage fonctionnel entre la sous-unité GABA-B1 et les effecteurs tels que les canaux potassiques à rectification entrante Kir3, les canaux calciques dépendant du voltage, et l'adénylate cyclase (AC) [136]. En effet, lorsque la sous-unité GABA-B1 est exprimée seule, elle est retenue à l'intérieur de la cellule sous une forme immature, car son extrémité C-terminale contient un motif de rétention RE [137]. Quant à elle, la sous-unité GABA-B2 exprimée seule se rend à la membrane plasmique, mais n'est pas fonctionnelle. L'hétérodimérisation des deux sous-unités permet l'acheminement à la membrane plasmique d'un récepteur fonctionnel.

### **5.3 L'acheminement des récepteurs**

L'importance de la localisation des RCPGs peut être décrite par les nombreuses maladies engendrées par une mauvaise localisation de ceux-ci. Par exemple, la rétinite pigmentaire, le diabète insipide néphrogénique lié au chromosome X et l'hypogonadisme hypogonadotrophique résultent d'une accumulation intracellulaire des

récepteurs mutants de la rhodopsine [138], de la vasopressine de type 2 (V2R) [139] et de la gonadolibérine [140], respectivement.

Plusieurs motifs d'acides aminés sont impliqués dans l'acheminement et l'internalisation des récepteurs. Notons par exemple, le motif dileucine des V2R qui serait impliqué dans son acheminement à la membrane, puisqu'une mutation de la première leucine de ce motif résulte en une accumulation du récepteur au RE [141]. Cependant, le même motif présent dans le récepteur  $\beta_2$ AR n'interfère pas avec son acheminement à la membrane, mais empêche l'internalisation de celui-ci [142]. Autre exemple, le motif FxxxFxxxF situé sur l'extrémité C-terminale de certains récepteurs permet leur interaction avec la protéine DRiP78, protéine résidente du RE. Cette association est connue pour son implication dans le transport à la membrane plasmique de plusieurs récepteurs transmembranaires tels que le récepteur dopaminergique D1, le M2 muscarinique, le récepteur AT1R et le récepteur  $\beta_2$ AR [143-145].

La protéine Rab1 est impliquée dans l'acheminement de certains RCPGs. En effet, l'expression de Rab1 sous sa forme DN, chez la drosophile, bloque le transport de la rhodopsine, emprisonnant le récepteur entre le RE et l'appareil de Golgi [146]. Le même phénomène a pu être observé pour le récepteur AT1R et le récepteur  $\beta_2$ AR, dans des cellules HEKs suite à l'utilisation d'un mutant DN de Rab1 ou de petits ARN interférents (siARN) dirigés contre la forme de type sauvage de Rab1 [147]. Nous avons aussi étudié l'itinéraire du récepteur  $\beta_2$ AR et avons montré que l'acheminement à la membrane de ce récepteur est dépendant des petites protéines G Sar1, Rab1, Rab6, Rab8 et Rab11, mais indépendant de Rab2. En effet, par une méthode de liaison d'un ligand radioactif aux récepteurs situés à la surface de la cellule, nous avons observé une baisse d'environ 25% des récepteurs  $\beta_2$ AR à la surface cellulaire en présence des formes DN des protéines Sar 1, Rab6, Rab8 et Rab11 ainsi qu'une baisse d'environ 60% en présence de la protéine Rab1 mutante [148].

## 5.4 Synthèse et assemblage des protéines G

*Le texte de cette section est fortement inspiré du manuscrit suivant, soumis à la revue Médecine/Science : L'implication des chaperones moléculaires dans l'assemblage et le fonctionnement des protéines G hétérotrimériques.*

*Mélanie Robitaille, Denis J. Dupré et Terence E. Hébert*

Les sous-unités G $\beta$  et G $\gamma$  sont synthétisées séparément et elles ne semblent pas pouvoir s'associer spontanément de façon efficace, suggérant l'implication de protéines accessoires lors de ce processus. À ce jour, les événements menant à la formation de ce dimère, c'est-à-dire les mécanismes permettant leur interaction initiale et contrôlant la spécificité de combinaison de sous-unités, sont très peu connus.

Les premières études d'association des sous-unités G $\beta\gamma$  ont été exécutées dans des systèmes de production de protéines *in vitro*, tels que les réticulocytes de lapins ou les extraits de germes de blé. Ces systèmes peuvent supporter la production de protéines en fournissant la machinerie cellulaire eucaryote nécessaire à leur synthèse. Ces études ont démontré qu'il est possible de synthétiser les dimères G $\beta_1\gamma_1$  et G $\beta_1\gamma_2$  *in vitro* à partir de lysats de réticulocytes de lapins, mais que seulement de 30 à 50% des sous-unités synthétisées formeront un dimère fonctionnel [108]. Cependant, lorsque la sous-unité G $\beta$  est synthétisée à partir d'extraits de germe de blé, avec le même rendement que dans les réticulocytes de lapins, celle-ci est incapable de s'associer à la sous-unité G $\gamma$  afin de former un dimère G $\beta\gamma$  [149]. Ces résultats suggèrent que l'environnement fourni par les réticulocytes de lapins possède des facteurs spécifiques aux mammifères qui sont absents des extraits de germes de blés. Ces facteurs, probablement des chaperones moléculaires, semblent être importants pour le repliement de la sous-unité G $\beta$  ou son association avec la sous-unité G $\gamma$ . Quant à elles, les sous-unités G $\gamma$  peuvent être synthétisées dans les lysats de réticulocytes de lapins, les extraits de germe de blé ou les



bactéries et former un dimère avec les G $\beta$  provenant de lysats de réticulocytes de lapins. Un des premiers indices évoquant le rôle d'une chaperone générale lors du repliement et de l'assemblage du dimère G $\beta\gamma$  vient des études sur la protéine de choc thermique de 90 kDa (Hsp90). Il fut montré que la protéine Hsp90 interagit de préférence avec la sous-unité G $\beta$  libre plutôt qu'avec la forme dimérique G $\beta\gamma$  [150] suggérant un rôle de Hsp90 dans le repliement de la sous-unité G $\beta$  ou lors de l'assemblage du dimère G $\beta\gamma$ . En plus des nombreuses chaperones dites générales (ex. : Hsp70, Tric/CCT, Hsp90, Bip, calnexine), les cellules possèdent un certain nombre de protéines chaperones spécifiques impliquées dans le repliement et/ou la formation de complexes de protéines particulières. Récemment, des protéines chaperones spécifiques impliquées dans le repliement des sous-unités de l'hétérotrimère G $\alpha\beta\gamma$  ont été identifiées.

#### 5.4.1 Des chaperones pour G $\beta$

Le complexe cytosolique de la chaperonine (*chaperone-containing T-complex polypeptide 1* : CCT) est une chaperone essentielle impliquée dans le repliement des protéines synthétisées dans le cytosol des cellules eucaryotes [151]. Les polypeptides nouvellement formés s'associent avec la structure en forme de bague du CCT et cette interaction diminue les niveaux d'énergie d'activation requis pour former la structure tridimensionnelle des protéines naissantes [152]. La sous-unité G $\alpha$  et plusieurs protéines comprenant une région WD40 en feuillet  $\beta$ , présente dans les sous-unités G $\beta$  [153-155] sont des substrats connus du complexe CCT. Une étude a montré que des sous-unités G $\beta$  synthétisées dans des réticulocytes de lapins peuvent être immunoprécipitées avec le CCT. Le complexe CCT possède une activité ATPase directement liée à son rôle de facilitation du repliement des protéines. Ainsi, l'inhibition de cette activité ATPase diminue grandement la quantité de dimère G $\beta\gamma$  produit, suggérant un rôle actif du CCT dans le repliement de la sous-unité G $\beta$  et la formation du dimère [156].

La découverte de la protéine phosducine, dans les cellules photoréceptrices de la rétine, ainsi que l'identification subséquente des protéines PhLP (« phosducin-like

proteins ») ont permis la mise en évidence de l'existence d'une famille de protéines cytosoliques régulant la fonction des protéines G. Cette famille comporte au moins 33 gènes dans plusieurs organismes, dont cinq chez les humains, qui peuvent être divisés en trois classes, soit phosducine-I, phosducine-II et phosducine-III [157]. Les premières études sur le rôle des protéines phosducines proposèrent qu'elles sont des inhibiteurs de la signalisation induite par les protéines G. Le mécanisme élaboré suggérait qu'en séquestrant le dimère  $G\beta\gamma$ , les phosducines empêchent l'interaction avec la sous-unité  $G\alpha$  et ses effecteurs [158, 159]. D'autres études suggérèrent cependant un rôle différent pour certains membres de la famille des phosducines. Il a été observé récemment que la protéine PhLP1 peut interagir avec le complexe CCT, sans toutefois être un substrat du CCT puisqu'elle est déjà sous sa forme fonctionnelle lorsqu'elle interagit avec celui-ci. On lui suggère plutôt un rôle de co-chaperone, nécessaire dans le processus de repliement de certaines protéines dépendantes du CCT [160]. Étant donné le rôle du CCT dans le repliement de  $G\beta$  [160], PhLP pourrait agir comme co-chaperone facilitant le repliement de la sous-unité  $G\beta$  jusqu'à sa conformation finale. Cette hypothèse a été confirmée par des observations faites chez *Dictyostelium discoideum* [161]. Dans ces cellules, la suppression de la protéine PhLP1 empêche la co-immunoprécipitation des sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  sous la forme d'un dimère. De plus, dans ces mêmes cellules, la sous-unité  $G\gamma$  n'est pas modifiée par l'ajout d'un lipide, étape première des modifications post-traductionnelles subit par le dimère  $G\beta\gamma$  suivant son assemblage. Dans les cellules de type sauvage, les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  se retrouvent principalement à la membrane plasmique, alors que dans les cellules où la protéine PhLP1 a été supprimée, les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  sont principalement cytoplasmiques [157]. Il est possible de détecter les formes monomériques de  $G\beta$  et de  $G\gamma$  dans les cellules supprimant PhLP1, mais la forme dimérique en est absente. Cela suggère donc un rôle important pour PhLP1 lors de l'assemblage du dimère.

À la suite des étapes de repliement de la sous-unité  $G\beta$ , celle-ci doit s'associer au sous-unité  $G\gamma$  pour former un complexe fonctionnel. Afin de procéder à l'assemblage du

dimère  $G\beta\gamma$ , la protéine PhLP1 doit être phosphorylée par la protéine kinase CK2 (« casein kinase 2 »). La phosphorylation par CK2 déstabilise le complexe ternaire PhLP1/ $G\beta$ /CCT et provoque donc la relâche de la sous-unité  $G\beta$  par le CCT, permettant, par le fait même, l'association avec  $G\gamma$ , créant un complexe intermédiaire PhLP1/ $G\beta$ 1/ $G\gamma$ 2 [162, 163] (Figure 4). Le mécanisme provoquant la relâche de la sous-unité  $G\beta$  impliquerait la répulsion stérique entre les phosphates de PhLP1 et les résidus chargés négativement dans le domaine apical de CCT. Cette répulsion cause la dissociation de l'intermédiaire PhLP1 phosphorylé/ $G\beta$  qui pourra s'associer éventuellement à la sous-unité  $G\gamma$ . À cette étape, nous ne sommes pas encore en présence d'un dimère  $G\beta\gamma$  fonctionnel puisque le complexe PhLP1- $G\beta$  n'inclut pas la sous-unité  $G\gamma$ . Suivant la découverte d'une nouvelle protéine chaperone pour la sous-unité  $G\gamma$ , nous avons pu proposer un mécanisme dictant l'assemblage de la sous-unité  $G\gamma$  à l'intermédiaire PhLP1-phosphorylé/ $G\beta$ .

#### 5.4.2 Une chaperone pour $G\gamma$

Contrairement à ce qui est observé pour  $G\beta$ , les sous-unités  $G\gamma$  seules n'interagissent pas avec le CCT [156]. Toutefois, nous avons récemment identifié une autre chaperone pour la sous-unité  $G\gamma$ , soit la protéine de 78 kDa interagissant avec le récepteur à la dopamine (DRiP78 pour « **D**opamine **R**eceptor-**i**nteracting **P**rotein 78 »). DRiP78 est une protéine membranaire résidente du réticulum endoplasmique (RE) appartenant à la même famille que les co-chaperones Hsp40 (la famille des protéines DnaJ). La protéine DRiP78 est connue pour son implication dans le transport à la membrane plasmique de plusieurs récepteurs transmembranaires tels que le récepteur dopaminergique D1, le M2 muscarinique, le récepteur de l'angiotensine de type II (AT1R) et le récepteur  $\beta_2$ AR [143-145]. La sous-unité  $G\gamma$  et la protéine DRiP78 interagissent au niveau du RE. Cette étude démontre que lorsque la synthèse protéique de novo est bloquée par le cycloheximide, la suppression de la protéine DRiP78 endogène, par l'utilisation de petits ARN formant des boucles en épingles à cheveux

(shRNA), réduit les niveaux exprimés de la protéine  $G\gamma_2$  par rapport à son contrôle sans shRNA. Ces résultats nous ont permis de suggérer un rôle pour la protéine DRiP78 dans le maintien de la stabilité des sous-unités  $G\gamma$  naissantes en absence de son partenaire d'hétérodimérisation  $G\beta$  [145]. Comme très peu d'études se sont attardées au rôle des chaperones dans le processus d'assemblage de complexes de signalisation, de nombreuses autres études seraient nécessaires afin de bien comprendre les mécanismes régulant l'assemblage. Par exemple, l'utilisation de cellules où les sous-unités  $G\beta$  sont supprimées pourrait être un outil intéressant afin de mieux caractériser le rôle de la protéine DRiP78 dans le maintien de la stabilité de la sous-unité  $G\gamma_2$ . En effet, dans ces cellules, la présence de DRiP78 exogène devrait provoquer une augmentation des taux intracellulaires de  $G\gamma_2$  monomériques.

Jusqu'à maintenant, aucune interaction n'a pu être détectée entre la protéine DRiP78 et la sous-unité  $G\beta$ . La formation d'un complexe ternaire de  $G\beta\gamma$  avec DRiP78 est peu probable puisque la sous-unité  $G\beta_1$  entre en compétition avec DRiP78 pour interagir avec la sous-unité  $G\gamma_2$  [145]. Cependant, la protéine DRiP78 peut s'associer directement avec la protéine PhLP1 [145], suggérant que le complexe PhLP1- $G\beta$  peut s'assembler avec le complexe DRiP78- $G\gamma$  et participer à la formation du dimère actif  $G\beta\gamma$  (Figure 4). Il reste à déterminer comment ces deux complexes interagissent ensemble pour favoriser la formation du dimère  $G\beta\gamma$ . Par la suite, une fois les chaperones libres à nouveau, celles-ci pourront interagir avec de nouvelles molécules naissantes de  $G\beta$  et de  $G\gamma$  afin de reprendre le cycle permettant l'assemblage du dimère  $G\beta\gamma$ .

#### 5.4.3 *Des chaperones potentielles pour $G\alpha$ ?*

Jusqu'à maintenant, nous détenons très peu d'information concernant la synthèse et l'assemblage de la sous-unité  $G\alpha$  avec les autres sous-unités formant la protéine G fonctionnelle. De nouvelles protéines interagissant avec la sous-unité  $G\alpha$ , qui ne sont pas des effecteurs membranaires classiques ont été identifiées. Parmi celles-ci, notons les

protéines CSP (« J domain-containing cysteine string protein »; [164]), GIV ( $G\alpha$ -interacting vesicle-associated protein; [165], Daple [165] et FLJ000354 [165]). Fait intéressant, la protéine CSP contient un domaine J caractéristique des protéines de la famille des chaperonne DnaJ/Hsp40, tout comme DRiP78. À ce moment, personne n'a encore étudié le rôle de ces protéines dans la maturation et la stabilité des sous-unités  $G\alpha$  ainsi que la formation ou l'assemblage des protéines G hétérotrimériques. L'étude de ces protéines pourrait révéler certains des liens manquants pour l'assemblage de la protéine G hétérotrimérique. Puisque  $G\alpha$  et PhLP-1 partagent le même domaine d'interaction sur la sous-unité  $G\beta$  [166], des études subséquentes devront être faites afin de déterminer si la sous-unité  $G\alpha$  et/ou ses chaperones potentielles pourraient avoir un rôle sur le détachement du dimère  $G\beta\gamma$  des chaperones PhLP-1 et DRiP78.

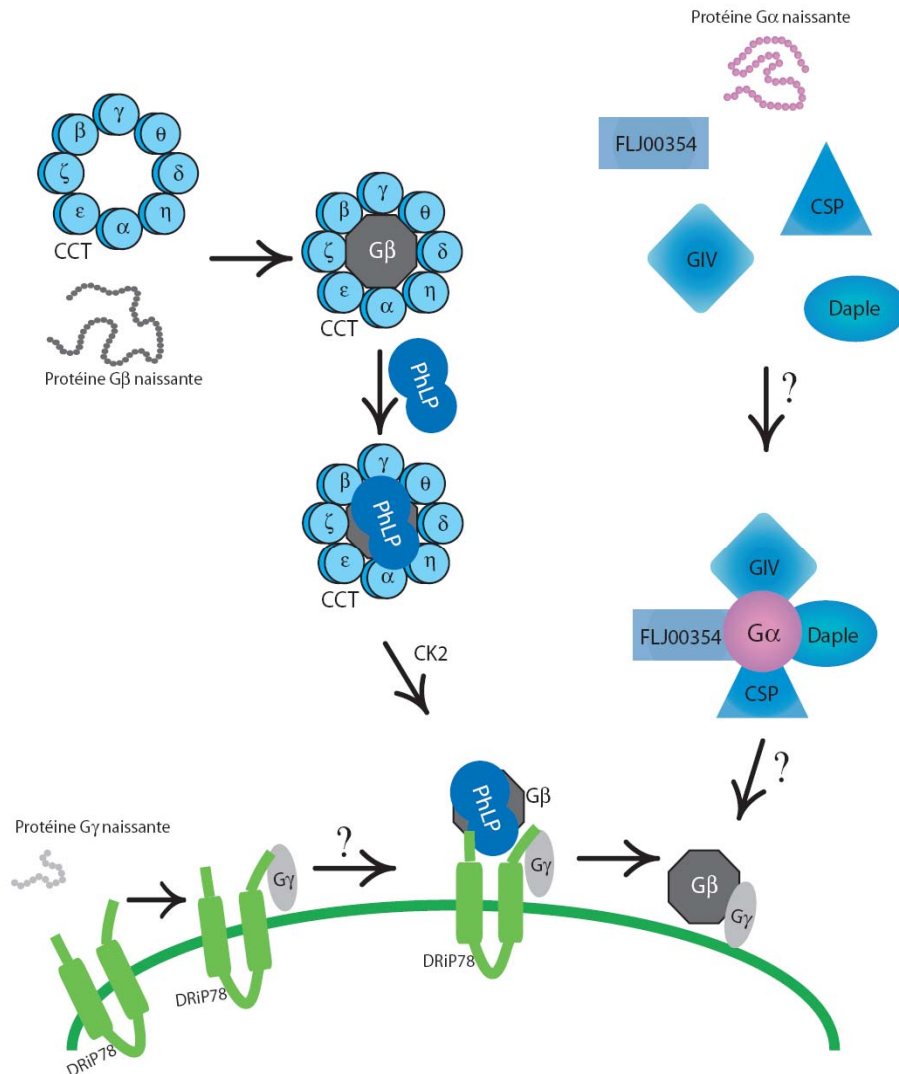


Figure 4 : Les chaperones impliquées dans l'assemblage de la protéine G hétérotrimérique.

Dans le modèle proposé, la protéine Gβ naissante forme un complexe ternaire avec les protéines CCT et PhLP. La phosphorylation de PhLP par la protéine CK2 provoque le relâchement du complexe Gβ-PhLP du CCT. Pour sa part, la sous-unité Gγ naissante sera associée à la protéine DRiP78, à la membrane du réticulum endoplasmique. L'interaction entre DRiP78 et PhLP permettra l'assemblage du dimère Gβγ. La protéine Gα naissante sera potentiellement complexée aux chaperones CSP, GIV, Daple et/ou FLJ000354. Il faudra déterminer si les chaperones du dimère Gβγ interagissent avec la sous-unité Gα et/ou ses protéines chaperones afin de former l'hétérotrimère.

## 5.5 Acheminement des protéines G

Le dimère  $G\beta\gamma$ , à priori cytoplasmique lors de sa synthèse, se retrouve principalement attaché aux membranes suites à des modifications posttraductionnelles. En effet, tel que mentionné précédemment, l'ajout d'un groupement prényl, farnésyl ou géranyl-géranyl sur la sous-unité  $G\gamma$  permet l'association du dimère aux membranes. Une étude montra que l'expression du dimère  $G\beta\gamma$  seul se solde par sa localisation intracellulaire, probablement attaché à la membrane du RE, alors que l'ajout de la sous-unité  $G\alpha$  permet l'acheminement du dimère  $G\beta\gamma$  à la membrane plasmique. Il fut alors proposé que les modifications lipidiques de la sous-unité  $G\alpha$  fourniraient un signal additionnel requis pour l'acheminement à la membrane plasmique de la sous-unité  $G\alpha$  et du dimère  $G\beta\gamma$  [167]. Malgré tout, les voies intracellulaires qu'emprunte l'hétérotrimère pour être acheminé à la membrane plasmique, suivant sa biosynthèse, ne sont pas encore bien connues. Certaines études suggèrent que les protéines G peuvent voyager par des routes distinctes de la voie classique d'exocytose puisque des perturbants de l'acheminement des protéines, tels que la Brefeldine A ou Sar1 DN ne préviennent pas la localisation à la surface de la cellule de l'hétérotrimère [168].

## 6 Spécificité des interactions selon le dimère $G\beta\gamma$

La spécificité existant entre la sous-unité  $G\alpha$  et les récepteurs, la sous-unité  $G\alpha$ , et les effecteurs et les récepteurs et les effecteurs est très bien documentée. Dans la majorité des cas, nous connaissons les sous-unités  $G\alpha$  et les effecteurs auxquels un récepteur donné est couplé. Cependant, cette spécificité d'interaction n'est que très peu connue pour le dimère  $G\beta\gamma$ . La signification fonctionnelle de la diversité des sous-unités  $G\beta\gamma$  et des multiples combinaisons de dimères possibles n'est pas encore comprise. Si toutes les différentes sous-unités  $G\beta$  pouvaient interagir et former de façon aléatoire un dimère avec toutes les sous-unités  $G\gamma$ , au moins 60 combinaisons de dimères seraient possibles. La présence d'un si grand nombre de dimères différents nous suggère une spécificité de signalisation pour différentes combinaisons de  $G\beta\gamma$ . Le nombre de dimères

possibles *in vivo* est cependant limité par le fait que les sous-unités possèdent des patrons d'expression tissulaire et cellulaire différents. Par exemple, les sous-unités G $\beta$ 5, G $\gamma$ 3 et G $\gamma$ 7 se trouvent principalement ou exclusivement dans le cerveau ou dans certaines sections du cerveau [169, 170] alors que la sous-unité G $\gamma$ 1 se retrouve seulement dans les cellules en bâtonnets de la rétine [171]. La plupart des sous-unités peuvent former un dimère *in vitro*, mais quelques exceptions ont été rapportées, telle que la sous-unité G $\beta$ 1 qui peut interagir avec les sous-unités G $\gamma$ 1 et G $\gamma$ 2 alors que la sous-unité G $\beta$ 2 peut seulement s'associer à la sous-unité G $\gamma$ 2 [172]. La région de la sous-unité G $\gamma$  qui définit la spécificité des interactions avec les sous-unités G $\beta$ 1 et G $\beta$ 2 est localisée dans une région comprenant 14 acides aminés [24].

Il existe une très grande spécificité et diversité de signal dans les voies de signalisation qui pourrait être expliquée par la présence de si nombreuses possibilités de dimères G $\beta\gamma$  différents. Cependant, il fut difficile de démontrer que la composition du dimère G $\beta\gamma$  joue un rôle important pour la spécificité de la signalisation. Les approches biochimiques ont révélé peu de différences pour les nombreuses combinaisons testées [17]. Toutefois, des approches génétiques ont eu plus de succès tel que le démontrent les exemples suivants. Premièrement, par microinjection d'oligonucléotides antisens, il fut suggéré que la sous-unité G $\gamma$ 3 est responsable du couplage entre le récepteur de la somatostatine et le canal calcique sensible au voltage de type L alors que la sous-unité G $\gamma$ 4 est responsable du couplage des récepteurs muscariniques au même canal dans des cellules d'hypophyse de rat [173]. Deuxièmement, il fut montré, par une approche employant les ribozymes, que la diminution de l'expression de la sous-unité G $\gamma$ 7 provoque une diminution directe de l'expression de la sous-unité G $\beta$ 1 [174]. De plus, une diminution de l'activation de l'AC dans des cellules exprimant le récepteur D1 a été observée, mais non dans des cellules exprimant le récepteur D5 [174]. Ceci suggère que les récepteurs D1 et D5 utilisent des dimères G $\beta\gamma$  différents pour l'activation de l'AC. Troisièmement, la suppression du gène *Gng7* (protéine G $\gamma$ 7) dans des souris cause une diminution des taux de G $\alpha$ olf détectés dans le striatum en plus d'une diminution de l'activité de l'AC [175]. Malgré tout, pour la plupart des récepteurs et des effecteurs, la



combinaison de  $G\beta\gamma$  requise pour générer un signal spécifique *in vivo* est encore inconnu.

## 7 Nouvelles protéines interagissant avec le dimère $G\beta\gamma$

La section suivante est fortement inspirée de l'article de revue suivant :

Dupre, D.J<sup>\*</sup>, Robitaille, M<sup>\*</sup>, Rebois, R.V. & Hebert, T.E. The role of  $G\beta\gamma$  subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. Annual review of Pharmacology and toxicology **49**, 31-56 (2009).

\* Co-premiers auteurs de l'article

En plus des protéines de signalisation classiquement associées avec les RCPGs, il est de plus en plus accepté que le dimère  $G\beta\gamma$  est aussi impliqué dans de nouvelles voies qui peuvent être indépendantes d'un RCPG ou qui régulent l'activité de protéines qui ne sont pas considérées comme étant des effecteurs classiques des RCPGs (Figure 5).

### 7.1 Signalisation indépendante de l'activation d'un RCPG

Selon le mécanisme classique, l'activation des protéines G hétérotrimériques se produit seulement lorsque le récepteur auquel elles sont couplées est activé, soit par un agoniste ou par une mutation constitutive. Cependant, il est de plus en plus accepté que la protéine G peut réguler des effecteurs de façon indépendante de l'activation d'un récepteur et ce, grâce aux activateurs de la signalisation des protéines G (AGS: activator of G protein signalling). Jusqu'à maintenant, dix protéines membres de ce groupe ont été identifiées [176, 177]. Ces protéines fonctionnent selon différents mécanismes. Les AGS du groupe I sont des GEF qui favorisent l'activation des protéines G sans passer par le récepteur. Celles-ci facilitent la dissociation de la molécule de GDP, ce qui permet la liaison d'une molécule de GTP sur la sous-unité  $G\alpha$ . Les AGS du groupe II, aussi

appelées GPR ou GoLoco, inhibent la dissociation de la molécule de GDP, mais favorisent la signalisation par le dimère  $G\beta\gamma$  en altérant l'association entre la sous-unité  $G\alpha$  et le dimère. Le groupe III diffère des autres groupes, car il ne semble pas pouvoir se lier de façon appréciable aux sous-unités  $G\alpha$ , mais produit ses effets en interagissant directement avec le dimère  $G\beta\gamma$ . Cette interaction pourrait soit favoriser la dissociation de l'hétérotrimère ou tout simplement compétitionner pour l'interaction entre le dimère  $G\beta\gamma$  et la sous-unité  $G\alpha$ . Par exemple, la protéine AGS2, membre du groupe III est une composante cytoplasmique de la chaîne légère du moteur dynéine et serait un effecteur important du dimère  $G\beta\gamma$  responsable de la modulation de l'excroissance des neurites [178].

La sous-unité  $G\beta 1$  peut être phosphorylée sur l'histidine 266 par une histidine kinase [179] et ce phosphate contenant une haute énergie peut être transféré à la sous-unité  $G\alpha$ -GDP pour générer une sous-unité  $G\alpha$ -GTP, par la protéine NDPK B (nucleoside diphosphate kinase B) [179]. Ce phénomène pourrait décrire un autre mécanisme par lequel l'activation de la protéine G hétérotrimérique peut se faire sans l'activation d'un récepteur en premier lieu. Dans des cardiomyocytes de rats qui expriment la protéine mutante  $G\beta 1H266L$ , qui ne peut être phosphorylée par l'histidine kinase, il y a une diminution de la stimulation de l'AMPc et des niveaux réduits de contractilité cardiaque. Cette mutation résulte aussi en la diminution de la phosphorylation du phospholamban sur la sérine 16 suivant la stimulation d'un récepteur par son agoniste [180].

## 7.2 Interconnexions entre le dimère $G\beta\gamma$ et d'autres voies de signalisation

Il est de plus en plus évident que des voies de signalisation utilisant des récepteurs de classes différentes (ex. RCPG, tyrosine kinase, récepteur nucléaire) peuvent être reliées entre elles. En voici un exemple. Les androgènes favorisent la transcription via les récepteurs aux androgènes, mais induisent aussi des réponses biologiques qui peuvent être indépendantes du récepteur tel que la phosphorylation

rapide des facteurs de transcription Elk-1 ou c-Raf-1. Ces actions rapides des androgènes impliquent l'activation de la phospholipase C- $\beta$ 2 par la sous-unité G $\beta$ 4 dérivée d'un hétérotrimère sensible à PTX [181].

### 7.3 Les effecteurs qui ne sont pas à la membrane plasmique

Les RCPGs peuvent aussi signaler à partir d'autres endroits dans la cellule que de la membrane plasmique. La notion que tous les RCPGs sont acheminés initialement à la membrane plasmique a été mise à l'épreuve récemment. Tel que décrit plus haut, le récepteur GABAB1 nécessite la présence du récepteur GABAB2 pour être acheminé entre le RE et la membrane plasmique. Cependant, la distribution du récepteur GABAB1 dans le système nerveux central est beaucoup plus large que la distribution du récepteur GABAB2, suggérant que le récepteur GABAB1 pourrait avoir une fonction intracellulaire [182-184]. Aussi, il a été montré que le GPR30, un RCPG, est acheminé exclusivement au RE et est un récepteur fonctionnel pour les oestrogènes [185]. Ces deux exemples suggèrent que les complexes de signalisation incluant les RCPGs ne se retrouvent pas systématiquement à la membrane plasmique. De plus, plusieurs études ont montré que la protéine G hétérotrimérique peut être localisée au RE ou au Golgi. Les protéines G à ces localisations intracellulaires seraient impliquées dans la régulation du transport antérograde et l'organisation de l'appareil de Golgi [186-191]. Les récepteurs, qui contrôlent ces événements, s'ils existent, sont encore inconnus. Toutefois, il est clair qu'une des molécules clés est la protéine kinase D et qu'elle peut interagir directement avec le dimère G $\beta\gamma$  [186]. De plus, des études récentes indiquent que les RCPGs et la machinerie de signalisation qui leur est associée peuvent être acheminés au noyau [192]. Les mécanismes par lesquels la signalisation se produit à partir de ce compartiment sont encore incompris, mais les sous-unités G $\beta\gamma$  pourraient être des molécules clés dans cette signalisation singulière.

Récemment, des impacts nucléaires directement liés au dimère G $\beta\gamma$  ont été décrits. Par exemple, le dimère G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 peut interagir directement avec les histones déacétylase 4 et 5 (HDAC4 et HDAC5) [1]. Au niveau basal, HDAC5 interagit avec le

facteur de différenciation musculaire MEF2, ce qui résulte en une diminution de son activité transcriptionnelle. Suivant la stimulation des récepteurs  $\alpha_2\text{aR}$ , le dimère  $\text{G}\beta\gamma$  activé interagit directement avec HDAC5, ce qui relâche MEF2 et lui permet de stimuler la transcription. Autant l'inhibiteur PTX que  $\beta\text{ARKct}$ , un séquestreur du dimère  $\text{G}\beta\gamma$ , inhibe l'activité de MEF2 [1]. Selon ces études, il reste à déterminer si c'est le dimère  $\text{G}\beta\gamma$  cytoplasmique qui séquestre la protéine HDAC5 ou si ces événements ont lieu directement au noyau.

Comme mentionnée précédemment, la sous-unité  $\text{G}\beta_5$  interagit avec un certain nombre de RGS. La sous-famille R7 des RGS est enrichie dans le cerveau et fonctionne sous la forme d'un complexe stable RGS- $\text{G}\beta_5$ , qui est localisé autant au cytosol qu'au noyau [193]. La protéine R7BP interagit directement avec la paire R7- $\text{G}\beta_5$  et potentialise la capacité de ce complexe à réguler l'activité des canaux Kir3 en réponse à une stimulation du récepteur M2 muscarinique [194]. La palmylation de la protéine R7BP permet d'ancrer le complexe R7- $\text{G}\beta_5$  à la membrane plasmique afin de réguler la signalisation des RCPGs. L'ajout d'une molécule de palmitate sur la protéine R7BP est un phénomène transitoire et hautement régulé [195]. La perte de la molécule de palmitate cause le relâchement du complexe R7BP-R7- $\text{G}\beta_5$  de la membrane plasmique et sa translocation au noyau. Un mutant  $\text{G}\beta_5$  incapable de lier le R7, tout en conservant son site de liaison à la sous-unité  $\text{G}\gamma_2$ , ne peut pas être trouvé dans le noyau des cellules HEK293 ou PC12, suggérant un rôle important de la protéine RGS dans sa localisation nucléaire [196].

Une autre étude a montré que les dimères  $\text{G}\beta\gamma$  peuvent interagir avec le répresseur de la transcription AEBP1 (adipocyte enhancer-binding protein) [197]. AEBP1 interagit principalement avec le dimère  $\text{G}\beta\gamma$ , qui contient la sous-unité  $\text{G}\gamma_5$ , dans les noyaux des cellules 3T3-L1, mais non dans les noyaux des cellules NIH 3T3. L'interaction AEBP1/ $\text{G}\beta\gamma_5$  atténue l'activité de répression transcriptionnelle de AEBP1.

Un autre nouvel effecteur du dimère  $G\beta\gamma$  qui n'a pas une localisation classique à la membrane plasmique est le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Ces récepteurs sont localisés au cytoplasme et sont transloqués au noyau en réponse à la liaison d'un ligand, résultant en la régulation de la transcription de plusieurs gènes cibles. Les sous-unités  $G\beta 1$  et  $G\beta 2$  peuvent se lier au GR et sont transloquées au noyau avec le récepteur en présence de son ligand, le dexaméthasone [2, 198]. L'interaction entre le  $G\beta$  et le GR supprime l'activité transcriptionnelle du récepteur. Un mutant  $G\beta 2$  n'interagissant pas avec les sous-unités  $G\gamma$  est incapable d'inhiber l'activité de GR, suggérant un rôle primordial de la sous-unité  $G\gamma$  dans ce processus.

Somme toute, les études mentionnées ci-haut commencent à révéler un rôle central pour le dimère  $G\beta\gamma$  dans de nombreux compartiments intracellulaires en régulant directement de multiples processus tels que la transcription et le transport des protéines. Tous ces exemples suggèrent que le dimère  $G\beta\gamma$  est bien plus qu'une molécule de signalisation induite par la stimulation d'un récepteur. Suivant cette logique, nous avons identifié une nouvelle classe de protéines interagissant avec le dimère  $G\beta\gamma$ , soit les facteurs de transcription Fos, membres du complexe AP-1 (activator protein-1).

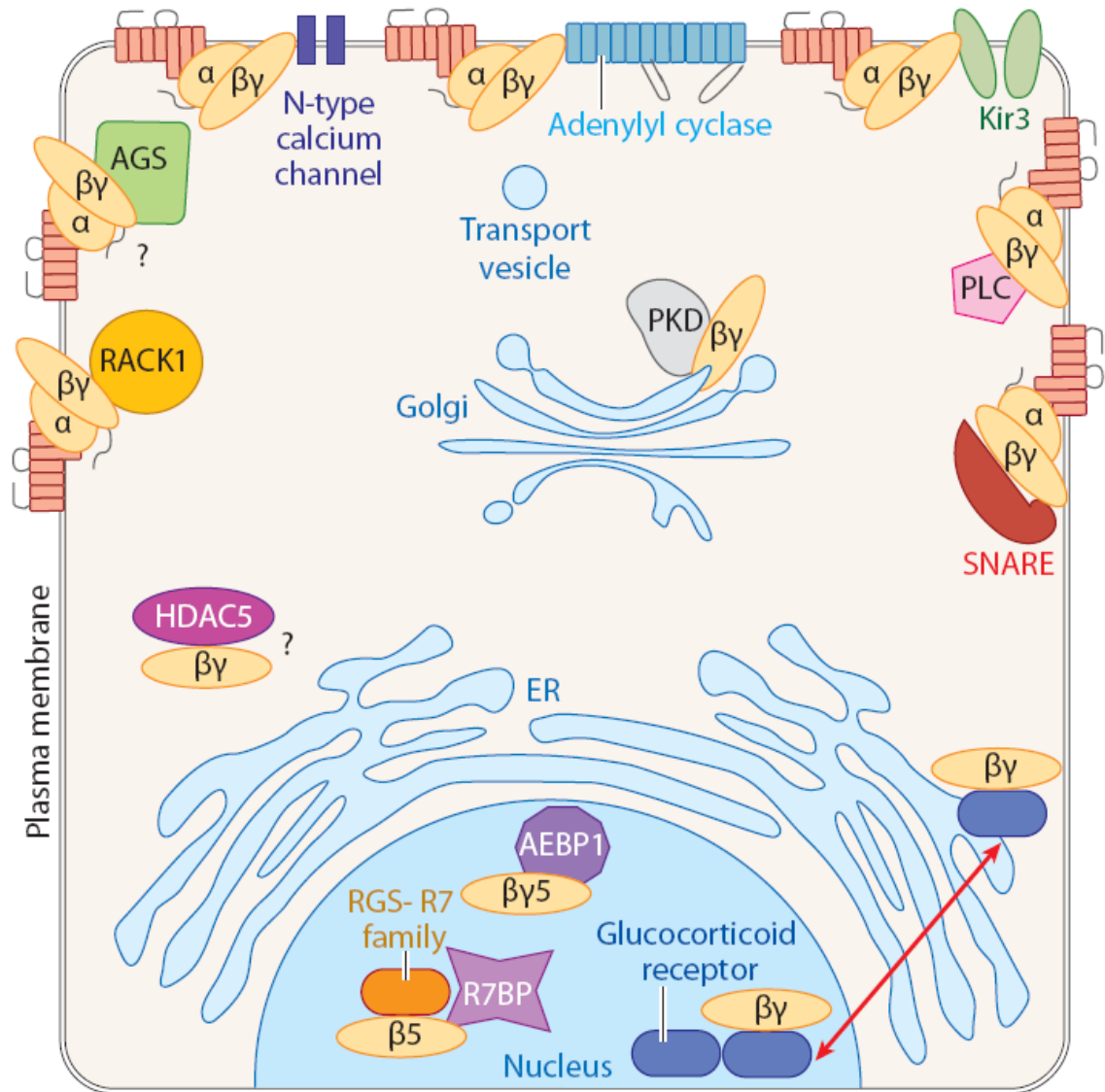


Figure 5 : *Effecteurs classiques et nouvelles interactions du dimère Gβγ*

Le dimère Gβγ permet la régulation de plusieurs effecteurs situés à la membrane plasmique, tels l'AC ou des canaux potassiques ou calciques. Récemment, de nouvelles protéines interagissant avec le dimère Gβγ ailleurs qu'à la membrane plasmique ont été identifiées. Parmi celles-ci, notons les protéines nucléaires HDAC5, les récepteurs aux glucocorticoïdes ou le co-répresseur de la transcription AEBP1.

## 8 Facteur de transcription de la famille des AP-1

L'acide désoxyribonucléique (ADN) des eucaryotes est organisé dans une structure complexe, soit la chromatine. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, qui est composé d'ADN et de protéines histones. Les protéines histones permettent à l'ADN de s'enrouler en une forme plus compacte. À la base, la chromatine représente un obstacle pour la transcription génique puisqu'elle réduit l'accessibilité à l'ADN pour les facteurs de transcription. La régulation de la transcription implique donc un remodelage dynamique de la chromatine par des modifications post-traductionnelles réversibles que subissent les histones, telles que la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitination. Ces modifications modifient les interactions histones/ADN et histones/protéines ainsi que la structure de la chromatine. Par exemple, l'acétylation des histones par l'enzyme histone acétyl transférase (HAT) neutralise la charge positive des résidus lysines de l'histone et détend l'association entre l'ADN et les histones, ce qui augmente l'accessibilité de l'ADN pour les facteurs de transcription. À l'inverse, la déacétylation des histones par les HDAC favorise l'interaction entre les résidus lysines chargés positivement des histones et les phosphates chargés négativement de l'ADN.

Le contrôle de la régulation d'un gène se fait à partir de son promoteur. Un promoteur typique est divisé en deux parties distinctes, le promoteur basal et le promoteur proximal. La région du promoteur de base contient généralement la boîte TATA et guide l'ARN polymérase au site d'initiation de la transcription. La région proximale contient le ou les séquences d'ADN qui sont reconnues par des facteurs de transcription. La liaison des facteurs de transcription augmente ou diminue la fréquence de l'initiation de la transcription.

Les facteurs de transcription possèdent deux régions essentielles, soit un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation. Le domaine de liaison à l'ADN reconnaît une séquence spécifique d'ADN alors que le domaine de transactivation interagit avec les composantes de l'appareil de transcription (ARN polymérase), ainsi qu'avec d'autres

protéines régulatrices dictant l'activation ou la répression de la transcription génique. Par exemple, le recrutement des co-activateurs de la transcription telle que CBP (CREB binding-protein)/p300 ou HAT permettra d'initier la transcription du gène alors que le recrutement de co-répresseurs de la transcription tel que HDAC et N-Cor inhibe la transcription du gène. Selon les données récoltées par le projet du génome humain, environ 10% des gènes codent pour des facteurs de transcription, ce qui en fait le type de protéines le plus représenté. Une des familles de facteurs de transcription est la famille AP-1.

Les protéines composant le complexe AP-1 font partie de la classe des gènes immédiats précoces aussi référée comme les gènes de réponse primaire. La caractéristique commune de ces gènes est qu'ils sont induits très rapidement et de façon transitoire, et ce, sans qu'il y ait synthèse de nouvelles protéines. Ces gènes incluent différents groupes de protéines dont des protéines de sécrétion, des enzymes cytoplasmiques et des facteurs de transcription dont certains membres formant le complexe AP-1. Cependant, il a été montré que, dans le cerveau, l'activation du complexe AP-1 est dépendant de la synthèse protéique de novo de certaines composantes AP-1 ainsi que de leur interaction avec certaines protéines déjà présentes. Le complexe de transcription AP-1 peut être composé de plusieurs combinaisons différentes d'hétéro ou d'homodimère. C'est l'agencement de ces dimères qui détermine les gènes qui sont régulés. Les membres principaux formant ces dimères sont les protéines de la famille des Fos et des Jun. Trois domaines caractéristiques sont assez bien conservés au sein des différents membres de ces familles, soit un domaine à glissière à leucine, une région basique et un domaine de transactivation. La glissière à leucine est responsable de la dimérisation des protéines AP-1 [199]. La caractéristique majeure d'un motif à glissière à leucine est des répétitions périodiques de résidus leucine localisés à des intervalles de sept acides aminés, ce qui crée des ponts d'interactions hydrophobes dans le dimère. La région basique est celle qui permet au facteur de transcription AP-1 de lier l'ADN sur une séquence bien spécifique (TGAC/GTCA) nommée séquence consensus. Le domaine de transactivation permet au facteur de



transcription de recruter, entre autres, les coactivateurs généraux de la transcription tels que les protéines membres de la famille des CBP/p300 [200, 201]. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la transformation et l'apoptose.

## 8.1 La famille des Fos

Jusqu'à maintenant, quatre membres majeurs de la famille des Fos ont été identifiés, soit c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2 [202-205].

La protéine cFos de 381 acides aminés est l'homologue humain de l'oncogène rétroviral v-Fos. Elle est très peu présente dans les cellules sous condition basale, mais son ARN messager est induit en seulement quelques minutes suivant une provocation aiguë par un facteur de croissance ou un stress environnemental ou physique. Le niveau maximal de la protéine c-Fos est atteint entre 1 heure et 3 heures suivant le stimulus et disparaît graduellement du noyau après 4 à 6 heures [206-209]. Les souris knock-out pour cFos souffrent de problèmes osseux dus à la perte des ostéoclastes, les cellules responsables de la résorption osseuse [210] ainsi que d'anomalies dans le système hépatique [211].

Le gène FosB encode pour la protéine FosB de 46 kDa, mais aussi pour un variant d'épissage nommé  $\Delta$ FosB. Le niveau basal de FosB est un peu plus élevé que celui de c-Fos, mais son activation est moins rapide. Cependant, dû à sa demi-vie plus longue (9.5 heures comparativement à 2 heures pour c-Fos), le signal induit par FosB dure plus longtemps. Les souris knockout pour le gène FosB se développent normalement, mais les femelles souffrent d'un déficit de maternage, causé par le manque de FosB dans la région hypothalamique [212].

Les protéines c-Fos et FosB possèdent un domaine de transactivation à l'extrémité C-terminale, qui est absent des protéines Fra-1, Fra-2 et  $\Delta$ FosB. Suivant la stimulation des fibroblastes par du sérum, les protéines c-Fos et FosB sont exprimées rapidement et de façon transitoire. L'induction des FRAs est retardée, mais ces protéines

sont présentes plus longtemps, car elles sont beaucoup plus stables que leur homologue c-Fos et FosB.

## **8.2 La famille des Jun**

La famille de Jun comprend trois membres connus, soit c-Jun, JunB et JunD.

Le proto oncogène c-Jun a été isolé pour la première fois à partir du virus du sarcome aviaire 17, en 1987 et identifié comme un homologue cellulaire de l'oncogène rétroviral v-jun [213]. Cette protéine est composée de 332 acides aminés.

La protéine Jun B fut clonée en 1988 [214]. Cette protéine contient une structure primaire et une spécificité de liaison à l'ADN similaire à celle de la protéine c-Jun, mais ne contient pas de domaine de transactivation. JunB et c-Jun possèdent donc des capacités différentes pour l'activation de la transcription. Cependant, JunB est un fort activateur de IL-4 durant la différenciation des cellules T auxiliaires [215] et peut aussi substituer c-Jun durant le développement des souris. En effet, l'introduction de JunB dans des souris c-Jun  $-/-$  rétablit la fonction cardiaque et hépatique et ce, de manière dose-dépendante [216].

La protéine JunD a été clonée en 1989 par le même groupe ayant cloné la protéine JunB [214]. JunD est le membre des protéines AP-1 qui est exprimé de façon la plus ubiquitaire [214, 217].

## **8.3 Mode de régulation du complexe AP-1**

Les protéines du complexe AP-1 sont régulées à plusieurs niveaux. Au départ, l'expression de ces protéines est contrôlée par la transcription de leur gène. Par exemple, la région régulatrice du gène c-Fos contient de nombreux éléments agissant en cis tels que Ca<sup>2+</sup>/CRE, SRE (serum response element), SIS et AP-1. Les différents signaux tels que PKA, PKC, CAM kinase et les cascades des MAPK kinases permettent donc de réguler la transcription du gène c-Fos.

Ensuite, la phosphorylation de ces protéines joue un rôle important pour leur activité transcriptionnelle. La phosphorylation de c-Jun a été largement étudiée. Cette protéine possède plusieurs sites de phosphorylation potentiels et certains de ces sites ont des effets inhibiteurs sur son activité, alors que d'autres sont essentiels pour cette même activité transcriptionnelle. En effet, l'activation de c-Jun requiert la phosphorylation des sérines 63 et 73, par la kinase JNK, en plus de la déphosphorylation d'au moins un des quatre sites situés à l'extrémité C-terminale. La phosphorylation sur les sérines 63 et 73 augmente grandement l'interaction entre c-Jun et les protéines de la famille CBP/p300 [218]. En absence de signalisation par la kinase JNK, la protéine HDAC3 interagit avec la région N-terminale de c-Jun afin d'inhiber toute activité transcriptionnelle. La protéine JunD possède les mêmes sites de phosphorylation que la protéine c-Jun [219] alors que la protéine JunB ne possède pas l'équivalent des sérines 63 et 73 [214]. La protéine c-Fos est activée par la phosphorylation de sa thréonine 232, considérée comme l'homologue de la sérine 73 de c-Jun [220]. La protéine FosB est synthétisée sous la forme d'une protéine inactive qui doit être activée par la phosphorylation de résidus sérine. Cette région est conservée chez tous les autres membres de la famille Fos, ce qui suggère que cette phosphorylation pourrait être un mode commun de régulation [221]. Plusieurs kinases peuvent phosphoryler les Fos, tels que MAPK, cdc42, PKA et PKC, et ainsi influencer leur stabilité, leur liaison à l'ADN ainsi que leur potentiel de transactivation [222-224].

Finalement, la dimérisation des différents membres est aussi impliquée dans la régulation du complexe AP-1. Les protéines de la famille des Fos ne peuvent pas former d'homodimère et doivent absolument être assemblées à un membre de la famille des Jun afin d'être actives. Toutefois, les différents membres de la famille des Fos interagissent avec les différents membres de la famille des Jun avec des affinités variantes [225]. Pour la famille des Jun, ses membres peuvent homodimériser et hétérodimériser. Cependant, les hétérodimères Jun-Fos sont plus stables que les homodimères Jun [226] et possèdent une plus grande activité de liaison à l'ADN [226-228]. De plus, les dimères comprenant la protéine c-Jun seraient plus stables que les dimères comprenant les protéines JunB et

JunD [228]. Suivant la stimulation des cellules, la composition du complexe AP-1 changerait de façon dynamique. Au départ, les complexes transitoires seraient formés des protéines c-Fos et c-Jun puisque ce sont les deux membres exprimés le plus rapidement en réaction à un stimulus. Suivant cette réponse première, les complexes AP-1 formés avec la protéine FosB seraient prédominants, puisque que FosB possède une demi-vie plus longue que c-Fos. Ces complexes seraient graduellement remplacés par les complexes comprenant les FRAs, ce qui permettrait de maintenir l'activation de la transcription en réponse à une stimulation chronique ou répétée [206, 229].

En plus des Fos et des Jun, le complexe AP-1 peut aussi être composé par la dimérisation de Jun avec d'autres classes de protéines, tel que les facteurs de transcription ATF/CREB [225, 230]. Les dimères Jun-Fos se lient avec une grande affinité aux éléments TRE et avec une plus faible affinité aux éléments CRE alors que les dimères Jun-ATF se lient préférentiellement aux éléments CRE [231].

## **9 L'étude des interactions protéiques par les techniques de BRET et de BiFC**

Plusieurs approches biochimiques permettant l'étude des interactions protéiques, tel que la co-précipitation et la co-purification requièrent de sortir les protéines de leur environnement normal. De nouvelles méthodes afin d'étudier les interactions protéiques dans des cellules vivantes sont maintenant disponibles. Parmi celles-ci notent notamment les techniques de complémentation de fragments protéiques (PCA) ou les techniques de transfert d'énergie de résonance (RET).

### **9.1 La technique de complémentation de fragments protéiques**

La technique de PCA consiste à fusionner deux protéines d'intérêts (protéine A et protéine B) à des fragments complémentaires d'un gène rapporteur, telles une enzyme ou une molécule fluorescente. Si la protéine A interagit avec la protéine B, les deux fragments complémentaires seront rapprochés et pourront se replier afin de retrouver la structure native du rapporteur et reconstituer son activité. La caractéristique principale

des gènes rapporteurs utilisés est qu'ils doivent produire une activité détectable, telle qu'un signal de fluorescence ou de luminescence, un changement colorimétrique ou une survie par sélection. La survie par sélection s'avère un puissant outil de criblage, alors que les rapporteurs fluorescents sont très efficaces pour l'étude de la dynamique spatiotemporelle des interactions protéiques. La technique de PCA employant la complémentation de fragment provenant d'une molécule fluorescente est aussi connue sous le nom de complémentation bimoléculaire de protéines fluorescentes (BiFC).

### *9.1.1 La complémentation bimoléculaire de protéines fluorescentes*

La technique de BiFC requiert de scinder une molécule fluorescente, telle la protéine fluorescente jaune (YFP) ou la protéine fluorescente verte (GFP), en deux fragments non fluorescents. Tel que mentionné précédemment, la réassociation de la molécule fluorescente sera facilitée par l'interaction entre les protéines d'intérêts auxquelles elles auront été fusionnées (Figure 6A). Certaines données suggèrent que la GFP peut être scindée à différentes positions et reconstituer une molécule fluorescente lorsque les deux fragments sont rapprochés l'un de l'autre par deux protéines interagissant ensemble [232, 233]. Les deux moitiés de GFP peuvent être produites en coupant entre les résidus 154 et 158 ou entre les résidus 172 et 173 [234]. Les deux fragments doivent être génétiquement fusionnés aux protéines d'intérêts qui s'associent ensembles dans la cellule afin de reformer une protéine fluorescente.

La reconstitution de la GFP nécessite le repliement des deux sous-unités, évènement qui, selon les estimations, a un  $t_{1/2}$  de 50 minutes [235]. Par conséquent, il y a un délai pour détecter l'interaction entre les deux protéines d'intérêts, ce qui fait que cette technique est inadéquate pour la mesure des cinétiques d'association des protéines en temps réel. De plus, lorsque la molécule fluorescente a été reconstituée, celle-ci forme un complexe stable non dissociable et va donc prévenir la dissociation des deux protéines d'intérêts, empêchant ainsi l'étude de la dissolution des complexes [236, 237].

Aucune des deux parties de la molécule fluorescente n'émet de la fluorescence lorsqu'exprimée seule ou lorsque co-exprimée sans être fusionné à deux protéines

interagissant ensemble. Cependant, afin de permettre la reconstitution de la molécule fluorescente, les deux protéines hôtes doivent s'associer de façon à ce que les deux fragments de la protéine fluorescente soient positionnés correctement pour être repliés adéquatement.

#### 9.1.1.1 L'analyse des résultats de BiFC

La technique de BiFC peut être utilisée autant comme méthode qualitative que quantitative. En effet, la reconstitution de la molécule fluorescente peut être appréciée par imagerie, où il est possible de visualiser le complexe protéique à l'intérieur de la cellule. Le signal de BiFC peut aussi être détecté par un lecteur de plaque et ainsi obtenir des mesures quantitatives, généralement présentées sous la forme de BiFCnet ou le signal d'un contrôle négatif a été soustrait. Afin de déterminer si le signal obtenu est la résultante d'une complémentation spécifique engendrée par l'interaction entre les deux protéines d'intérêts, de nombreux contrôles peuvent être effectués. Premièrement, les protéines d'intérêts, prises séparément, ne devraient pas permettre la reconstitution de la molécule fluorescente lorsque mises en contact avec des protéines connues pour ne pas interagir avec elles. Deuxièmement, la surexpression d'une protéine n'interagissant pas avec le complexe étudié ou de l'une des protéines d'intérêts nonétiquetées ne devrait pas entrer en compétition et faire diminuer le signal de BiFC perçu. Troisièmement, une mutation dans l'interface d'interaction entre les deux protéines empêchant leur interaction devrait abolir le signal de BiFC. Finalement, les deux fragments complémentaires devraient pouvoir être interchangeables sur les protéines d'intérêts sans abolir le signal.

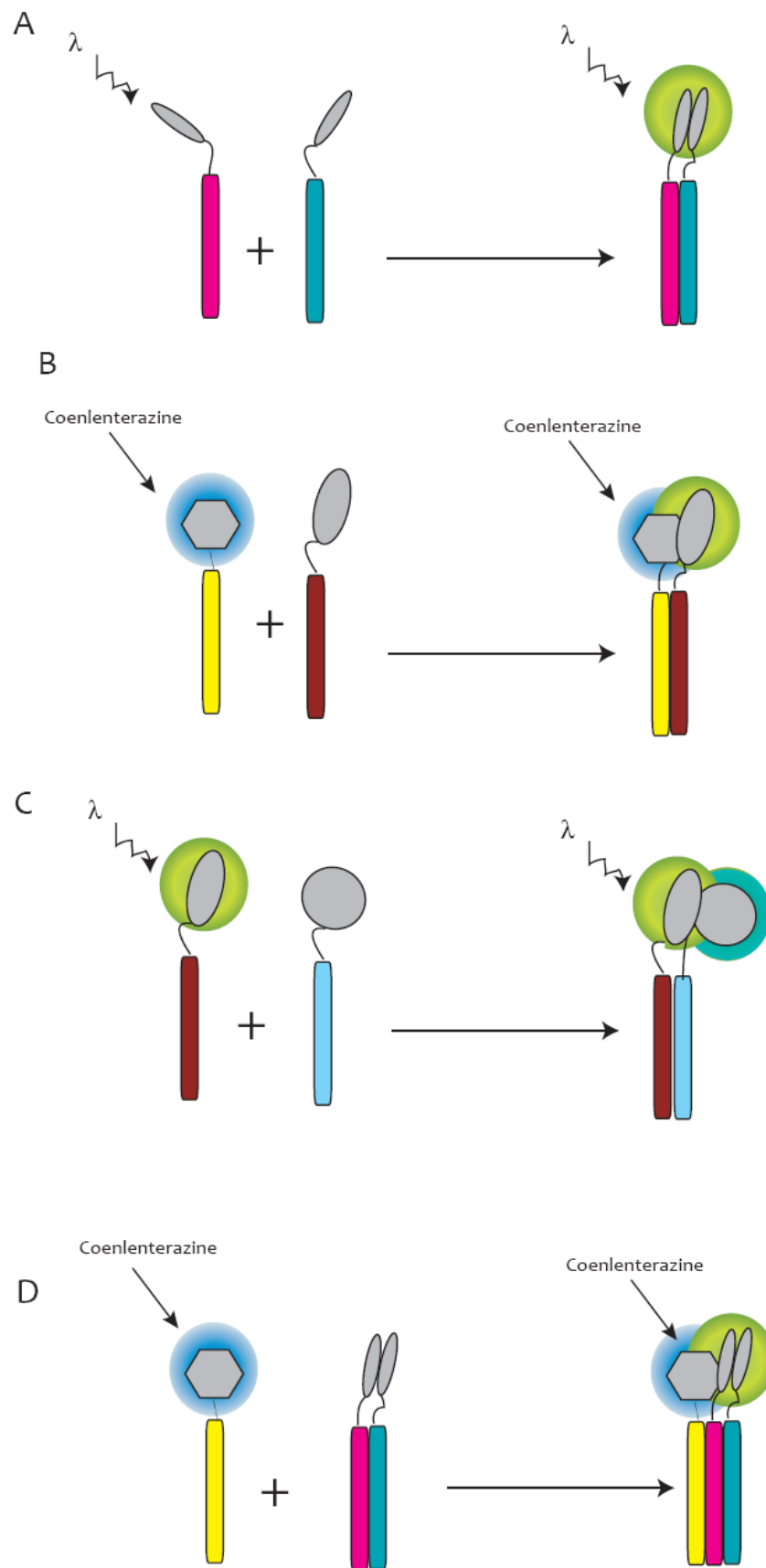


Figure 6 : *Les techniques de BiFC, FRET, BRET et BiFC/BRET.*

A) Un signal de BiFC peut être détecté lorsque les deux fragments complémentaires d'une molécule fluorescente sont amenés à proximité suivant l'interaction des deux protéines auxquelles ils ont été fusionnés. B) Le BRET requiert la présence d'une molécule donneuse d'énergie, la luciférase et d'une molécule acceptrice d'énergie, qui sera excitée par l'énergie émise par la luciférase suite à l'oxydation de son substrat, la coelenterazine. Le transfert d'énergie sera efficace seulement si la protéine acceptrice et la protéine donneuse se trouvent à moins de 10 nm l'une de l'autre. C) Le FRET requiert la présence d'une protéine fluorescente donneuse d'énergie et d'une molécule fluorescente acceptrice qui sera excitée par une longueur d'onde superposant le spectre d'émission de la protéine acceptrice. D) La combinaison des techniques de BiFC et de BRET permet d'étudier des interactions à trois partenaires. La molécule fluorescente devra être reformée afin de pouvoir accepter l'énergie émise par la luciférase.

## 9.2 Techniques de transfert d'énergie de résonance

La technique de RET emploie le principe biophysique du transfert d'énergie de résonance, soit de bioluminescence (BRET) (Figure 6B) ou de fluorescence (FRET) (Figure 6C). Ce transfert d'énergie, non radiatif (sans émission de lumière), résulte d'une interaction dipôle - dipôle entre deux molécules, soit la donneuse et l'acceptrice d'énergie. La molécule donneuse d'énergie est une protéine émettant de la bioluminescence, dans le cas du BRET ou émettant de la fluorescence, dans le cas du FRET, alors que la molécule acceptrice d'énergie est une protéine fluorescente dans les deux cas.

### 9.2.1 La technique de BRET

Dans notre cas, nous utilisons la luciférase de *Renilla reniformis* (RLuc) en tant que protéine donneuse d'énergie et la protéine fluorescente verte (GFP) en tant qu'acceptrice d'énergie. L'oxydation du substrat de la RLuc, le coelenterazine, provoque une relâche d'énergie qui peut être captée par la molécule acceptrice d'énergie. L'efficacité du transfert d'énergie est dépendant de plusieurs facteurs tels que les



propriétés spectrales, la distance relative et l'orientation relative de la molécule acceptrice et donneuse d'énergie. Afin qu'un transfert d'énergie soit possible, le spectre d'émission de la protéine donneuse doit chevaucher le spectre d'excitation de la protéine acceptrice. Cependant, les deux spectres ne doivent pas être trop semblables, car la résolution spectrale sera perdue, entraînant une trop faible différence entre le ratio signal/bruit de fond. Le transfert d'énergie a lieu si le donneur et l'accepteur se trouvent à moins de 100 Å (10 nm) l'un de l'autre. La détection d'un transfert d'énergie indique donc que le donneur et l'accepteur, et par conséquent les deux protéines qui y sont fusionnées, font partie d'un même complexe protéique [238]. De plus, un très léger changement dans la distance entraîne un très grand effet sur le signal de BRET détecté puisque l'efficacité du transfert est fonction de la distance donneur/accepteur à la puissance 6. Finalement, l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur est critique au transfert d'énergie. Ceci signifie que les molécules donneuses et acceptrices requièrent normalement une liberté de mouvement afin que leur orientation relative soit favorable de temps à autre.

La première génération de BRET appelé BRET1 emploie un substrat pour la RLuc appelé la coelenterazine h. Son oxydation en coelenteramide h résulte en une émission de lumière qui est maximale à environ 480nm. Le transfert d'énergie à la YFP produit une émission maximale à environ 530nm, alors que le transfert d'énergie à la protéine fluorescente verte eGFP produit une émission maximale à environ 510 nm. La deuxième génération de BRET, le BRET2 emploie un substrat nommé DeepBlueC ou coelenterazine 400A et son oxydation résulte en une émission d'énergie maximale à environ 400nm. La molécule acceptrice, la GFP10, une variante de la GFP, a une émission maximale à environ 510 nm. Les protéines eGFP et GFP10 ont un spectre d'émission similaire, mais la GFP10 a été modifiée afin que son spectre d'excitation soit à de plus petites longueurs d'onde. L'avantage principal du BRET2, par rapport au BRET1, est la séparation accrue entre les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur, permettant une meilleure résolution du signal. Cependant, les principaux désavantages du BRET2 sont une diminution dans la superposition des spectres

d'excitation et la réduction du rendement quantique de la DeepBlueC, ce qui affecte la sensibilité de cette génération de BRET.

### 9.2.2 *L'analyse des résultats de BRET*

Les résultats de BRET sont présentés sous la forme d'un ratio exprimant la quantité de lumière émise par la GFP suivant le transfert d'énergie sur la quantité de lumière émise par la RLuc. Les résultats de BRET peuvent être présentés sous la forme d'une courbe de saturation, utilisant différentes expressions d'accepteurs, ou tout simplement sous la forme d'un graphique à barre pour une valeur unique d'expression de l'accepteur. Dans le cas du graphique à barre, il est important d'exécuter les expériences à des valeurs saturantes atteignant le BRET maximal, afin d'éviter les variations dans le ratio de BRET causées par des variations minimales des niveaux d'expression de l'accepteur et du donneur. Règle générale, les expériences de BRET doivent inclure un contrôle négatif testé en parallèle à l'interaction protéique d'intérêt. Les résultats pourront ensuite être présentés sous la forme de BRET net, où le ratio de BRET du contrôle négatif aura été soustrait des ratios des autres conditions expérimentales. Le contrôle négatif est fait en remplaçant une des protéines d'intérêts, par une protéine, possédant une localisation sous-cellulaire semblable, exprimée à des niveaux similaires, mais n'interagissant pas avec l'autre protéine d'intérêt. Par exemple, lors de l'étude des protéines interagissant avec le  $\beta_2$ AR, celui-ci peut être remplacé par le récepteur CD8, qui est lui aussi un récepteur membranaire, mais qui n'est pas couplé aux voies de signalisation par les protéines G hétérotrimériques.

Suivant l'obtention d'un BRET net positif, d'autres études doivent être effectuées afin de démontrer la spécificité de l'interaction observée. Pour ce faire, deux types d'études peuvent être réalisés, soit les études de compétition ou les courbes de saturation. Les études de compétition consistent à exprimer, en plus des molécules donneuses et acceptrices, des quantités croissantes de l'une ou l'autre des protéines d'intérêts, mais sous leur forme non étiquetée pour faire du BRET. Dans ce cas, si le BRET est spécifique, l'augmentation de la molécule non-étiquetée fera diminuer le

signal de BRET, car il y aura moins de protéines donneuses interagissant avec les protéines acceptrices. Cette réduction du signal de BRET n'a pas lieu en présence d'une protéine n'interagissant pas avec les protéines donneuses ou acceptrices. Les courbes de saturation consistent à exprimer des quantités constantes de protéines donneuses, mais à varier la quantité de protéines acceptrices. Dans ce cas, lorsque toutes les protéines donneuses seront complexées à une protéine acceptrice, nous obtiendrons un BRET maximal, produisant un plateau lors de l'ajout de plus grandes quantités de protéines acceptrices. Dans le cas d'une interaction non spécifique dictée par des collisions aléatoires, les résultats seront représentés par une relation linéaire entre la quantité de protéines acceptrices et le signal de BRET sans jamais atteindre un BRET maximal.

### 9.3 Le BRET à 3 ou 4 partenaires

En combinant les techniques de BiFC et de BRET, nous avons été la première équipe à publier un BRET observé entre trois partenaires. Dans ce cas, la molécule acceptrice d'énergie est composée de deux protéines interagissant ensemble qui permettent la reformation de la molécule fluorescente. Un BRET est détecté seulement si la GFP est reconstituée et se trouve dans le même complexe protéique que la RLuc, permettant d'étudier la présence de trois protéines différentes au sein du même complexe (Figure 6D). Fait intéressant, il est aussi possible de scinder la protéine RLuc [239] ou la luciférase provenant de *Gaussia princeps* (GLuc) [240] en deux parties ne possédant pas d'activité enzymatique, mais pouvant être reconstituées lorsque fusionnées avec deux protéines interagissant ensemble, technique connue sous le nom de PCA.

Contrairement au BiFC, la complémentation de RLuc et de GLuc n'est pas définitive, ce qui permet d'utiliser cette complémentation afin d'étudier la dynamique des complexes de signalisation. Par l'utilisation de quatre récepteurs  $\beta_2$ AR fusionnés aux parties N et C terminales de GLuc et de Venus, un variant de la GFP, nous avons, pour la première fois, montré qu'il était possible de combiner la technique de PCA et de

BiFC afin d'exécuter un BRET à 4 partenaires, démontrant l'oligomérisation des récepteurs  $\beta_2$ AR (Figure 7) [241].

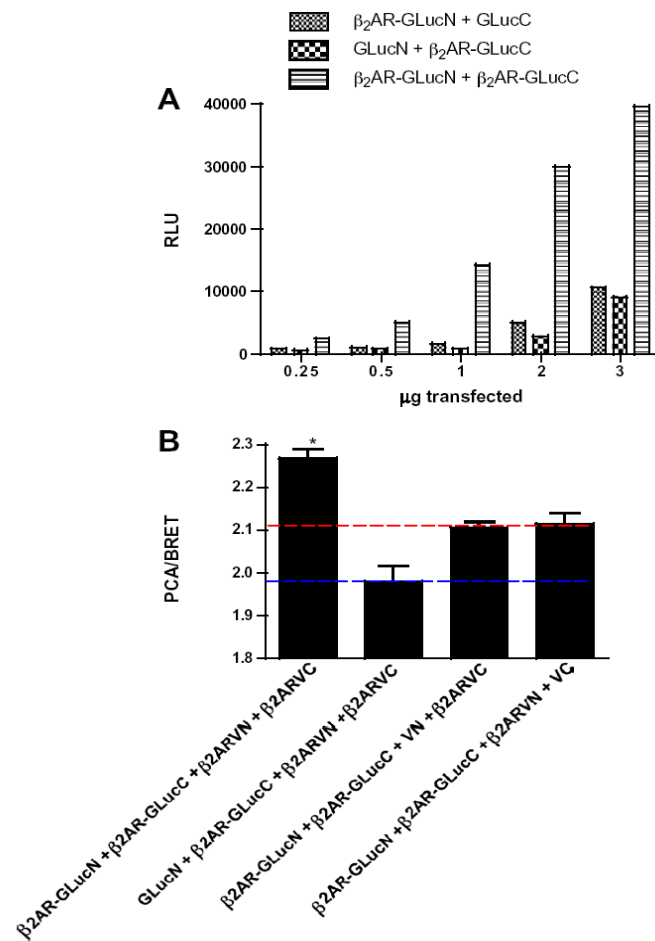


Figure 7 : BRET à 4 partenaires

A) La luminescence est reconstituée par la dimérisation de deux récepteurs  $\beta_2$ AR portant chacun la moitié de la protéine GLuc. B) La dimérisation des récepteurs  $\beta_2$ AR-VN et  $\beta_2$ AR-VC reforme la molécule fluorescente Venus, alors que la dimérisation des récepteurs  $\beta_2$ AR-GLucN et  $\beta_2$ AR-GLucC reforme la molécule luminescente. La coexpression des quatre récepteurs permet la détection d'un signal de BRET, suggérant que les deux homodimères sont au sein du même complexe protéique.

## Hypothèses de la thèse

Au commencement de mes études aux cycles supérieurs, le modèle de précouplage des membres de la signalisation par les RCPGs était un concept émergent encore en débat dans la communauté scientifique. Une étude du laboratoire du Dr. Hébert, paru en 2002 proposa que, en plus de former un complexe stable avant l'activation des récepteurs, les récepteurs et les effecteurs pourraient interagir ensemble très tôt durant leur biosynthèse.

À partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que les complexes de signalisation incluant le récepteur, la protéine G hétérotrimérique et les effecteurs s'associent en complexes spécifiques durant leurs biosynthèses avant leurs acheminements vers la surface.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé la sous-unité Kir3.1 comme outil permettant d'étudier les interactions intracellulaires (Kir3.1 exprimé seul) ou à la membrane plasmique (Kir3.1 exprimé avec Kir3.4). Les études de la spécificité des interactions, de leurs lieux de formation ainsi que de leurs comportements en présence de stimulant ont été réalisées par différentes méthodes dont notamment la technique de BRET et de BiFC/BRET, par co-immunoprécipitation, et par microscopie confocale.

Durant mes études aux cycles supérieurs, il est aussi devenu clair que le dimère  $G\beta\gamma$  possède de nombreuses fonctions autres que l'activation des effecteurs membranaires classiques. Suivant la découverte d'une interaction entre le dimère  $G\beta$  et les protéines Fos, nous avons travaillé à la caractérisation de cette interaction et de sa fonction biologique.

## Chapitre 2

### **Heterotrimeric G proteins and their effectors form stable complexes in vivo.**

R. Victor Rebois<sup>‡</sup>, Mélanie Robitaille<sup>‡</sup>, Céline Galés<sup>‡</sup>, Denis J. Dupré, Alessandra Baragli, Phan Trieu, Nathalie Ethier, Michel Bouvier and Terence E. Hébert

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this study

Journal of Cell Science (2006) 119 : 2807-2818

## Abstract

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) and co-immunoprecipitation experiments revealed that heterotrimeric G proteins and their effectors were found in stable complexes that persisted during signal transduction. Adenylyl cyclase, Kir3.1 channel subunits, and several G protein subunits ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\beta_1$  and  $G\gamma_2$ ) were tagged with either luciferase (RLuc), GFP, or the complementary fragments of YFP (specifically  $G\beta_1$ -YFP<sub>1-158</sub> and  $G\gamma_2$ -YFP<sub>159-238</sub>, which heterodimerize to produce fluorescent YFP- $G\beta_1\gamma_2$ ). BRET was observed between adenylyl-cyclase-RLuc or Kir3.1-RLuc and GFP- $G\gamma_2$ , GFP- $G\beta_1$ , or YFP- $G\beta_1\gamma_2$ .  $G\alpha$  subunits were also stably associated with both effectors regardless of whether or not signal transduction was initiated by a receptor agonist. Although BRET between effectors and  $G\beta\gamma$  was increased by receptor stimulation, our data indicate that these changes are likely to be conformational in nature. Furthermore, receptor-sensitive G protein-effector complexes could be detected before being transported to the plasma membrane, providing the first direct evidence for an intracellular site of assembly.

## Introduction

Heptahelical receptors, heterotrimeric G proteins and the downstream effectors that they regulate constitute the principal components of G protein-mediated signal transduction systems. How these systems are organized within membranes remains contentious. The prevailing hypothesis has been that signaling proteins move about independently within the membrane and interact as a consequence of random collisions. However, most cells have multiple G protein-mediated signal transduction pathways that require many different signaling components with the potential to work at cross-purposes if allowed to interact randomly. An alternative organizational paradigm in which receptors, G proteins and effectors are assembled into signaling complexes may explain the specificity and efficacy that is often observed in response to different environmental stimuli *in vivo* (Rebois and Hébert, 2003).

There is substantial evidence that G protein-mediated signal transduction systems are organized as macromolecular complexes in yeast (Dohlman and Thorner, 2001) and *Drosophila* (Montell, 1999). Most of the evidence for the existence of stable protein-protein interactions between G proteins and effectors in mammalian cells comes from *in vitro* biochemical studies (e.g. (Arad et al., 1984) ( review by Rebois et al., 1997). The first proposal that G proteins and effectors existed as a complex in cell membranes was based on data indicating that signal transduction displays first order kinetics (Levitzki, 1981; Levitzki, 1984; Levitzki, 1986; Levitzki, 1988a; Levitzki, 1988b; Marbach et al., 1990; Tolkovsky et al., 1982; Tolkovsky and Levitzky, 1981). The difficulty of studying protein interaction in the cell membrane meant that these studies stood alone for many years as evidence for these complexes *in situ*.

Recent studies using molecular imaging techniques in living cells such as fluorescence resonance energy transfert (FRET) or bioluminescence resonance energy transfert (BRET) have demonstrated that G protein subunits remain associated with each other (Bünemann et al., 2003; Frank et al., 2005), and with their receptors (Galés et al.,



2005; Nobles et al., 2005) during signal transduction, and that receptors are also stably associated with effectors (Lavine et al., 2002). The purpose of the present study was to use BRET to determine if G proteins and their effectors form stable complexes in living mammalian cells. Two different effectors, adenylyl cyclase (AC) and an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit (Kir3.1), and several different G protein subunits were tagged with RLuc, GFP or one of two complementary fragments of YFP. The tagged signaling proteins retained biological activity, and they could be co-immunoprecipitated when co-expressed in mammalian cells, demonstrating that they could form detergent-resistant assemblies. Furthermore, BRET experiments showed that these proteins formed complexes of G protein subunits and effectors in living cells, which were stable regardless of whether or not signal transduction was activated.

## Results

### GFP- and RLuc-tagged signaling proteins are functional.

Both G-protein subunits and effectors retain their ability to function in signal transduction when tagged for BRET experiments. Previously, both AC and the K<sup>+</sup> channel subunit Kir3.1, were shown to be functional when modified by the addition of RLuc to their C-termini (Lavine et al., 2002), as was Kir3.1-GFP where GFP is attached to the C-terminus of Kir3.1 (Mirshahi and Logothetis, 2004). Both Gβ<sub>1</sub> and Gγ<sub>2</sub> were tagged for use in BRET experiments. GFP-tagged Gβ<sub>1</sub> can modulate voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels (Doering et al., 2004). Further evaluation of the tagged subunits was carried out by comparing their ability to regulate K<sup>+</sup> currents relative to their untagged counterparts. K<sup>+</sup> currents were measured in *Xenopus* oocytes expressing Kir3.2, which form functional homotetrameric channels that open in response to Gβγ (Schoots et al., 1999). Although wild-type Gβ<sub>1</sub> and Gγ<sub>2</sub>, individually, were unable to activate Kir3.2, together they produced a 2.5-fold increase in the basal K<sup>+</sup> current (Figure 8A). Tagged G-protein subunits could also increase Kir3.2 current, but only if co-expressed with their complementary untagged counterparts. GFP-Gβ<sub>1</sub> or RLuc-Gβ<sub>1</sub>, resulted in an approximately 1.5-fold increase in basal current if oocytes co-expressed Gγ<sub>2</sub>. GFP-Gγ<sub>2</sub> was able to increase the basal K<sup>+</sup> current by approximately 1.6-fold in the presence of Gβ<sub>1</sub> (Figure 8A). As a more rigorous functional test, we determined whether Gβγ subunits tagged for BRET experiments could transduce the signal between the receptor and Kir3.2. K<sup>+</sup> currents were measured in oocytes expressing various combinations of tagged or wild-type Gβ<sub>1</sub> and Gγ<sub>2</sub> subunits together with the β<sub>2</sub>AR, Gα<sub>s</sub> and Kir3.2. In the absence of co-expressed Gβγ, very little stimulation is seen (Figure 8B compare top trace with second trace). Tagging Gβ<sub>1</sub> or Gγ<sub>2</sub> for BRET (traces 3-5) did not affect the kinetics of agonist-mediated channel activation, though channel deactivation following removal of the agonist, occurred more rapidly (Figure 8B,C).

The abilities of  $G\gamma_2$  and GFP- $G\gamma_2$  to mediate agonist-dependent stimulation of AC-RLuc were also compared. Agonist-induced cAMP accumulation was measured in cells co-expressing GFP- $G\gamma_2$ , AC-RLuc,  $G\alpha_s$  and  $G\beta_1$  or  $G\gamma_2$ , AC,  $G\alpha_s$  and  $G\beta_1$ . The expression of either wild-type or tagged signaling proteins resulted in a much higher maximum agonist-induced cAMP accumulation compared with sham-transfected cells, indicating that the exogenous proteins were functional (see Figure 9 legend). These experiments also revealed that the  $EC_{50}$  for isoproterenol in cells expressing GFP- $G\gamma_2$  and AC-RLuc was similar in cells transfected with wild-type signaling proteins or in sham-transfected cells (Figure 9).

$G_{\alpha_i}$  subunits are crucial for agonist-mediated regulation of AC and Kir3 channels. The stimulatory G-protein  $\alpha$ -subunit ( $G\alpha_s$ ) retains its ability to mediate hormone-induced activation of AC when GFP is properly positioned within its  $\alpha$ -helical domain to create a  $G\alpha_s$ -GFP fusion protein (Yu and Rasenick, 2002; data not shown). We prepared an analogous construct in which RLuc was inserted into  $G\alpha_i$  and found that it was able to mediate receptor stimulation of Kir3.2 or inhibition of AC expressed in HEK 293 cells (data not shown).

### **Tagged G protein subunits and effectors are co-immunoprecipitated**

Studies have demonstrated that  $G\beta\gamma$  is co-immunoprecipitated with complexes containing AC (Davare et al., 2001), and that  $G\beta\gamma$  can interact directly with the cytosolic domains of AC (Weitmann et al., 2001). In our study, detergent extracts from cells co-expressing AC-RLuc and GFP- $G\beta_1$  were immunoprecipitated with anti-GFP antibodies. Probing western blots with anti-RLuc antibodies revealed the presence of AC-RLuc indicating co-immunoprecipitation with GFP- $G\beta_1$  (Figure 10A, left panel). No co-immunoprecipitation occurred when wild-type  $G\beta_1$  was used to compete for the interaction with AC-RLuc or when RLuc was substituted for AC-RLuc (Figure 10A middle and right panels).

In an effort to quantify these interactions, the proportion of RLuc activity that was co-immunoprecipitated by anti-GFP antibodies was determined. More than 85% of an expressed RLuc-GFP fusion protein could be immunoprecipitated with anti-GFP, demonstrating the efficacy of the procedure.  $G\beta_1$  and  $G\gamma_2$  form a detergent-resistant protein complex, but anti-GFP antibodies were able to precipitate only about 50% of the RLuc activity from cells co-expressing RLuc- $G\beta_1$  and GFP- $G\gamma_2$  (Figure 11). Other combinations of RLuc and GFP-tagged signaling proteins were also co-immunoprecipitated by anti-GFP antibodies. AC-RLuc was consistently immunoprecipitated with GFP- $G\gamma_2$  when co-expressed with  $\beta_2AR$ ,  $G\alpha_s$ , and  $G\beta_1$  but the quantity of RLuc activity recovered was less than 10% of total luciferase activity. This result was not due to AC-RLuc being expressed in molar excess of the GFP- $G\gamma_2$ . Conceivably, the efficiency with which AC-RLuc and GFP- $G\gamma_2$  form a complex in vivo may be compromised (e.g. because some crucial component is not being expressed in stoichiometric amounts or because endogenous proteins compete with the tagged proteins in forming a complex). Alternatively, the interaction between AC-RLuc and GFP- $G\gamma_2$  may not be stable enough to survive the conditions required for immunoprecipitation.

Kir3 channels can also be co-immunoprecipitated with  $G\beta\gamma$  from rat atrial tissue (Nikolov and Ivanova-Nikolova, 2004), and several studies with purified proteins demonstrate direct interactions between  $G\beta\gamma$  and Kir3 channels (Huang et al., 1997; Huang et al., 1995; Robillard et al., 2000). Kir3.1-RLuc was precipitated by anti-GFP antibodies from cells co-expressing GFP- $G\gamma_2$  in CHAPS-containing buffers (TABLE II). There was an increase in the amount of Kir3.1-RLuc that could be precipitated with GFP- $G\gamma_2$  if the cells also expressed other components of M2 muscarinic receptor signaling complexes, including the receptor, complementary G-protein subunits, and the Kir3.4 channel subunit. This effect is presumably a consequence of a stoichiometry that

favors complex formation and stability. Experiments also demonstrated that HA-tagged Kir3.1 could be precipitated with anti-FLAG antibodies from cells co-expressing FLAG-tagged  $G\beta_1$  (Figure 10B). However, Kir3.1-RLuc was not immunoprecipitated with anti-GFP antibodies from cells co-expressing GFP- $G\beta_1$ , even in the presence of exogenously expressed  $G\gamma_2$ . These particular tags may reduce the affinity of Kir3.1 for  $G\beta_1$  so that they can no longer be co-immunoprecipitated when dissolved in a mixture of NP-40 and sodium deoxycholate. A salient point here is that detergent may be crucial, as Kir3.1-RLuc was co-immunoprecipitated with GFP- $G\gamma_2$  from solutions containing CHAPS (TABLE II).

#### **Non-specific protein interactions were not detected by BRET.**

To gauge whether BRET occurs as the result of non-specific interactions between tagged proteins, we used a number of negative controls. In some cases, cells were transfected with the cardiac voltage-gated  $K^+$  channel, KvLQT1, tagged with RLuc (KvLQT1-RLuc) and  $\beta_2$ AR-GFP. This combination of proteins was chosen because KvLQT1 and  $\beta_2$ AR have previously been tagged with fluorescent donor and acceptor proteins for fluorescent resonance energy transfer (FRET) experiments. Although they co-localize in cell membranes they do not normally associate, but nevertheless, at high expression levels FRET was observed in cardiomyocytes (Dilly et al., 2004). However, in our studies, BRET did not occur between either CD4-RLuc (subtracted to obtain net BRET values) or KvLQT1-RLuc and  $\beta_2$ AR-GFP when they were expressed at the same levels as comparably tagged G-protein subunits and effectors (data not shown). Although KvLQT1 does not interact physiologically with the  $\beta_2$ AR, it does interact with the HERG  $K^+$  channel subunit (Ehrlich et al., 2004). To confirm that the RLuc tag did not interfere with the ability of KvLQT1 to form a complex with HERG, we demonstrated that BRET occurs when KvLQT1 tagged with RLuc is co-expressed with GFP-tagged HERG (data not shown). Throughout this report, additional control fusion proteins CD8- and CD4-RLuc were used to confirm that the conditions we used did not produce non-specific BRET signals.

### Interactions between G $\beta$ $\gamma$ subunits and AC.

BRET between GFP-G $\gamma_2$  and AC-RLuc was examined in the presence of various combinations of other signal transduction proteins (Figure 11A). The expression levels of AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ , as determined by measuring RLuc activity and GFP fluorescence, respectively, were not markedly affected by co-expression of any or all of the other proteins (data not shown). Co-expression of AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ , led to BRET that was increased when both exogenous G $\alpha_s$  and G $\beta_1$  were co-expressed (Figure 11A).

Peptide fragments of YFP corresponding to amino acids 1-158 (YFP<sub>1-158</sub>) and 159-238 (YFP<sub>159-238</sub>) are not fluorescent when expressed alone, or when co-expressed. However, in experiments originally described by Kerppola and colleagues (Hu et al., 2002; Hu and Kerppola, 2003), it was demonstrated that if the two fragments can be brought together by fusing them to proteins that do associate, a functional YFP can be reconstituted in a process known as bimolecular fluorescence complementation (BiFC). This occurs when G $\beta_1$  with an N-terminal YFP<sub>1-158</sub> tag (YFP<sub>1-158</sub>-G $\beta_1$ ) is co-expressed with G $\gamma_2$  having an N-terminal YFP<sub>159-238</sub> tag (YFP<sub>159-238</sub>-G $\gamma_2$ ) (Hynes et al., 2004). The presence of AC, G $\beta_1$  and G $\gamma_2$  in a single complex was demonstrated by showing that co-expressed YFP<sub>1-158</sub>-G $\beta_1$  and YFP<sub>159-238</sub>-G $\gamma_2$  produced a fluorescent YFP-tagged G $\beta_1\gamma_2$  heterodimer that served as BRET partner for AC-RLuc (Figure 11B).

Isoproterenol, acting through endogenous HEK 293  $\beta$ -adrenergic receptors, tended to increase BRET between AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ , but the increase was only significant ( $134 \pm 7\%$ ,  $n=13$ ) when exogenous  $\beta_2$ AR was also co-expressed (see Figure 11A,C, Figure 14A and Figure 15). By contrast, BRET between AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$  was not affected by the  $\beta$ -adrenergic antagonist propranolol (data not shown). BRET between AC-RLuc and the YFP-tagged G $\beta_1\gamma_2$  heterodimer produced by co-expressing

YFP<sub>1-158</sub>-G $\beta$ <sub>1</sub> and YFP<sub>159-238</sub>-G $\gamma$ <sub>2</sub> also increased in response to isoproterenol (Figure 11B).

When expression levels of  $\beta$ <sub>2</sub>AR, AC-RLuc, G $\alpha$ <sub>s</sub> and G $\beta$ <sub>1</sub> were kept constant while increasing GFP-G $\gamma$ <sub>2</sub>, the BRET signal increased approaching a maximum value asymptotically (Figure 11C). The resulting dose-response curves approached higher maximal BRET values when the cells were treated with isoproterenol, but the amount of expressed GFP-G $\gamma$ <sub>2</sub> needed to produce half-maximal BRET values (BRET<sub>50</sub>) was the same in both cases (i.e. the affinity of the interaction has not changed). The fact that the BRET between AC-RLuc and GFP-G $\gamma$ <sub>2</sub> reached a plateau value as the amounts of expressed GFP-G $\gamma$ <sub>2</sub> increased indicates a specific rather than non-specific protein-protein interaction. Additional evidence that the procedures used for these experiments did not produce non-specific BRET was obtained by expressing equivalent amounts of CD8-RLuc in place of AC-RLuc. CD8-RLuc is a fusion protein with a peptide sequence that makes it an integral membrane protein, and it exhibited a similar pattern of distribution to that of AC-RLuc (data not shown). Like the RLuc-tagged effectors used in our studies, the luciferase moiety of CD8-RLuc is located on the cytosolic side of the plasma membrane (Galés et al., 2005). Nevertheless, there was no detectable BRET between CD8-RLuc and GFP-G $\gamma$ <sub>2</sub> at the expression levels used in our experiments (Figure 11C).

### **Interactions between G $\beta$ $\gamma$ subunits and Kir3.1.**

BRET was next used to investigate the interactions of Kir3.1 with G-protein subunits in living cells. BRET occurred in cells expressing Kir3.1-RLuc and either GFP-G $\beta$ <sub>1</sub> or GFP-G $\gamma$ <sub>2</sub>, and was increased by co-expression of G $\gamma$ <sub>2</sub> or G $\beta$ <sub>1</sub>, respectively (Figure 12A). The ability of complementary untagged G-protein subunits to increase BRET between its GFP-tagged counterpart and Kir3.1-RLuc is an indication that stoichiometry is important in the formation of these complexes. The specificity of the interaction between GFP-G $\beta$ <sub>1</sub> and Kir3.1-RLuc was also investigated. Experiments showed that co-

expression of wild-type Kir3.1 or Kir3.4 caused a dose-dependent inhibition of BRET between Kir3.1-RLuc and GFP-G $\beta_1$  (Figure 12B). Measurements of RLuc activity and GFP fluorescence revealed that the exogenously expressed Kir3.1 did not suppress the expression of the tagged proteins (data not shown). Thus, it is likely that the inhibition is due to Kir3.1 and/or Kir3.4 competing with Kir3.1-RLuc for GFP-G $\beta_1$ , again suggesting that BRET resulted from specific protein-protein interactions. The simultaneous presence of three proteins in a complex was again demonstrated by showing that co-expressed YFP<sub>1-158</sub>-G $\beta_1$  and YFP<sub>159-238</sub>-G $\gamma_2$  served as an acceptor for Kir3.1-RLuc in BRET experiments (Figure 12C). The occurrence of BiFC-BRET depended upon both YFP<sub>1-158</sub>-G $\beta_1$  and YFP<sub>159-238</sub>-G $\gamma_2$  being co-expressed with Kir3.1-RLuc.

BRET saturation experiments performed in cells expressing increasing levels of GFP-G $\gamma_2$  and fixed amounts of  $\beta_2$ AR, G $\alpha_s$ , G $\beta_1$  and Kir3.1-RLuc showed that BRET also increased hyperbolically (Figure 13A), characteristic of a specific protein-protein interaction. When the experiments were repeated using comparable amounts of CD8-RLuc in place of Kir3.1-RLuc there was a small increase in BRET indicating that these experimental conditions produced a weak, but nevertheless detectable non-specific interaction between the tagged proteins (Figure 13A). The data in Figure 13A were generated using cells expressing RLuc-tagged proteins at levels ~tenfold higher than those used to generate the experimental data shown in Figure 11C (hence the tenfold difference in the values for fluorescence/luminescence on the *x* axis). This higher level of expression led to a modest bystander BRET (Mercier et al., 2002) in cells co-expressing CD8-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ .

Previous studies have demonstrated that Kir-channel activity can be regulated by  $\beta$ -adrenergic receptors (Robillard et al., 2000). Although the Kir3.1-channel subunit forms a complex with G proteins, it is not transported to the cell surface unless co-expressed with Kir3.4 (Figure 13B,C). Therefore, it is unlikely that BRET between tagged Kir3.1 and G-protein subunits would be affected by the membrane-impermeable



$\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol in the same way that a cell surface complex containing AC and G $\beta\gamma$  would (Figure 11). In fact, isoproterenol had no effect on BRET between Kir3.1-RLuc and either GFP-G $\beta_1$  (data not shown) or GFP-G $\gamma_2$  (Figure 13A,D) in the absence of the Kir3.4 subunit. However, a membrane-permeable  $\beta$ -adrenergic agonist, cimaterol, did cause an increase in BRET between Kir3.1-RLuc and GFP-G $\beta_1$ , which was blocked by propranolol (Figure 13B). Data in this set of experiments were presented as agonist-stimulated BRET, over and above the constitutive BRET signals seen in Figure 12 and Figure 13A. Thus, in addition to Kir3.1 becoming associated with its cognate G protein before reaching the cell surface, the interaction also becomes sensitive to an agonist-occupied receptor. Co-expressing Kir3.4 allows Kir3.1 transportation to the plasma membrane (Figure 13C). Since Kir3.4 (which also contains binding sites for G $\beta\gamma$ ) can compete with Kir3.1-RLuc for binding to G $\beta\gamma$ , it is able to inhibit BRET between Kir3.1-RLuc and GFP-G $\gamma_2$  (Figure 12B). However, if Kir3.4 was expressed at a level sufficient to allow Kir3.1-RLuc to be transported to the plasma membrane while only moderately attenuating BRET between Kir3.1-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ , then isoproterenol was able to increase BRET over constitutive levels between these tagged signaling proteins (Figure 13D).

### **Effects of agonist-mediated signal transduction on BRET between G protein $\alpha$ -subunits and effectors.**

BRET was also used to determine if G $\alpha$  could be detected in complexes with effectors. These experiments revealed that co-expressed AC-RLuc and G $\alpha_s$ -GFP are found constitutively as complexes in HEK 293 cells (Figure 14A) and that they can be co-immunoprecipitated (see legend to TABLE II). BRET experiments also showed that Kir3.1-GFP was associated with G $\alpha_i$ -RLuc (Figure 14B). In contrast to results obtained between G $\beta\gamma$  and AC, BRET between AC-RLuc and G $\alpha_s$ -GFP was not significantly affected by isoproterenol (Figure 14A). Similarly, unlike BRET between Kir3.1-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ , there was again no effect of isoproterenol on the BRET between Kir3.1-

GFP and  $G\alpha_i$ -RLuc even though Kir3.4 was co-expressed so that the BRET pair was transported to the cell surface (Figure 14B)

### **Specificity of G protein/effector interactions.**

Finally, in an effort to thoroughly scrutinize the specificity of the interaction between AC-RLuc and GFP-G $\gamma$ 2, the expression levels of these proteins were varied while keeping the ratio of donor- to acceptor-tagged proteins fixed (Kenworthy and Edidin, 1998). The amounts of co-expressed  $\beta_2$ AR,  $G\alpha_s$  and  $G\beta_1$  were also varied as described in the Materials and Methods. Expression levels for AC-RLuc and GFP-G $\gamma$ 2 ranged over nearly two orders of magnitude (Figure 15, inset) revealing that BRET between AC-RLuc and GFP-G $\gamma$ 2 persisted even at expression levels near the limits of detection by the instrument (Figure 15).

## Discussion

BRET was observed between heterotrimeric G proteins and two of the effectors that they regulate, AC and the Kir3.1 subunit. BRET between effectors and either tagged G $\beta$  or G $\gamma$  subunits was increased by co-expression of untagged G $\gamma_2$  or G $\beta_1$ , respectively. These results corroborate data from functional and co-immunoprecipitation studies highlighting the importance of co-expressing stoichiometric amounts of multiple signaling proteins even when studying individual interactions between two partners. Furthermore, the ability of complementary wild-type G-protein subunits to augment BRET between their GFP-tagged counterparts and AC-RLuc or Kir3.1-RLuc indicates that there is an interdependence, and consequently a specificity associated with these interactions. Similarly, the fact that untagged Kir3.1 or Kir3.4 attenuated BRET between Kir3.1-RLuc and GFP-G $\beta_1$  provides another indication that the interaction of the K<sup>+</sup> channel with G-protein subunits is specific. For comparison,  $\beta_2$ AR-GFP was co-expressed with KvLQT1-RLuc and CD8-RLuc was co-expressed with GFP-G $\gamma_2$ . Although these proteins co-localize in the plasma membrane they do not interact, and there was little or no BRET between them, indicating that non-specific interactions were not a significant problem in our studies. The specificity of these interactions was also indicated by the finding that BRET between AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$  persisted at low protein expression levels (Kenworthy and Edidin, 1998). In addition, co-expression of both G $\alpha_s$  and G $\beta_1$  significantly increased BRET between AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ . The presence of exogenously expressed G $\alpha$ , G $\gamma_2$  or G $\beta_1$  probably increases the cellular complement of GFP-tagged heterotrimeric G proteins that is available to interact with AC-RLuc, and provides indirect evidence that all three G-protein subunits are associated with AC even in the absence of signal transduction. BRET experiments provided direct evidence that G $\alpha$  subunits were associated with both AC and Kir3.1, and combining BiFC with BRET provided a way of showing that AC and Kir3.1 formed complexes with the G $\beta_1\gamma_2$  heterodimer. BRET between GFP-tagged G $\beta_1$  or G $\gamma_2$  or YFP-tagged G $\beta_1\gamma_2$  and Kir3.1-RLuc or AC-RLuc increased during signal transduction whereas BRET

between the tagged  $G_{\alpha}$  subunits and effectors was unaffected. These observations are consistent with the heterotrimeric G protein being persistently associated with effectors whereas the agonist-induced changes in BRET indicate conformational perturbations that accompany activation of the G protein.

The increase in BRET between AC-RLuc and GFP- $G\gamma_2$  caused by treating cells with the agonist isoproterenol may be attributable to (1) a change in the number of protein complexes due to a change in affinity, and/or (2) a change in the relative orientation of the donor and acceptor owing to a change in conformation. To identify the basis of isoproterenol-induced changes in BRET between AC-RLuc and GFP- $G\gamma_2$ , experiments were conducted in which the expression of the donor RLuc-tagged protein was maintained at a constant level while that of the acceptor GFP-tagged protein was varied. If the BRET is saturable (i.e. approaches a maximum value asymptotically as the concentration of acceptor-tagged protein increases) a  $BRET_{50}$  can be determined. Since  $BRET_{50}$  is proportional to  $K_D$  (Mercier et al., 2002), some conclusion can be made regarding the affinity of the two partners in the presence and absence of isoproterenol. The  $BRET_{50}$  for cells co-expressing AC-RLuc and GFP- $G\gamma_2$  was the same whether or not the cells were treated with isoproterenol, suggesting that activation of the G protein did not change the affinity of these proteins for one another. Although the agonist did not shift the  $BRET_{50}$ , there was an increase in the maximum BRET. These curves were well fitted by single exponential functions suggesting that they report on interactions with one and the same equilibrium constant. Thus, a change in the plateau value, which represents the acceptor-saturated state, with no change in the affinity provides additional evidence that there is an agonist-induced conformational change within the complex rather than a change in the number of complexes.

Data presented here and elsewhere indicate that whether or not signaling is activated, receptors are associated with effectors (Davare et al., 2001; Kitano et al.,

2003; Lavine et al., 2002; Liu et al., 2004), and that G-protein subunits remain associated with each other (Bünemann et al., 2003; Evanko et al., 2005; Frank et al., 2005; Ganpat et al., 2000), with their receptors (Galés et al., 2005; Lachance et al., 1999) and with their effectors. These data suggest that assemblies containing these components, and perhaps many additional proteins needed for G-protein-mediated signaling (Rebois and Hébert, 2003), may represent a common organizational theme needed to ensure the specificity and efficacy of signal transduction. This raises the question of where these complexes are assembled. Kir3.1 is not transported to the plasma membrane unless a heterologous Kir3 subunit (e.g. Kir3.2 or Kir3.4) is also expressed (Ma et al., 2002). Nevertheless, BRET was observed between Kir3.1-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ , Kir3.1-RLuc and GFP-G $\beta_1$ , Kir3.1-RLuc and YFP-G $\beta_1\gamma_2$ , and G $\alpha_i$ -RLuc and Kir3.1-GFP in the absence of a co-expressed Kir3 targeting subunit, suggesting that Kir3.1 and G $\alpha_i\beta_1\gamma_2$  form a complex before reaching the plasma membrane. This, together with evidence that  $\beta_2$ AR and Kir3.1 channel subunits also form complexes before reaching the plasma membrane (Lavine et al., 2002) suggest that receptors, G-protein heterotrimers and effectors initially come together inside the cell. Furthermore, the hypothesis that these intracellular assemblies are at least partially functional, and contain heterotrimeric G proteins that can be activated is supported by the finding that the membrane-permeable agonist, cimaterol, invoked a change in the BRET signal between Kir3.1-RLuc and GFP-G $\beta_1$ . The membrane-impermeable agonist isoproterenol caused a similar change in the BRET, but only if the cells co-expressed Kir3.4 targeting the complex to the cell surface.

In addition to the arguments for agonist-induced conformational changes in stable G-protein-effector complexes, we have reported receptor-mediated changes in the receptor-G-protein interaction (Galés et al., 2005) but not in the receptor/effector interaction (Lavine et al., 2002) under similar experimental conditions. The simplest interpretation is that the receptor, G protein and effector remain closely associated as a complex during signal transduction and changes in BRET reflect changes in protein

conformation. These observations are supported by recent studies demonstrating that G-protein heterotrimers remain associated with Kir3 channels even after channel activation (Clancy et al., 2005).

If heterotrimeric G proteins are assembled at the same time that receptors and effectors are incorporated into a signaling complex, this might explain how G proteins with specific G $\beta\gamma$  subtype combinations are produced. Although G $\alpha$  subunits, and effectors for that matter, do not seem to discriminate with regard to the subtype composition of the G $\beta\gamma$  heterodimer they interact with, receptors apparently have certain requirements in this regard (for reviews, see Rebois and Hébert, 2003; Robishaw and Berlot, 2004). The finding that  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes show selectivity for G $\beta\gamma$  heterodimers of a particular subtype composition in regulating Kir3 channels (Robillard et al., 2000) may be considered as corroborating evidence. Consequently, the presence of a receptor during assembly of signaling complexes may be responsible for dictating the subtype composition of the heterotrimeric G proteins associated with it. Put another way, the receptor acts as a scaffold for a particular signaling complex. We have recently demonstrated that RGS2 also stably interacts with G<sub>s</sub>-AC signaling complexes (Roy et al., 2006). Given the large number of other proteins that are likely to be involved in the formation, trafficking, regulation and maintenance of G-protein-mediated signal transduction pathways (Rebois and Hébert, 2003) it seems inevitable that additional components will be identified as part of these signaling complexes as well.

## Materials and Methods

### Constructs

The preparation of recombinant plasmids encoding rat type II adenylyl cyclase and the human inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit Kir3.1, each with a C-terminal *Renilla reniformis* luciferase tag (AC-RLuc and Kir3.1-RLuc, respectively), as well as HA-tagged Kir3.1 have been described (Lavine et al., 2002). The construction of recombinant plasmids coding for the rat stimulatory heterotrimeric G-protein  $\alpha$ -subunit ( $G\alpha_s$ ), the rat inhibitory heterotrimeric G-protein  $\alpha$ -subunit ( $G\alpha_{i2}$ ), the bovine heterotrimeric G-protein  $\beta_1$  subunit ( $G\beta_1$ ), and the human inwardly rectifying potassium channel subunit Kir3.4 have also been reported (Lavine et al., 2002). The plasmid encoding  $G\alpha_s$  with the enhanced variant of GFP (EGFP) inserted into its  $\alpha$ -helical domain was a generous gift of M. Rasenick (University of Illinois, Chicago, IL). Plasmids encoding bovine  $G\gamma_2$  with either GFP<sup>2</sup> (Lavoie et al., 2002) or EGFP fused to its N-terminus (GFP- $G\gamma_2$ ) were constructed. For  $G\alpha_{i1}$ -RLuc, the RLuc moiety was introduced between L91 and K92 in the loop connecting helices A and B, analogous to a YFP fusion protein previously described (Bünemann et al., 2003). To construct a plasmid coding for the C-terminus of the voltage-dependent K<sup>+</sup> channel, KvLQT1 fused to RLuc, the stop codon was removed from the KvLQT1 cDNA (generous gift of M. Sanguinetti, University of Utah, Salt Lake City, UT) and replaced with restriction site for *NheI*. An existing *NheI* site upstream of the sequence for KvLQT1 allowed the full-length channel cDNA to be inserted in-frame with RLuc. Membrane localization of the resulting fusion protein was confirmed by confocal microscopy (data not shown). A plasmid encoding  $G\beta_1$  with RLuc fused to its N-terminus (RLuc- $G\beta_1$ ) was generated by transferring the cDNA for human  $G\beta_1$  from pcDNA3.1- $G\beta_1$  (UMR cDNA Resource, Rolla, MO) into the humanized pRluc-C1 vector cut with restriction enzymes *HindIII* and *XbaI* (PerkinElmer Life Sciences). A construct encoding  $G\beta_1$  with EGFP fused to its N-terminus (GFP- $G\beta_1$ ) (Doering et al., 2004) was a generous gift from G. Zamponi (University of Calgary, Calgary, AB). Plasmids encoding YFP<sub>1-158</sub> fused to the N-terminus of human  $G\beta_1$  (YFP<sub>1-</sub>

$_{158}\text{-G}\beta_1$ ), and YFP $_{159-238}$  fused to the N-terminus of human  $\text{G}\gamma_2$  (YFP $_{159-238}\text{-G}\gamma_2$ ), were generous gifts of C. Berlot (Geisinger Institute, Danville, PA). The *HindIII-BamHI* fragment of pcDNA-CD8- $\beta$ ARK-CT (Crespo et al., 1995) encoding the extracellular and transmembrane domain of the CD8 lymphocyte-specific receptor (from codon 1 to 209) was subcloned into the *HindIII-BamHI* sites of the humanized pRLuc-N1 vector (PerkinElmer Life Sciences). CD4 tagged with RLuc was obtained from J. Stankova at the Université de Sherbrooke (Sherbrooke, QC). The cDNA for the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2\text{AR}$ ) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and subcloned into pcDNA 3.1 by Varitas. The cDNA for the human M2 muscarinic receptor and FLAG-tagged  $\text{G}\beta_1$  were obtained from the UMR cDNA resource center (Rolla, MO). The cell line stably expressing HA-tagged  $\beta_2\text{AR}$  (5 pmol/mg membrane protein) was generated as described (Azzi et al., 2003).  $\beta_2\text{AR-GFP}$  and  $\beta_2\text{AR-RLuc}$  constructs, respectively, were as previously described (Angers et al., 2000).

### **Protein expression in HEK 293 cells**

HEK 293 cells were plated at a density of  $10^5$  cells/cm $^2$  in six- or 24-well polylysine-coated plates. Approximately 24 hours later, cells were transfected using Lipofectamine Plus (Invitrogen) as described (Lavine et al., 2002). Unless otherwise indicated, 24-well plates received 0.4  $\mu\text{g}$  plasmid DNA/well (0.2  $\mu\text{g}$ /well for the expression of AC) and 6-well plates received 1.0  $\mu\text{g}$  plasmid DNA/well (0.1  $\mu\text{g}$ /well for the expression of AC). For some experiments, the expression levels of both AC-RLuc and GFP- $\text{G}\gamma_2$  were varied without changing their molar ratio. Although the amount of recombinant plasmids used for transfections varied, the total amount of DNA was kept constant by adding vector DNA. Assessing the expression of GFP- $\text{G}\gamma_2$  by fluorescence microscopy revealed that transfection efficiency was  $>70\%$ . Varying the amount of plasmid used for transfections affected the level of protein expression in individual cells, but not overall transfection efficiency. Although there was a direct correlation between the amount of plasmid transfected and the amount of protein expressed, it was not



possible to express AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$  in a fixed ratio by simply varying plasmid concentrations while keeping the ratio of the plasmids for these proteins constant (i.e. the correlation between plasmid concentration and protein expression was linear for both AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ , but the slopes of the lines relating the amount of plasmid used for transfection versus the amount of expressed protein differed). Consequently, plasmid concentrations for AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$  were adjusted independently (0.3-40 ng of plasmid for AC-RLuc and 5-300 ng for GFP-G $\gamma_2$ ) to achieve a fixed ratio of expressed proteins. The levels of co-expressed  $\beta_2$ AR, G $\alpha_s$  and G $\beta_1$  were also varied by maintaining the amounts of their plasmids in proportion to that for GFP-G $\gamma_2$ . At 24 hours after transfection, media was replaced with DMEM containing 10% fetal bovine serum and cells were used for experiments approximately 48 hours after transfection.

### **Functional assessment of fusion proteins in oocytes and HEK 293 cells**

cDNA constructs for Kir3.2, G $\beta_1$ , G $\gamma_2$ , GFP-G $\gamma_2$ , FLAG-G $\beta_1$ , GFP-G $\beta_1$  and RLuc-G $\beta_1$  were linearized with restriction enzymes, and purified using GeneClean (Bio 101). RNA synthesis and *Xenopus* oocyte isolation, injection and electrophysiological recordings were performed as described (Robillard et al., 2000\*). Standard recording solution was KD-98 (98 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K-HEPES, pH 7.5). To verify the function of G $\alpha_i$ -RLuc, we co-expressed this cDNA or pcDNA vector control with human M2 muscarinic receptor and Kir3.2 in HEK 293 cells. At 3 days after transfection, currents were recorded using whole-cell patch clamp, as previously described, before and after stimulation with 1  $\mu$ M carbachol (Sigma) (Weerapura et al., 2002). Where necessary, data was collected and analyzed with pCLAMP v.7 and Clampfit (Axon Instruments). cAMP determinations in HEK 293 cells were performed as described (Lavine et al., 2002). Briefly, cells in 24-well tissue culture plates were incubated at 37°C for 15 minutes (a convenient period of time during which cAMP production was constant) in serum-free medium containing 1 mM isobutylmethylxanthine in the absence or presence of 10  $\mu$ M (-)isoproterenol, and cellular cAMP levels were measured by radioimmune assay.

### **Estimating GFP-G $\gamma_2$ and AC-RLuc expression**

Protein expression levels for AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$  were quantified by measuring RLuc activity and GFP fluorescence, respectively. For some calculations, these values were converted to moles of protein as follows: specific [ $^{125}$ I]CYP binding to HEK 293 cells expressing either  $\beta_2$ AR-RLuc or  $\beta_2$ AR-GFP was measured. The use of [ $^{125}$ I]CYP for  $\beta_2$ AR binding assured that total receptor levels would be detected and sham transfected cells were used to determine the background for [ $^{125}$ I]CYP binding. RLuc activity or GFP fluorescence measurements were made using the same cells so that a ratio of RLuc activity/mole of  $\beta_2$ AR-RLuc or GFP fluorescence/mole of  $\beta_2$ AR-GFP could be calculated. These ratios were used to convert RLuc activity and GFP fluorescence in cells expressing AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$  to moles of AC and G $\gamma_2$  protein, respectively. At the lowest expression levels, it was estimated that the cells produced 2500 fmol of GFP-G $\gamma_2$  and 50 fmol of AC-RLuc/mg of total cell protein.

### **Preparation of cells for immunoprecipitation and BRET assays**

The culture media was removed from transfected HEK 293 cell and replaced with a solution containing trypsin/EDTA in Hank's Balanced Salt Solution lacking Ca $^{2+}$  and Mg $^{2+}$  (Invitrogen). After incubating for 10 minutes at 37°C, an equal volume of culture medium containing 10% FBS and 0.1% soybean trypsin inhibitor was added, the cells were harvested, and collected by centrifugation at 110 *g* for 5 minutes at room temperature. Cells were resuspended in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) containing protease inhibitors (Roche), 1 mg glucose/ml and 1 mM ascorbate. The cell suspension was assayed for protein using Bio-Rad Protein Assay Reagent. This procedure reproducibly yielded preparations where cell viability was >95% as assessed by Trypan Blue staining.

## Immunoprecipitation

For some experiments, western blotting was used to determine if RLuc-tagged proteins were co-immunoprecipitated with GFP-tagged proteins. HEK 293 cells expressing G $\beta$ <sub>1</sub>-GFP together with G $\gamma$ <sub>2</sub> and AC-RLuc were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 5 mM Tris, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml benzamidine, and 5  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor. Cells were homogenized with a Polytron and the membranes dissolved with RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, and 1 mM PMSF). The detergent extracts were centrifuged to remove insoluble material, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until required. Immunoprecipitation was accomplished by adding 0.2  $\mu$ g of anti-GFP antibody (Clontech) to 450  $\mu$ l of clarified detergent extract, and incubated with shaking for 16 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ . Antibody complexes were precipitated with 100  $\mu$ l of a 50% slurry of anti-mouse IgG agarose (Sigma), washed in RIPA buffer, and resuspended in SDS-PAGE sample buffer. Following electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and co-precipitated RLuc-tagged proteins detected with anti-luciferase antibodies (1:1000; Chemicon). In some cases, FLAG-tagged G $\beta$ <sub>1</sub> was co-expressed with HA-tagged Kir3.1. Co-immunoprecipitations were performed as described above using beads conjugated to mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (Sigma, as per manufacturer's instructions). Immunoblots were probed with either a monoclonal anti-HA antibody (Covance, 1:1000) or with a polyclonal anti-FLAG antibody (Sigma, 1:1000). HRP-conjugated secondary antibodies were from Sigma (anti-mouse or anti-rabbit, 1:20,000). For quantitative immunoprecipitation, samples of intact cells containing 50  $\mu$ g of protein were collected by centrifugation at 110 *g* for 5 minutes at room temperature, and the pellet resuspended in 250  $\mu$ l of Solution A (20 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA and 0.1 mM DTT with protease inhibitors, pH 8.0) containing 1% CHAPS (Sigma). After incubating at  $4^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes, an equal volume of Solution A was added and the samples were centrifuged at 100,000 *g* for 1 hour. The supernatants from each sample received 1  $\mu$ l of polyclonal anti-GFP antibody

(BD Biosciences), and were incubated for 1 hour at room temperature before adding 40  $\mu$ l of a 50% slurry of Protein A-Sepharose (Zymed) in DPBS. Following an additional incubation for 1 hour at room temperature with vigorous shaking, beads were washed several times with DPBS. Luciferase activity was assayed with a Turner Design 20/20 Luminometer using 5  $\mu$ M coelenterazine H as a substrate. Luciferase activity remaining in the detergent extract was also assayed to determine percentage of total RLuc activity immunoprecipitated.

### **BRET measurements**

For cells expressing EGFP- and YFP-tagged proteins, BRET was assessed by measuring the ratio of light passed by  $\geq 480$  nm filters to that passed by a 450/58 nm filter with coelenterazine H (Molecular Probes) as a substrate for RLuc. For cells expressing proteins fused to GFP<sup>2</sup>, the substrate for RLuc was DeepBlueC (PerkinElmer), and BRET was assayed using 515/30 and 410/80 nm filters. Samples of cell suspensions containing 25-100  $\mu$ g of protein were dispensed into 96-well white OptiPlates (PerkinElmer). The assay was initiated by adding RLuc substrate followed by the addition of vehicle, isoproterenol, cimaterol and/or propranolol. For some experiments, BRET was assayed before and after the addition of ligand to cells. The sample volume in each well was 100  $\mu$ l and the final concentrations of RLuc substrate and ligands were 5  $\mu$ M and 1  $\mu$ M, respectively. BRET background was determined under conditions where resonance energy transfer between RLuc and GFP either could not, or did not, occur. This was accomplished by expressing RLuc or RLuc-tagged proteins either alone or together with GFP or GFP-tagged proteins, none of which interact physiologically. The background was the same regardless of which of the aforementioned individual proteins or combinations of proteins were expressed, and it has been subtracted to yield net BRET.

Previous studies have shown that a GFP-tagged  $\beta_2$ AR is both biologically active and forms a complex that gives BRET with co-expressed  $\beta_2$ AR-RLuc (Angers et al.,

2000), as well as with Kir3.1-RLuc or AC-RLuc (Lavine et al., 2002). Therefore, co-expression of  $\beta_2$ AR-GFP together with  $\beta_2$ AR-RLuc, Kir3.1-RLuc or AC-RLuc were used as positive controls in BRET experiments (data not shown). In some experiments, fusion proteins of YFP with RLuc also served as a positive BRET control.

### **Confocal Microscopy**

At 24 hours after transfecting HEK 293 cells with Kir3.1-RLuc and/or FLAG-tagged Kir3.4, they were seeded on glass coverslips that had been treated with laminin (10  $\mu$ g/ml). At 4 hours after seeding, the cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 20 minutes, followed by three washes of 5 minutes with PBS, and incubation with 2% normal donkey serum (NDS; Jackson Laboratories) to block non-specific binding. The cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 1 hour in an incubation chamber, followed by an overnight incubation at 4°C with the primary antibodies (1:200 dilution of rabbit anti-FLAG, Sigma; and/or 1:100 dilution of mouse anti-luciferase, Chemicon International). Primary antibodies were removed by three washes of 5 minutes with PBS followed by incubation for 45 minutes at room temperature with a 1:500 dilution of a secondary antibody (goat anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor 647 and/or goat anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 488; Molecular Probes). Both primary and secondary antibodies were diluted in 1% NDS and 0.04% Triton X-100. Cells were examined on an inverted laser-scanning microscope (LCM 510; Zeiss).

## **Acknowledgements**

This work was supported in part by grants from the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Institutes of Health Research (to T.E.H. and M.B.). This work was also supported in part with funds provided by the Intramural Research Programs of the National Institute of Neurological Disorder and Stroke (NINDS) and the National Institute of Deafness and Communicative Disorders (NIDCD). The authors would like to thank Drs. Cathy Berlot, Mike Sanguinetti, Jana Stankova and Gerald Zamponi for recombinant plasmids and Louis R. Villeneuve for assistance with confocal microscopy.

## References

**Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M. and Bouvier, M.** (2000). Detection of  $\beta_2$ -adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3684-3689.

**Arad, H., Rosenbusch, J. P. and Levitzki, A.** (1984). Stimulatory GTP regulatory unit  $N_s$  and the catalytic unit of adenylate cyclase are tightly associated: Mechanistic consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 6579-6583.

**Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M. and Pineyro, G.** (2003).  $\beta$ -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11406-11411.

**Bünemann, M., Frank, M. and Lohse, M. J.** (2003).  $G_i$  protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 16077-16082.

**Clancy, S. M., Fowler, C. E., Finley, M., Suen, K. F., Arrabit, C., Berton, F., Kosaza, T., Casey, P. J. and Slesinger, P. A.** (2005). Pertussis-toxin-sensitive Galpha subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Mol Cell Neurosci* **28**, 375-89.

**Crespo, P., Cachero, T. G., Xu, N. and Gutkind, J. S.** (1995). Dual effect of  $\beta$ -adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. Evidence for a  $\beta\gamma$ -dependent activation and a  $G\alpha_s$ - cAMP-mediated inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25259-25265.

**Davare, M. A., Avdonin, V., Hall, D. D., Peden, E. M., Burette, A., Weinberg, R. J., Horne, M. C., Hoshi, T. and Hell, J. W.** (2001). A  $\beta_2$ -adrenergic receptor signaling complex assembled with the  $Ca^{2+}$  channel Cav1.2. *Science* **293**, 98-101.

**Dilly, K. W., Kurokawa, J., Terrenoire, C., Reiken, S., Lederer, W. J., Marks, A. R. and Kass, R. S.** (2004). Overexpression of  $\beta_2$ -adrenergic receptors cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and modulates slow delayed rectified potassium channels expressed in murine heart: Evidence for receptor/channel colocalization. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 40778-40787.

**Doering, C. J., Kisilevsky, A. E., Feng, Z.-P., Arnot, M. I., Peloquin, J., Hamid, J., Barr, W., Nirdosh, A., Simms, B., Winkfein, R. J. et al.** (2004). A single G $\beta$  subunit locus controls cross-talk between protein kinase C and G protein regulation of N-type calcium channels. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 29709-29717.

**Dohlman, H. G. and Thorner, J. W.** (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu Rev Biochem* **70**, 703-54.

**Ehrlich, J. R., Pourrier, M., Weerapura, M., Ethier, N., Marmabachi, A. M., Hebert, T. E. and Nattel, S.** (2004). KvLQT1 modulates the distribution and biophysical properties of HERG. A novel alpha-subunit interaction between delayed rectifier currents. *J Biol Chem* **279**, 1233-41.

**Evanko, D. S., Thiyagarajan, M. M., Takida, S. and Wedegaertner, P. B.** (2005). Loss of association between activated G $\alpha_q$  and G $\beta\gamma$  disrupts receptor-dependent and receptor-independent signaling. *Cellular Signalling* **17**, 1218-1228.

**Frank, M., Thümer, L., Lohse, M. J. and Bünemann, M.** (2005). G Protein activation without subunit dissociation depends on a G $\alpha_i$ -specific region. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 24584-24590.

**Galés, C., Rebois, R. V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hébert, T. E. and Bouvier, M.** (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nature Methods* **2**, 177-184.

**Ganpat, M. M., Nishimura, M., Toyoshige, M., Okuya, S., Pointer, R. H. and Rebois, R. V.** (2000). Evidence for stimulation of adenylyl cyclase by an activated G $_s$  heterotrimer in cell membranes: An experimental method for controlling the G $_s$  subunit composition of cell membranes. *Cellular Signalling* **12**, 113-122.



**Hu, C.-D., Chinenov, Y. and Kerppola, T. K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell* **9**, 789-798.

**Hu, C.-D. and Kerppola, T. K.** (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology* **21**, 539-545.

**Huang, C.-L., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (1997). Binding of the G protein  $\beta\gamma$  subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying  $K^+$  channels. *FEBS Letters* **405**, 291-298.

**Huang, C.-L., Slesinger, P. A., Casey, P. J., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (1995). Evidence that direct binding of  $G\beta\gamma$  to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  channel is important for channel activation. *Neuron* **15**, 1133-1143.

**Hynes, T. R., Tang, L., Mervine, S. M., Sabo, J. L., Yost, E. A., Devreotes, P. N. and Berlot, C. H.** (2004). Visualization of G protein  $\beta\gamma$  dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both  $\beta$  and  $\gamma$  in subcellular targeting. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 30279-30286.

**Kenworthy, A. K. 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. *Journal of Cell Biology* **142**, 69-84.

**Kitano, J., Nishida, M., Itsukaichi, Y., Minami, I., Ogawa, M., Hirano, T., Mori, Y. and Nakanishi, S.** (2003). Direct interaction and functional coupling between metabotropic glutamate receptor subtype 1 and voltage-sensitive Cav2.1  $Ca^{2+}$  channel. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 25101-25108.

**Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. and Clapham, D. E.** (1995). The G-protein-gated atrial  $K^+$  channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying  $K(+)$ -channel proteins. *Nature* **374**, 135-41.

**Lachance, M., Ethier, N., Wolbring, G., Schnetkamp, P. P. M. and Hebert, T. E.** (1999). Stable association of G proteins with  $\beta_2AR$  is independent of the state of receptor activation. *Cellular Signalling* **11**, 523-533.

**Lavine, N., Ethier, N., Oak, J. N., Pei, L., Liu, F., Trieu, P., Rebois, R. V., Bouvier, M., Hebert, T. E. and Van Tol, H. H. M.** (2002). G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 46010-46019.

**Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L. R., Zhu, W. Z., Xiao, R. P., Lakatta, E. G., Bouvier, M. et al.** (2002).  $\beta_1/\beta_2$ -adrenergic receptor heterodimerization regulates  $\beta_2$ -adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 35402-35410.

**Levitzki, A.** (1981). The  $\beta$ -adrenergic receptor and its mode of coupling to adenylate cyclase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **10**, 81-112.

**Levitzki, A.** (1984). Receptor to effector coupling in the receptor-dependent adenylate cyclase system. *Journal of Receptor Research* **4**, 399-409.

**Levitzki, A.** (1986).  $\beta$ -Adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase. *Physiological Reviews* **66**, 819-854.

**Levitzki, A.** (1988a). From epinephrine to cyclic AMP. *Science* **241**, 800-806.

**Levitzki, A.** (1988b). Transmembrane signalling to adenylate cyclase in mammalian cells and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Biochemical Sciences* **13**, 298-301.

**Liu, G., Shi, J., Yang, L., Cao, L., Park, S. M., Cui, J. and Marx, S. O.** (2004). Assembly of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent BK channel signaling complex by binding to  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *EMBO Journal* **23**, 2196-2205.

**Ma, D., Zerangue, N., Raab-Graham, K., Fried, S. R., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2002). Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* **33**, 715-729.

**Marbach, I., Bar-Sinai, A., Minich, M. and Levitzki, A.** (1990).  $\beta$  subunit copurifies with GppNHP-activated adenylyl cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 9999-10004.

**Mercier, J.-F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. and Bouvier, M.** (2002). Quantitative assessment of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 44925-44931.

**Mirshahi, T. and Logothetis, D. E.** (2004). Molecular determinants responsible for differential cellular distribution of G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* **279**, 11890-7.

**Montell, C.** (1999). Visual transduction in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 231-68.

**Nikolov, E. N. and Ivanova-Nikolova, T. T.** (2004). Coordination of membrane excitability through a GIRK1 signaling complex in the atria. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 23630-23636.

**Nobles, M., Benians, A. and Tinker, A.** (2005). Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18706-11.

**Rebois, R. V. and Hébert, T. E.** (2003). Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. *Receptors and Channels* **9**, 169-194.

**Rebois, R. V., Warner, D. R. and Basi, N. S.** (1997). Does subunit dissociation necessarily accompany the activation of all heterotrimeric G proteins? *Cellular Signalling* **9**, 141-151.

**Robillard, L., Ethier, N., Lachance, M. and Hébert, T. E.** (2000). G $\beta\gamma$  subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling *in vivo*. *Cellular Signalling* **12**, 673-682.

**Robishaw, J. D. and Berlot, C. H.** (2004). Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 206-209.

**Roy, A. A., Baragli, A., Bernstein, L. S., Hepler, J. R., Hébert, T. E. and Chidiac, P.** (2006). RGS2 interacts with Gs and adenylyl cyclase in living cells. *Cell Signal* **18**, 336-48.

**Schoots, O., Wilson, J. M., Ethier, N., Bigras, E., Hebert, T. E. and Van Tol, H. H.** (1999). Co-expression of human Kir3 subunits can yield channels with different functional properties. *Cellular Signalling* **11**, 871-883.

**Tolkovsky, A. M., Braun, S. and Levitzki, A.** (1982). Kinetics of interaction between  $\beta$ -receptors, GTP protein, and the catalytic unit of turkey erythrocyte adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 213-217.

**Tolkovsky, A. M. and Levitzky, A.** (1981). Theories and predictions of models describing sequential interactions between the receptor, the GTP regulatory unit, and the catalytic unit of hormone dependent adenylate cyclases. *Journal of Cyclic Nucleotide Research* **7**, 139-150.

**Weerapura, M., Nattel, S., Chartier, D., Caballero, R. and Hebert, T. E.** (2002). A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol* **540**, 15-27.

**Weitmann, S., Schultz, G. and Kleuss, C.** (2001). Adenylyl cyclase type II domains involved in G $\beta\gamma$  stimulation. *Biochemistry* **40**, 10853-10858.

**Yu, J.-Z. and Rasenick, M. M.** (2002). Real-time visualization of a fluorescent G $\alpha_s$ : Dissociation of the activated G protein from plasma membrane. *Molecular Pharmacology* **61**, 352-359.

## Figures

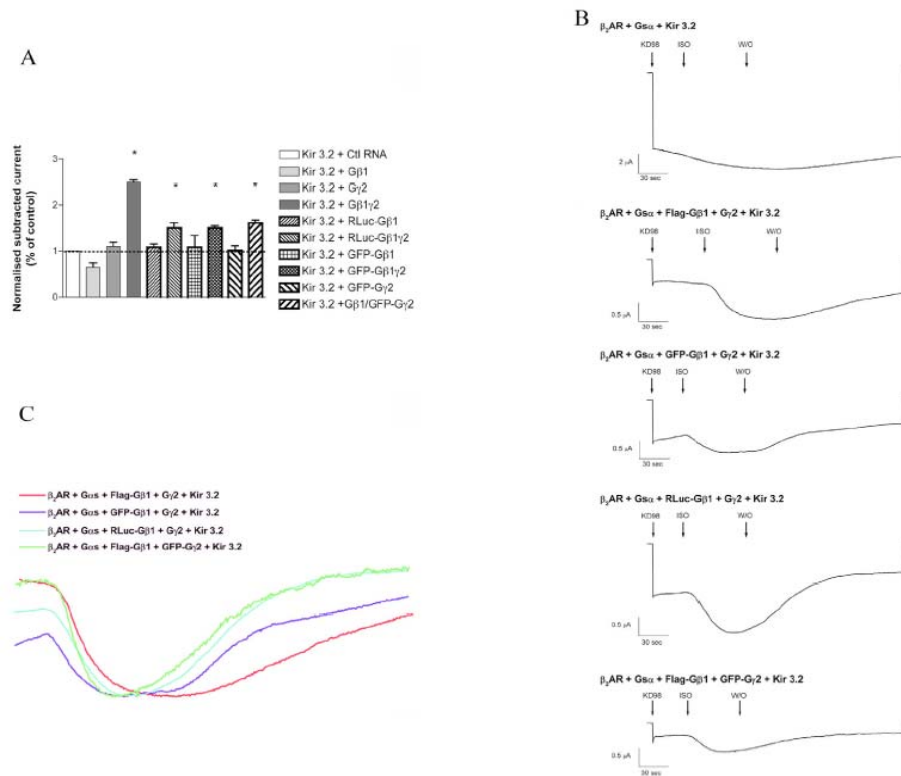


Figure 8 : Stimulation of Kir3.2 channels by co-expressed wild type and tagged  $G\beta_1$  and  $G\gamma_2$  subunits in *Xenopus oocytes*.

(A)  $K^+$  currents were recorded 1-3 days after injection of cRNAs for the indicated proteins. Data for each sample represent the mean  $\pm$  s.e.m. for at least five oocytes. The dashed line represents basal Kir3.2 current levels in the absence of co-expressed  $G\beta$  and  $G\gamma$  subunits. Note the lack of potentiation when  $G\beta$  or  $G\gamma$  constructs were expressed in the absence of their cognate partners. Significant increases in current were determined by an unpaired t-test (\* $P < 0.05$  compared with levels in the control), and the data is representative of at least three independent experiments. (B) Agonist-activated currents in oocytes co-expressing  $\beta_2AR$ . Arrows denote application and washout of 1  $\mu M$  isoproterenol in KD-98 solution (see Materials and Methods). Oocytes were maintained at  $-80mV$  (a potential at which significant inward current can be measured). Data are representative of at least four separate oocytes for each experiment. (C) Data from B normalized to maximal current level to compare activation and deactivation kinetics.

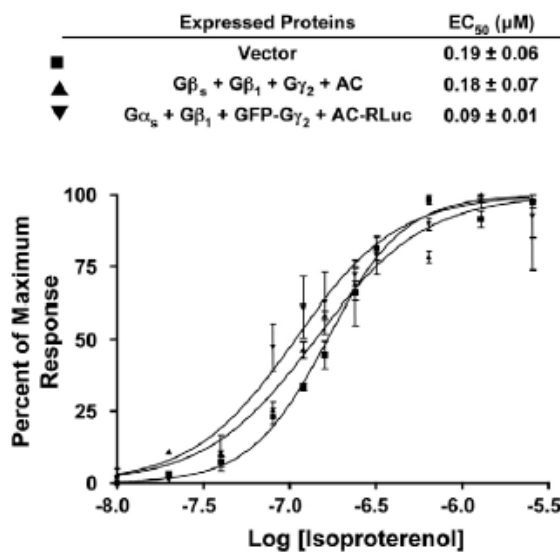


Figure 9 : Dose dependence of agonist-induced cAMP accumulation in cells co-expressing either AC and G $\gamma_2$  or AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ .

HEK 293 cells were transfected with vector or with recombinant plasmids so that they expressed the indicated proteins. The cells were treated with different concentrations of isoproterenol before being assayed for cAMP levels. Dose-response curves and EC<sub>50</sub> values were generated using GraphPad Prism® software. The EC<sub>50</sub> values are reported as the mean  $\pm$  s.d. for three independent experiments. The data presented in the graph are for a typical experiment in which the maximal agonist-induced increase in cAMP accumulation was 336 pmol cAMP/mg protein/15 minutes for HEK cells that did not express exogenous proteins (Vector) as compared with 5512 and 3070 pmol cAMP/mg protein/15 minutes, respectively for cells expressing either exogenous wild-type or tagged proteins.

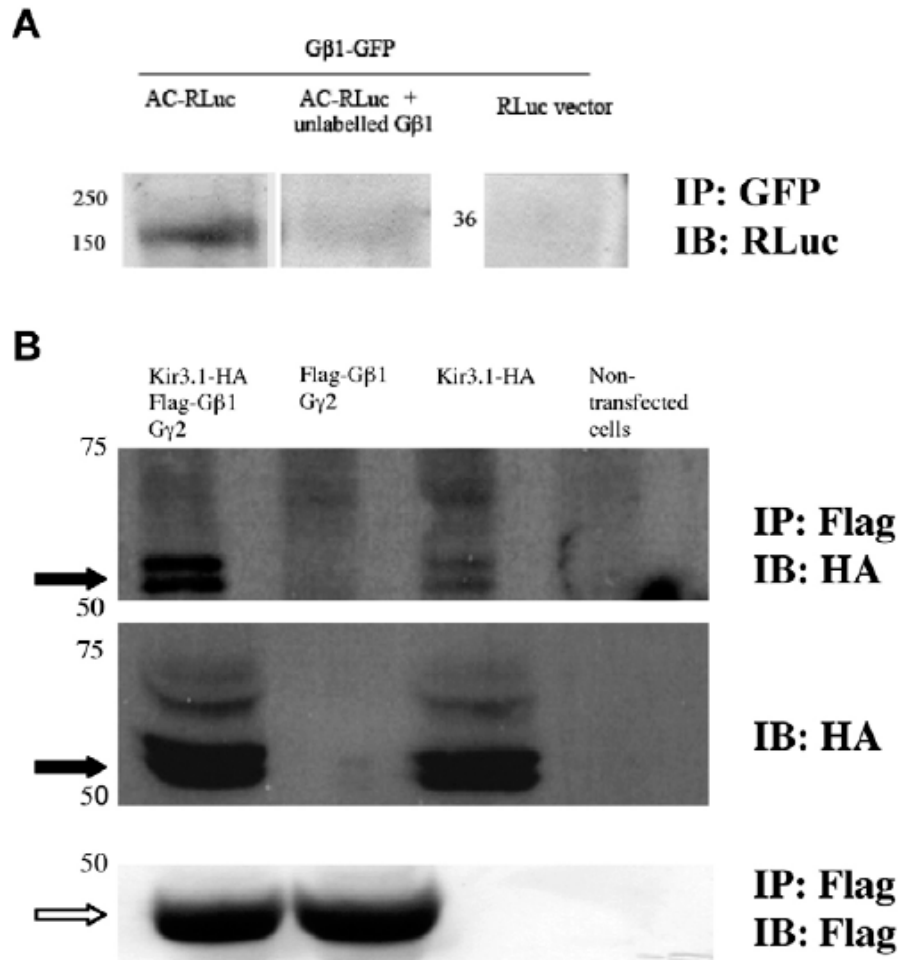


Figure 10 : *Co-immunoprecipitation of effectors with Gβγ.*

HEK 293 cells expressing the indicated proteins were dissolved in RIPA before immunoprecipitation. Precipitated proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose for western blotting. (A) AC-RLuc was precipitated by anti-GFP antibodies from cells co-expressing GFP-Gβ<sub>1</sub> and Gγ<sub>2</sub> (left panel). No detectable RLuc was precipitated if the cells also expressed untagged Gβ<sub>1</sub> (middle panel) or if they expressed RLuc in place of AC-RLuc (right panel). (B) HA-tagged Kir3.1 was precipitated with anti-Flag antibodies from cells co-expressing Flag-tagged Gβ<sub>1</sub> and wild-type Gγ<sub>2</sub>. Precipitation of a HA-tagged protein required co-expression of both Kir3.1-HA and Flag-Gβ<sub>1</sub>. Solid arrows represent differentially glycosylated forms of Kir3.1 as seen in native tissues (Krapivinsky et al., 1995). Middle panel shows cell lysates blotted for expression of HA-tagged Kir3.1. Lower panel shows immunoprecipitation of Gβ by anti-Flag antibodies. Open arrow indicates specific Gβ signal. The blots are representative of at least three independent experiments.

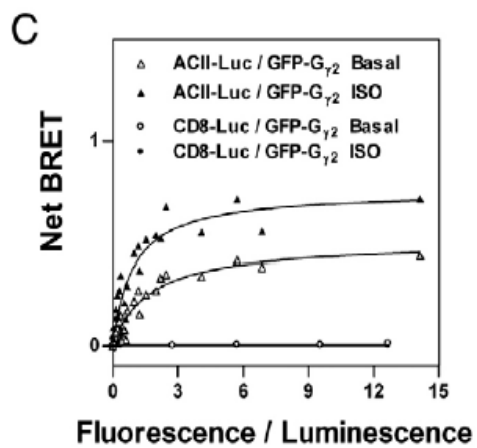
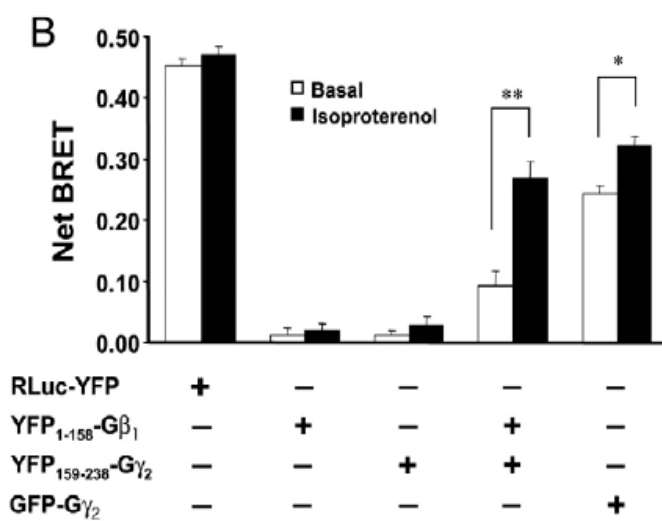
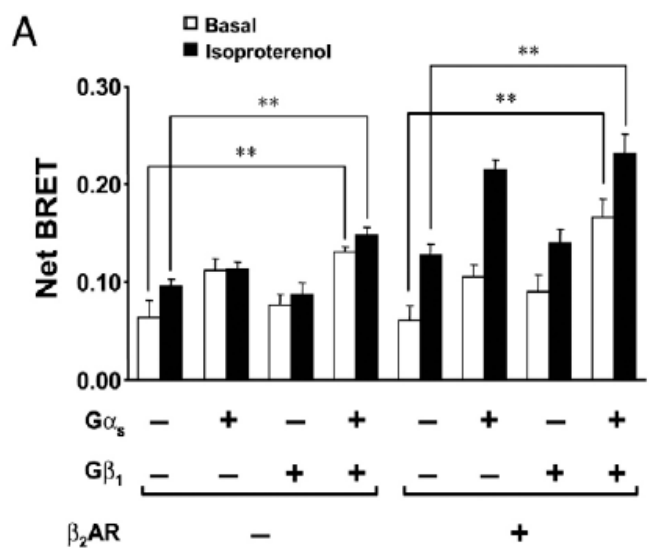




Figure 11 : *BRET between AC-RLuc and either GFP-G $\gamma_2$  or YFP-G $\beta_1\gamma_2$ .*

(A) HEK 293 cells were transfected with recombinant plasmids to express AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ . In addition, cells expressed  $\beta_2$ AR, G $\alpha_s$  and/or G $\beta_1$  as indicated. BRET was significantly increased when G $\alpha_s$  and G $\beta_1$  were co-expressed with GFP-G $\gamma_2$  (\*\* $P < 0.005$  between groups as indicated). Isoproterenol caused a significant increase in BRET in all cells that expressed exogenous  $\beta_2$ AR ( $P < 0.005$ ). (B) HEK 293 cells were transfected to express  $\beta_2$ AR, G $\alpha_s$  and AC-RLuc as well as the indicated tagged G-protein subunits (YFP<sub>1-158</sub>-G $\beta_1$ , YFP<sub>159-238</sub>-G $\gamma_2$  and GFP-G $\gamma_2$ ) and their untagged counterpart (i.e. G $\beta_1$  or G $\gamma_2$ ). For some samples, isoproterenol caused a significant increase in BRET (\* $P < 0.01$  and \*\* $P < 0.005$  between groups as indicated). As a positive control, cells were transfected to express a protein consisting of YFP fused to the C-terminus of RLuc (RLuc-YFP). Transfections were performed as described in the Materials and Methods except that 0.1  $\mu$ g of recombinant plasmid containing the cDNA for AC-RLuc was used per 10 cm<sup>2</sup> tissue culture well. The data represent the mean  $\pm$  s.d. for a representative experiment. (C) HEK 293 cells stably expressing the  $\beta_2$ AR were transiently transfected to co-express G $\alpha_s$ , G $\beta_1$ , GFP-G $\gamma_2$  and AC-RLuc (or CD8-RLuc as a negative control). The amount of plasmid encoding GFP-G $\gamma_2$  varied as represented by the ratio of fluorescence/luminescence whereas that for all the other plasmids was kept constant. Cells were treated (filled symbols) or not (open symbols) with 10  $\mu$ M isoproterenol before assaying BRET. Significant differences were determined by a paired *t*-test for three or more experiments.

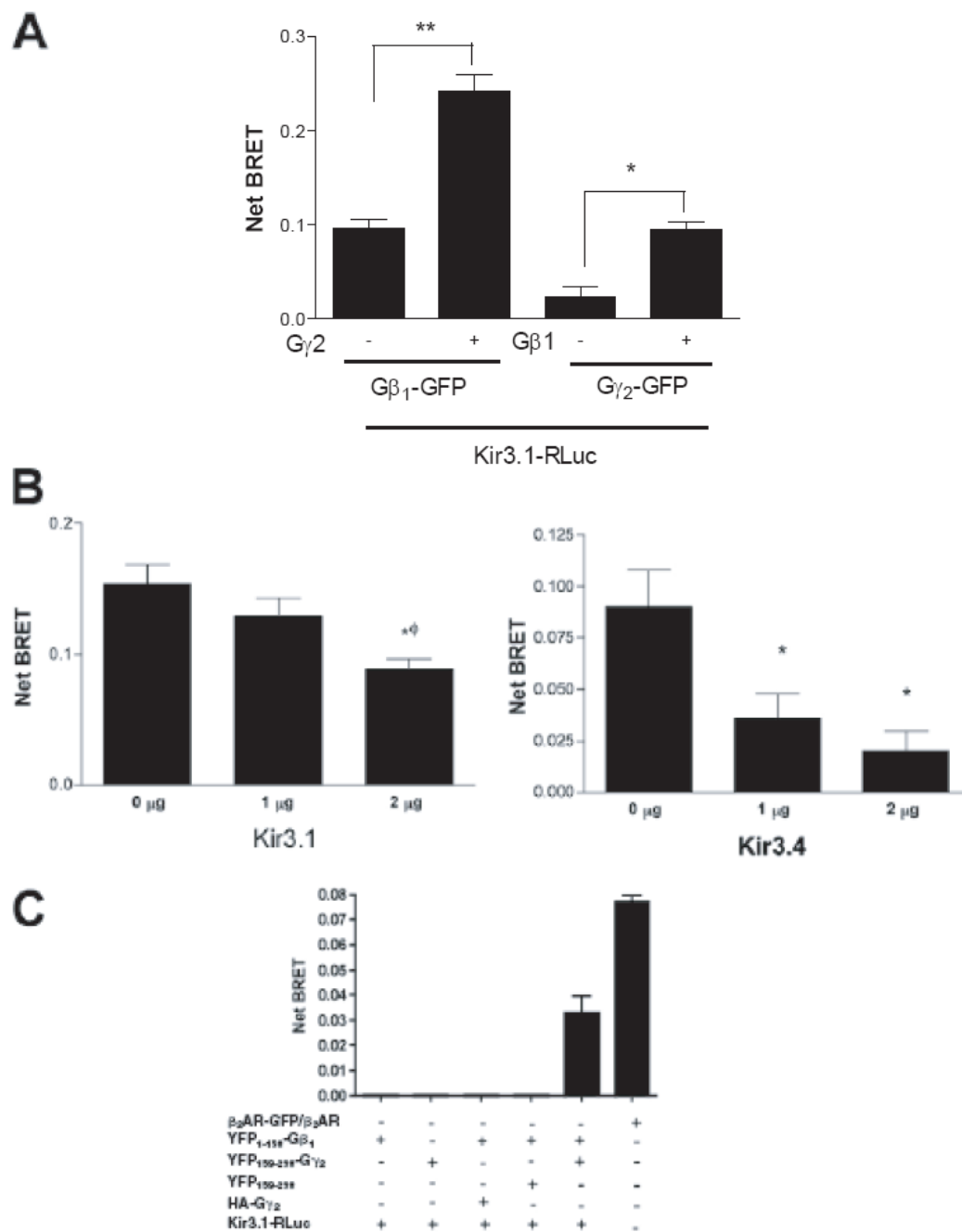


Figure 12 : *BRET between Kir3.1-RLuc and either GFP-Gβ<sub>1</sub>, GFP-Gγ<sub>2</sub> or YFP-Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub>.*

(A) BRET was measured in HEK 293 cells expressing Kir3.1-RLuc and GFP-Gβ<sub>1</sub> in the presence or absence of exogenously expressed Gγ<sub>2</sub> (left) or Kir3.1-RLuc and GFP-Gγ<sub>2</sub> in

the presence or absence of exogenously expressed  $G\beta_1$  (right). (B) BRET was measured in HEK 293 cells co-transfected with plasmids coding for Kir3.1-RLuc, GFP- $G\beta_1$ ,  $G\gamma_2$  and either untagged Kir3.1 (left panel) or untagged Kir3.4 (right panel). Plasmid concentrations for the former three proteins were kept constant while those for the latter two proteins were varied as indicated in the figure (\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.005$  versus no competitor,  $\phi P < 0.05$  versus 1  $\mu\text{g}$  competitor cDNA transfected, respectively, using a paired  $t$ -test for three or more experiments). (C) BiFC/BRET was measured in HEK 293 cells transfected to express Kir3.1-RLuc and the indicated tagged G-protein subunits (YFP<sub>1-158</sub>- $G\beta_1$ , YFP<sub>159-238</sub>- $G\gamma_2$ ) together with their untagged counterparts when the split YFP-bearing partner was expressed alone. Cells co-expressing  $\beta_2\text{AR}$ -GFP and  $\beta_2\text{AR}$ -RLuc or between YFP<sub>1-158</sub>- $G\beta_1$  and YFP<sub>159-238</sub>- $G\gamma_2$  and CD4-RLuc served as positive and negative BRET controls, respectively and the negative controls were subtracted from raw BRET values to yield net BRET. The data represent the mean  $\pm$  s.d. for five experiments. Significant differences over negative controls for  $\beta_2\text{AR}$ -GFP/ $\beta_2\text{AR}$ -RLuc or YFP<sub>1-158</sub>- $G\beta_1$  and YFP<sub>159-238</sub>- $G\gamma_2$ /Kir3.1-RLuc were confirmed by a paired  $t$ -test ( $P < 0.05$ ).

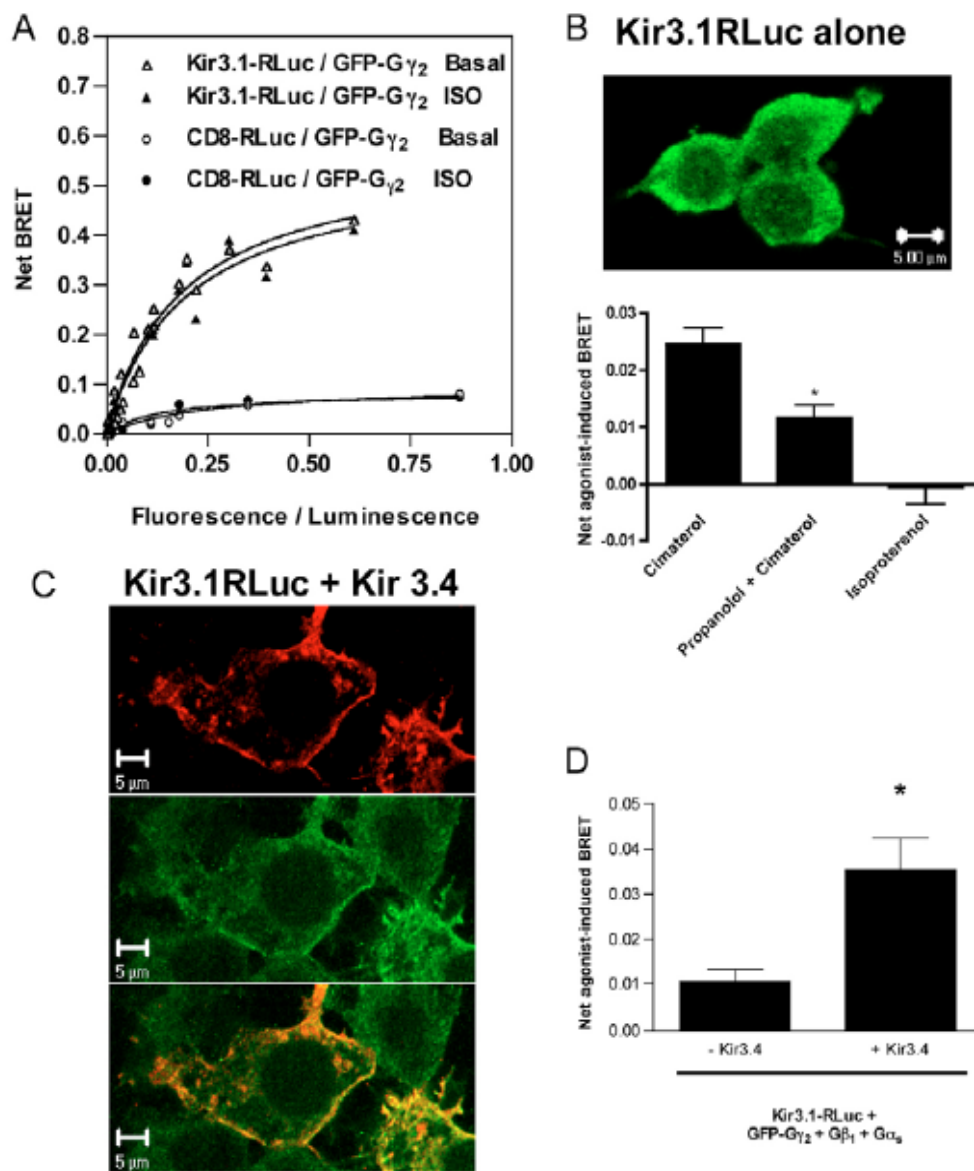


Figure 13 : BRET between GFP-G $\gamma_2$  and Kir3.1 is saturable and sensitive to receptor stimulation before surface targeting.

(A) BRET saturation experiments in the  $\beta_2$ AR stable line co-expressing G $\alpha_s$ , G $\beta_1$ , GFP-G $\gamma_2$  and Kir3.1-RLuc or CD8-RLuc. The amount of plasmid encoding GFP-G $\gamma_2$  varied as represented by the ratio of fluorescence/luminescence whereas that for all the other plasmids was kept constant. Cells were treated (filled symbols) or not (open symbols) with 10  $\mu$ M isoproterenol prior to assaying BRET. (B) Top: representative confocal

image showing that Kir3.1-RLuc (green) has an intracellular distribution. Bottom: BRET experiments were performed using HEK 293 cells stably expressing the  $\beta_2$ AR and transiently co-expressing GFP-G $\beta_1$ , G $\gamma_2$  and Kir3.1-RLuc. BRET was significantly increased ( $P < 0.05$ ) by the membrane-permeable agonist cimaterol but not by the membrane-impermeable agonist isoproterenol. Cimaterol-induced changes were blocked by pretreatment with propranolol. All ligands were used at a concentration of 1  $\mu$ M. (C) Plasma membrane localization of Kir3.1 (green, middle panel) in the presence of co-expressed Flag-tagged Kir3.4 (red, top panel). Co-localization of Kir3.1 and Kir3.4 is demonstrated in the merged image (bottom panel). (D) BRET experiments were performed using the  $\beta_2$ AR stable line co-expressing G $\alpha_s$ , G $\beta_1$ , GFP-G $\gamma_2$  and Kir3.1-RLuc. Net agonist-stimulated BRET (mean  $\pm$  s.d.) was significantly increased by isoproterenol (1  $\mu$ M) if the cells co-expressed Kir3.4. Significant differences ( $*P < 0.05$ ) were determined by a paired  $t$ -test for three or more experiments in B and D.

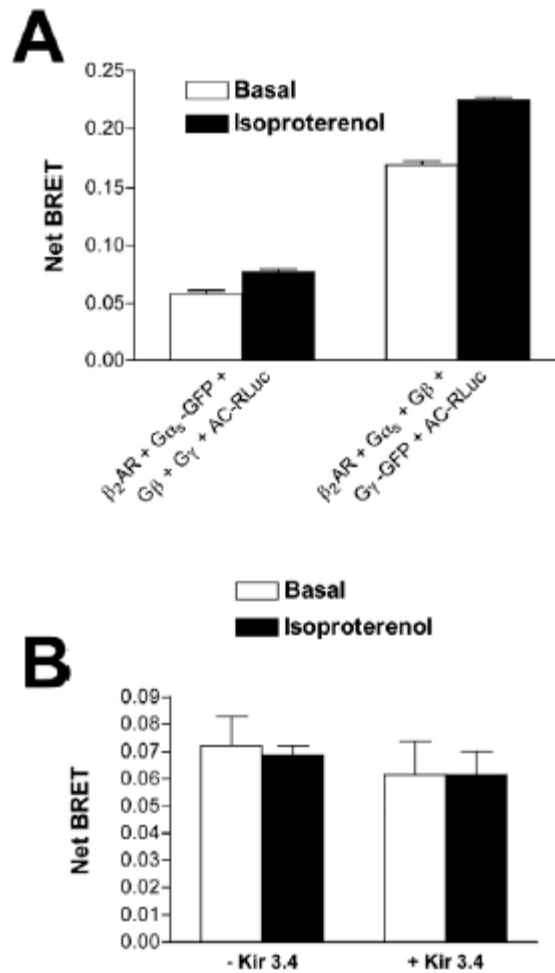


Figure 14: *BRET between tagged effectors and Ga subunits is agonist-independent.*

HEK 293 cells were transfected to express the indicated proteins and were stimulated or not with 1  $\mu$ M isoproterenol. (A) BRET was observed in cells co-expressing AC-RLuc and  $G_{\alpha_s}$ -GFP though it was not affected by agonist stimulation, and was comparatively less than BRET between AC-RLuc and GFP- $G_{\gamma_2}$ . (B) BRET was also observed in cells stably expressing the  $\beta_2$ AR and co-expressing  $G_{\alpha_i}$ -RLuc,  $G_{\beta_1}$ ,  $G_{\gamma_2}$  and Kir3.1-GFP. BRET was not affected by agonist regardless of whether or not Kir3.4 was co-expressed. The data represent the mean  $\pm$  s.d. for at least three experiments.

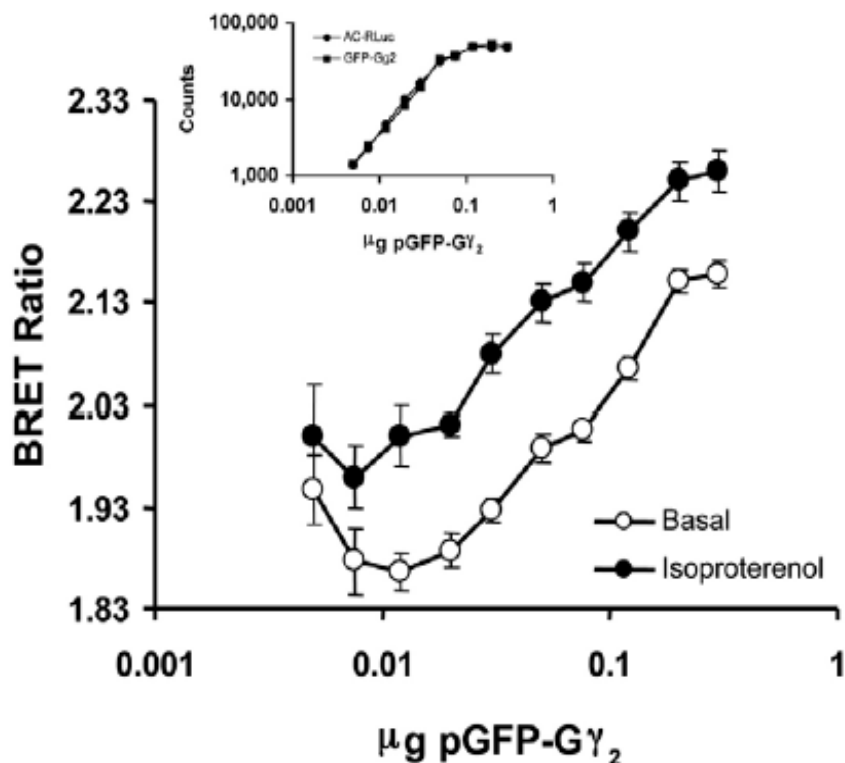


Figure 15 : *The effects of varying protein expression levels on BRET between AC-RLuc and GFP-G $\gamma_2$ .*

HEK 293 cells were transfected with recombinant plasmids to express  $\beta_2\text{AR}$ ,  $\text{G}\alpha_s$  and  $\text{G}\beta_1$ , GFP-G $\gamma_2$  and AC-RLuc as described in the Materials and Methods so that the ratio of expressed GFP-G $\gamma_2$  to AC-RLuc remained constant whereas the amounts of these proteins varied over nearly two orders of magnitude (inset). Cells were left untreated (basal) or were exposed to 1  $\mu\text{M}$  isoproterenol before assaying BRET in the presence of 5  $\mu\text{M}$  coelenterazine H using 480 and 450-458 nm filters.

TABLE II : Co-immunoprecipitation of RLuc-tagged effectors with GFP-G $\gamma_2$ 

Expressed Proteins	% of RLuc Ppt.
GFP-G $\gamma_2$ + Kir3.1-RLuc	3.4 $\pm$ 1.2
M <sub>2</sub> R + G $\alpha_{i2}$ + G $\beta_1$ + GFP-G $\gamma_2$ + Kir3.1-RLuc + Kir3.4	8.0 $\pm$ 4.1
$\beta_2$ AR + G $\alpha_s$ + G $\beta_1$ + GFP-G $\gamma_2$ + AC-RLuc	4.5 $\pm$ 0.6
$\beta_2$ AR + G $\alpha_s$ + RLuc-G $\beta_1$ + GFP-G $\gamma_2$ + AC	54 $\pm$ 18

HEK 293 cells were transfected as indicated. GFP in the detergent soluble material from these cells was precipitated with anti-GFP antibodies. To control for non-specific immunoprecipitation, RLuc- and GFP-tagged proteins were expressed in separate cell populations that were combined prior to detergent solubilization and immunoprecipitation. The wild type protein was substituted for the missing fusion protein in each of these populations. The amount of precipitated RLuc activity was compared with the RLuc activity remaining in solution to determine the percent of RLuc activity that was precipitated, and values obtained for non-specific immunoprecipitation were subtracted from the appropriate experimental sample to determine what percent of the RLuc activity was specifically precipitated. The data represent the mean  $\pm$  S.D. for four (RLuc-G $\beta_1$ ) or five (Kir3.1-RLuc and AC-RLuc) independent experiments. Similar results (1.9  $\pm$  0.7% of total RLuc precipitated) were obtained when GFP-G $\alpha_s$  was immunoprecipitated and associated AC-RLuc was detected by measuring luciferase activity in cells expressing  $\beta_2$ AR, GFP-G $\alpha_s$ , G $\beta_1$ , G $\gamma_2$  and AC-RLuc. This was above the background from cells expressing  $\beta_2$ AR, soluble GFP, G $\beta_1$ , G $\gamma_2$  and AC-RLuc.



## **Chapitre 3**

### **Intracellular trafficking and assembly of specific Kir3 channel/G protein complexes**

Mélanie Robitaille , Nitya Ramakrishnan, Alessandra Baragli, and Terence E. Hébert

Cellular Signalling (2009) 21 : 488-501

## Abstract

We have previously demonstrated that Kir3.1 channels and G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 subunits initially interact in the endoplasmic reticulum (ER). To elucidate the role that anterograde protein trafficking pathways may play in the formation of these complexes, we used dominant negative (DN) mutants of the small G proteins Sar 1 and various compartment-specific Rabs which impede anterograde protein trafficking at different steps. Sar 1 H79G and Rab 1 S25N mutants efficiently blocked the plasma membrane trafficking of the Kir3.1/Kir3.4 complex however they did not block the G $\beta$ 1 $\gamma$ 2/Kir3.1 interaction as measured using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). This interaction was also insensitive to the presence of DN Rabs 2, 6, 8, and 11. These results confirm that G $\beta$  $\gamma$ /Kir3 complexes form early during channel biosynthesis and trafficking. Using a combination of BRET, protein complementation assays and co-immunoprecipitation, we demonstrate that G $\beta$ 1-4 can interact with Kir3.1 in the absence of Kir3.4. G $\beta$ 5 does not directly interact with the channel but can still be co-immunoprecipitated as part of a larger complex. The interaction between G $\beta$  and Kir3.1 was selectively fostered by co-expression with different G $\gamma$  subunits. When G $\gamma$ 1 or G $\gamma$ 11 was co-expressed with eGFP-G $\beta$ 3 or eGFP-G $\beta$ 4, the interaction with the effector was lost. Kir3.2 was capable of interacting with G $\beta$ 1-3 and not G $\beta$ 4 or G $\beta$ 5. These interactions were again fostered by co-expression with G $\gamma$  and were also insensitive to DN Sar 1 or Rab 1. Taken together, our data show that these “precocious” channel/G protein interactions are specific and may have implications beyond their basic function in signalling events.

## Introduction

The classical paradigm for G protein activation of effectors (at least in the mammalian visual system) involves free diffusion of the relevant proteins at the plasma membrane. In humans, there are at least 20 different G $\alpha$  subunits, 5 G $\beta$  subunits, 13 G $\gamma$  subunits, multiple effectors and associated proteins and several hundred 7 transmembrane domain-containing receptors (7TM-Rs). Considering the fact that some 7TM-R effectors such as ion channels can be fully activated within 1 second following addition of an agonist [1, 2], this model encounters difficulties in accounting for the specificity and the rapidity of G protein signalling in other tissues (see [3] for review). A number of studies have demonstrated the existence of stable interactions, independent of receptor activation between the receptor and G protein [4, 5], G protein and the effector [6] and even between the receptor and the effector [7, 8]. If the signalling partners interact before receptor activation, the question of where these proteins initially interact together becomes critical. Recent studies have shown that many of these proteins interact initially in the endoplasmic reticulum (ER), including receptor equivalents in receptor dimers [9], receptor and G $\beta\gamma$  subunits [10] and effectors such as Kir3 channels and adenylyl cyclase with nascent G $\beta\gamma$  [6, 11, 12]. If these complexes are pre-formed during protein biosynthesis and maturation, they would need to be trafficked inside the cells as a complex and not necessarily as individual proteins.

The Kir3 family of inwardly rectifying potassium channels was among the first effectors demonstrated to be directly modulated by G $\beta\gamma$  [13]. To date, little specificity has been shown for the different G $\beta\gamma$  subunits with respect to Kir3 channel modulation *in vitro*, with the exception that combinations containing G $\gamma$ 1 (found in the mammalian visual system) show reduced efficacy [14]. A recent study has demonstrated both constitutive and agonist-induced interactions between Kir3 channels and various G $\beta\gamma$

combinations in living cells using fluorescence resonance energy transfer (FRET) and total internal reflectance fluorescence (TIRF) microscopy [15]. Direct activation of Kir3 channels by G $\beta\gamma$  is therefore mostly independent of the subunit composition of the heterodimer with the exception of G $\beta$ 5 and G $\gamma$ 1 [14, 15]. This is also generally true for other G $\beta\gamma$  effectors such as adenylyl cyclase [16] although there are exceptions. For example, P-Rex1 is a GEF for Rac which is activated by combinations of G $\beta$ 1-4 but not G $\beta$ 5 and these interactions have differing affinities depending on the G $\gamma$  isoform present [17]. However, most of these studies have focused naturally on interactions important for G $\beta\gamma$ -dependent signalling events. Here, we focus on specificity in *precocious* (i.e. agonist-independent) interactions between Kir3.1 or Kir3.2 channel subunits or adenylyl cyclase II (ACII) with different G $\beta\gamma$  combinations. Recently, the development of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) approaches has allowed us to study the different types of interactions important in GPCR signalling systems in living cells [18, 19]. We are now also able to link these interactions to particular trafficking steps in the anterograde trafficking of these complexes. We show here that although the trafficking of Kir3 channels is sensitive to dominant negative Sar 1 and Rab 1 GTPases, interactions between the channel and G $\beta\gamma$  are not, confirming our previous observations that Kir3.1 and Kir3.2 subunits and G $\beta\gamma$  initially interact in the ER.

## Materials and Methods

### Constructs

Constructs encoding Kir3.1-RLuc, Kir3.2-RLuc, CD4-RLuc, eGFP-tagged G $\beta$ 1-5, AC2-RLuc,  $\beta$ <sub>2</sub>AR-RLuc,  $\beta$ <sub>2</sub>AR-GFP10, Kir3.4, YFP (1-158)-G $\beta$ 1, YFP (158-239)-G $\gamma$ 1, YFP (158-239)-G $\gamma$ 2, YFP (158-239)-G $\gamma$ 3, YFP (158-239)-G $\gamma$ 7, YFP (158-239)-G $\gamma$ 11, GFP10-G $\gamma$ 2, soluble  $\beta$ ARK-CT, WT and DN Sar 1 and Rab constructs were used as previously described [6, 10, 11, 12, 20, 21]. Flag-G $\beta$ 1-5, HA-G $\gamma$ 1, HA-G $\gamma$ 2, HA-G $\gamma$ 3, HA-G $\gamma$ 7, and HA-G $\gamma$ 11 were obtained from UMR cDNA Resource Center ([www.cdna.org](http://www.cdna.org)). An extracellularly tagged Flag-Kir3.1 [22] construct was a generous gift from Dr. Deborah J. Nelson (University of Chicago, Chicago, Illinois). GFP10-tagged G $\beta$ 1, G $\alpha$ i constructs [23], CD8-RLuc and CD8-tagged  $\beta$ ARK-CT were obtained from Dr. Michel Bouvier (Université de Montréal). A vector encoding G $\beta$ 1I18E [24] was a generous gift of Dr. W.F. Simonds (NIH, Bethesda, MD). G $\beta$ 1I18E was also engineered into the Flag-G $\beta$ 1 vector using the Quikchange system (Stratagene).

### Cell culture and transfection

HEK 293 cells stably transfected with HA- $\beta$ <sub>2</sub>AR were grown in DMEM high glucose (Hyclone) with 5% fetal bovine serum (Hyclone). Cells were plated in 6 well plates at a density of  $3 \times 10^5$  cells/well and transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per manufacturer's recommendations or PEI (polyethylenimine; Polyscience). PEI (1mg/ml stock) was used at 1:3 ratio with DNA.

## **BRET and BiFC**

BRET and BiFC experiments were conducted as previously described [6, 10, 12, 20]. Briefly, forty-eight hours after transfection with RLuc- and GFP10-, eGFP- or YFP-tagged fusion protein-containing vectors, cells were washed twice with PBS, resuspended in PBS + (0.1 % glucose, 1x protease inhibitor) and distributed into 96 well microplates (white Optiplate; PerkinElmer Life and Analytical Sciences). BRET2 was performed using coelenterazine 400a (Cedarlane) at a final concentration of 5  $\mu$ M. Signals were collected on a Packard Fusion instrument (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) using either a 410/80-nm filter (luciferase) or a 515/30-nm filter (GFP10). BRET1 was performed using Coelenterazine H (Molecular Probes) at a final concentration of 5  $\mu$ M. Signals were collected using a 450/58 filter (Luciferase) and a 480/100 filter (EGFP). In some cases, the negative controls as described in the text were subtracted off and the data was presented as net BRET. BiFC signals were collected using a 485/10 filter (excitation) and 535/25 filter (emission).

## **Confocal microscopy**

The day after transfection, cells were seeded on glass cover slips treated with 10  $\mu$ g/ml laminin (Sigma). Twenty-four hours after seeding, cells were incubated with anti-Flag polyclonal antibody (Sigma) diluted 1:200 in DMEM and incubated 60 minutes at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for non-permeabilized cells. In cases where the cells were permeabilized, they were washed twice with PBS1X (pH 7.3), fixed with 2 % paraformaldehyde for 20 minutes followed by three washes of PBS1X. Cells were blocked and permeabilized 60 minutes at room temperature with 2% normal goat serum (Jackson Immuno Research Laboratories INC) and 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS1X. Permeabilized cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against  $\beta$ ARKct (Santa Cruz), VSVG (Covance), RLuc (Chemicon International) or c-myc (Covance) diluted 1:200 in PBS1X containing 1% normal goat serum and 0.04% Triton X-100. Following the incubation, cells were washed three times with PBS1X and

incubated 45 minutes at room temperature with goat anti-mouse or rabbit secondary antibody conjugated with Alexa fluor 488, 555 or 687 (Molecular Probes) which was diluted 1:600 in 1% normal goat serum and 0.04% Triton in PBS1X. Cells were washed three times, fixed on microscope slides and examined on an inverted laser-scanning microscope (LCM 510; Zeiss) as described previously [6, 10, 12, 20].

### **Detection of Kir3.1 channels at the cell surface**

48 hours post-transfection, cells were washed twice with PBS1X, harvested in 400  $\mu$ l of PBS1X + 0.1% glucose and incubated 60 minutes at room temperature with rabbit anti-Flag polyclonal antibody (Sigma) diluted 1:200. Cells were washed three times with PBS1X by centrifugation for 3 minutes at 500  $\times$  g. Cells were incubated 60 minutes at room temperature in 500  $\mu$ l of PBS1X + 0.1% Glucose with goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) at a dilution of 1:500. Cells were washed again three times with PBS1X by centrifugation for 3 minutes at 500  $\times$  g. Cells were resuspended in 100  $\mu$ l PBS1x + 0.1% glucose and distributed into 96 well microplates (white Optiplate; PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Fluorescence signals were collected on a Packard Fusion instrument (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) with an excitation filter of 475/20 nm and an emission filter 515/35 nm.

### **Immunoprecipitation/Western Blotting**

48 hours after transfection, cells were washed three times with PBS1X and harvested in lysis buffer (150 mM NaCl, 5mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% Triton, 2mM PMSF, 5 $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml benzamidine and 5 $\mu$ l/ml trypsin inhibitor). Cells were incubated for 3 hours on ice and vortexed at low speed occasionally. Non-solubilized material was removed by centrifugation at 10 000  $\times$  g for 10 minutes at 4°C. 0.01g/sample of Protein A-Sepharose (Sigma) was resuspended in lysis buffer for 30 minutes at 4°C with gentle shaking before use. To preclear the samples, 500  $\mu$ g of cell lysate was incubated with shaking with the Protein A-Sepharose

for 30 minutes at 4°C. Beads were spun down and the supernatant was incubated 1 hour at 4°C with 3 µl of anti-Flag polyclonal (Sigma) or anti-HA monoclonal antibodies (Covance). 0.01g of resuspended Protein A-Sepharose beads were added to the mixture and incubated with shaking at 4°C overnight. Lysates were washed 5 times by centrifugation and beads were resuspended in SDS-PAGE sample buffer. Following electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and detected with anti-Flag polyclonal (Sigma, 1:1000), anti-HA monoclonal (Covance, 1:1000), anti-VSVG polyclonal (Covance, 1:1000) or anti-Gβ polyclonal (Santa Cruz, 1:3000) antibodies. HRP-conjugated secondary antibodies were from Sigma (anti-mouse or anti-rabbit, 1:20 000).



## Results

### **Kir3.1/3.4 trafficking to the cell surface.**

To be transported to the cell surface, the Kir3.1 subunit must be assembled with either Kir3.2 or Kir3.4 subunits, as it lacks an ER export signal [25]. The use of dominant negative forms of the Sar 1 and Rab GTPases is now a common way to modulate trafficking itineraries of proteins during their maturation and subsequent insertion into the plasma membrane. These small GTPases regulate multiple anterograde protein trafficking events including the budding of transport vesicles from donor compartments and the fusion of vesicles to target membranes. To more fully delineate the Kir3.1 trafficking pathway, we used an extracellularly Flag-tagged Kir3.1 subunit co-expressed with WT or dominant-negative (DN) forms of the Sar 1 and Rab GTPases. Each step of the exocytotic pathway is regulated to a certain extent by specific GTPases, i.e. ER to Golgi transport is regulated by Sar1, Rab 1 and Rab 2, intra-Golgi trafficking is under the partial control of Rab6, whereas the route from the trans-Golgi to the plasma membrane can be modulated by Rab 8 and Rab 11 (reviewed in [26 , 27]). However, it should be stressed that these pathways overlap and can sometimes complement one another.

In non-permeabilized cells, Kir3.1-Flag can only be detected at the plasma membrane when the Kir3.4 subunit was also present (compare Figure 16 A and B). The expression of either DN Sar 1 H79G or Rab 1 S25N which decrease ER-Golgi trafficking efficiently blocked Kir3.1 surface expression as shown by the absence of surface-labelled channels even in the presence of Kir3.4 (Figure 17 B,D). DN Rab 1 or Sar 1 did not simply reduce expression of Kir3.1 channels as these could still be detected inside the cell after permeabilization (Figure 18). The effect of DN Sar 1 was also confirmed using a direct measure of cell surface channel density (Figure 17 E). However, DN versions of Rabs 2, 6, 8 or 11 had no effect on the trafficking of Kir3.1/3.4 (Figure 19) even though these same constructs reduced cell surface

expression of the  $\beta_2$ AR [10]. Consistent expression levels of the Sar 1 and Rab proteins were confirmed by confocal imaging with antibodies for the specific epitopes (Flag, c-myc or vsv-g) that individual clones were labelled with (Figure 28 (Supplementary)), also see (Figure 20D). In order to ensure that the loss of Kir3.1 membrane localization was not simply caused by interference with Kir3.1/Kir3.4 assembly, tagged channels were co-immunoprecipitated in the presence of WT or DN versions of Sar 1 (Figure 20). Flag-tagged Kir3.4 could still be pulled down with HA-tagged Kir3.1 regardless of whether WT or DN Sar 1 was co-expressed.

We next wished to assess whether modulating the trafficking of the Kir3.1/3.4 complex altered the ability of these channels to interact with G proteins in the ER. We have previously demonstrated that G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 interacted with Kir3.1 in the ER before it is targeted to the cell surface by either Kir3.2 or Kir3.4 [6]. BRET can be used to directly monitor protein/protein interactions in living cells (see [18] and [19] for review) and was used here to study the interaction between Kir3.1 tagged with Renilla luciferase and various combinations of the G $\beta\gamma$  dimer (see below) tagged with GFP10. None of the DN Sar 1 or Rabs affected the BRET ratio between the Kir3.1-RLuc and the GFP10-G $\gamma$ 2 (co-expressed with G $\beta$ 1) in the absence (Figure 29 A (Supplementary)) or presence of Kir3.4 (Figure 29 B (Supplementary)). This confirms an early or “precocious” complex formation between the channel and the G protein in the ER even when trafficking of the channel is blocked.

### **Kir3.1 channel interactions with specific combinations of G $\beta\gamma$**

We next wished to examine the G protein specificity of this “precocious” interaction. BRET was observed in cells expressing Kir3.1-RLuc and eGFP-G $\beta$ 1, eGFP-G $\beta$ 3 or eGFP-G $\beta$ 4 but not in cells expressing eGFP-G $\beta$ 2 or eGFP-G $\beta$ 5 (Figure 21A). The presence of the G $\gamma$ 2 subunit was required to obtain a BRET ratio significantly different than the negative control. A positive control used for BRET experiments was

$\beta_2$ ARhomodimerization [9] and [28] while the negative controls included CD4 tagged with GFP or Rluc as required. To ensure that the absence of BRET between the Kir3.1-RLuc and eGFP-G $\beta$ 2 or eGFP-G $\beta$ 5 was not simply due to variations in tagged G $\beta$  expression, GFP fluorescence was measured and we confirmed that the five eGFP-G $\beta$  subunits were expressed at similar levels (Figure 21B). Interestingly, a similar G $\beta$  subunit specificity was seen with another G protein effector tagged with Rluc, ACII (Figure 21C). ACII-RLuc, in the presence of the G $\gamma$ 2 subunit, interacted with eGFP-G $\beta$ 1, eGFP-G $\beta$ 3 and eGFP-G $\beta$ 4 but not with eGFP-G $\beta$ 2 or eGFP-G $\beta$ 5. The result with G $\beta$ 2 was somewhat surprising so we verified that the interaction did not occur using a number of other techniques. First, we verified the functionality of the G $\beta$ 2 $\gamma$ 2 pair in different constructs. We noted that G $\beta$ 2 $\gamma$ 2 tagged either for immunoprecipitation, BiFC or BRET were indeed functional but that eGFP-G $\beta$ 2 could not interact with another BRET partner, Rluc-G $\gamma$ 2 indicating that it does not constitute a useful BRET acceptor despite being functional (data not shown). We therefore did not use this construct in any subsequent experiments. To further analyze the specificity of the channel/G $\beta$  $\gamma$  interaction, we performed BRET2 competition experiments using the GFP10-G $\beta$ 1/Kir3.1-RLuc with increasing concentrations of the different Flag-tagged G $\beta$  subunits (Figure 22A). Both G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 effectively inhibited the interaction between Kir3.1 and G $\beta$ 1. Interestingly, using a mutation in G $\beta$ 1I18E that reduces its affinity for G $\gamma$  [24] also reduces the ability of G $\beta$ 1 to compete the GFP10-G $\beta$ 1/Kir3.1-RLuc interaction (Figure 23). G $\beta$ 3 and G $\beta$ 4 inhibited to a lesser extent and with a lower apparent affinity (0.01 and 0.03 for G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 compared with 3.65 and 3.05 for G $\beta$ 3 and G $\beta$ 4, respectively) – although the curves for G $\beta$ 3 and G $\beta$ 4 did not reach saturation. G $\beta$ 5 again was not able to interact with Kir3.1. Similar levels of expression were seen for G $\beta$ 1-3 and G $\beta$ 5 although levels of G $\beta$ 4 were reduced (see Figure 22 A inset). Thus at least for G $\beta$ 3, we can conclude that it has a markedly lower affinity for Kir3.1 than G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2. To explore the G $\beta$ 4/Kir3.1 interaction directly, we also performed BRET saturation experiments for the interactions between eGFP-G $\beta$ 1 or eGFP-G $\beta$ 4 and Kir3.1-RLuc. As can be seen in Figure 22 B, the affinity of G $\beta$ 1 for the channel is again higher than that of G $\beta$ 4 (compare 0.14 versus 0.4 in BRET50). We show in the inset that the

levels of expression of eGFP-tagged G $\beta$ 1 and G $\beta$ 4 subunits were similar at the various points in the BRET titration curve. Thus, our data indicate that the channel interacts with G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 with higher affinity than other G $\beta$ -containing G $\beta$  $\gamma$ 2 combinations.

To confirm that other Kir3 channel subunits could also interact in a precocious manner with G $\beta$  $\gamma$  subunits, we performed a similar series of studies using Kir3.2. The interaction between Kir3.2-RLuc and GFP10-G $\gamma$ 2 was measured using BRET. As can be seen in Fig. 9A, the BRET ratio was again increased by co-expression of G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 but not with G $\beta$ 3, G $\beta$ 4 or G $\beta$ 5. G $\beta$ 1, G $\beta$ 2 and G $\beta$ 5 subunits were all expressed at similar levels in these experiments although as before there was some variability in G $\beta$ 3 and G $\beta$ 4 expression (Figure 24 A, inset). Further, neither DN Sar1 (Figure 24A) or DN Rab1 (Figure 24B) affected the BRET between the channel and G $\beta$  $\gamma$ . Curiously, confocal imaging experiments showed that DN Sar 1 and Rab1 had marginal effects on the distribution of Kir3.2 (Figure 30 (Supplementary)) and even though Kir3.2 does traffic to the cell membrane, a great deal is retained intracellularly, similar to what was shown in other studies of Kir3.2 trafficking [25]. It is clear that both Kir3.1 and Kir3.2 interact with G $\beta$  $\gamma$  subunits before they are trafficked to the cell surface.

We wanted next to assess whether substituting other G $\gamma$  subunits for G $\gamma$ 2 would alter BRET between the different G $\beta$  subunits and Kir3.1-RLuc. BRET experiments between eGFP-tagged G $\beta$  subunits and Kir3.1-RLuc were conducted using G $\gamma$ 1, G $\gamma$ 2, G $\gamma$ 3, G $\gamma$ 7 and G $\gamma$ 11. As can be seen in Figure 25A, the presence of different G $\gamma$  isoforms modified the interaction with the channel and eGFP-G $\beta$ 1, eGFP-G $\beta$ 3 and eGFP-G $\beta$ 4. G $\beta$  $\gamma$  dimers composed of eGFP-G $\beta$ 3 and eGFP-G $\beta$ 4 with G $\gamma$ 1 or G $\gamma$ 11 lose their capacity to interact with Kir3.1-RLuc in the ER. We show that when comparing each G $\beta$  subunit in combination with the 5 G $\gamma$  subunits, expression of G $\gamma$  did alter expression of either the individual G $\beta$  subunits or Kir3.1-RLuc (Figure 31 A,B (Supplementary)). Experiments demonstrating that HA-tagged G $\gamma$  subunits are

expressed at similar levels in HEK 293 cells by confocal microscopy are shown in (Supplementary). To determine if the specificity observed in the interaction between the Kir3.1-RLuc and specific G $\beta\gamma$  subunits was caused by the inability of a particular dimer to form in vivo, we used a protein complementation assay (PCA). G $\beta$ 1 subunits were fused to the 158 first amino acids of YFP and G $\gamma$ 1,2,3,7,11 subunits were fused to the last 79 amino acids of YFP (as originally described in [29]). All the G $\beta\gamma$  combinations tested were able to form as measured using BiFC but with different magnitudes (Figure 25B). Combining PCA and BRET allowed us to determine independently whether Kir3.1-RLuc could interact with G $\beta$ 1 $\gamma$ x. Unfortunately, the PCA between other G $\beta$ -containing combinations resulted in fluorescence that was too low to allow PCA/BRET experiments. As for the standard BRET assay, we could detect interactions between Kir3.1-RLuc and the different reconstituted G $\beta$ 1 $\gamma$ 1,2,3,7 and 11 combinations (Figure 25C).

To provide independent verification that Kir3.1 could interact with multiple G $\beta\gamma$  isoforms, we also used co-immunoprecipitation. We were able to detect an interaction between Kir3.1 and all five G $\beta\gamma$ 2 combinations where the G $\beta$  subunit was precipitated and blots were probed for HA-tagged Kir3.1 (Figure 26). This suggests that although G $\beta$ 5 does not interact directly with Kir3 channels, as measured by BRET, it can still be part of larger multiprotein complexes which include the channel.

### **$\beta$ ARKct modulates precocious Kir3.1-G $\beta\gamma$ interactions**

As the interaction between G $\beta\gamma$  and Kir3.1-RLuc was insensitive to DN Sar1 or the various DN Rabs, we next tried to determine if known G $\beta\gamma$  scavengers could modulate the precocious interaction. The C-terminus of GRK2 ( $\beta$ ARKct) contains a G $\beta\gamma$  binding region that can be used to sequester G $\beta\gamma$ .  $\beta$ ARKct is a soluble cytoplasmic protein (Figure 27A) and in order to localize it to membranes,  $\beta$ ARKct was fused to the transmembrane domain of CD8 (Figure 27B). The effect of soluble or membrane-

localized  $\beta$ ARKct on the precocious Kir3.1-G $\beta\gamma$  interaction (i.e. in the absence of Kir3.4) was assessed by BRET. BRET saturation curves showed that only membrane-localized  $\beta$ ARKct interferes with the precocious interaction (Figure 27C). Experiments were performed in cells expressing constant levels of Kir3.1-RLuc and G $\beta$ 1 and increasing amounts of GFP10-G $\gamma$ 2. When Kir3.4 was co-expressed with Kir3.1, the interaction became sensitive to both forms of  $\beta$ ARKct (Figure 27C) indicating that once the initial interacting partners pass a trafficking checkpoint, soluble  $\beta$ ARKct can compete with Kir3 channels for G $\beta\gamma$ . Taken together, our data indicate that a functional specificity exists in the formation of Kir3/G $\beta\gamma$  complexes in the ER which depends on the channel isoform present and particular combinations of G $\beta\gamma$ .

## Discussion

We have demonstrated that cell surface expression of Kir3.1 channels depends on Rab 1- and Sar 1-dependent anterograde protein trafficking. We confirm that channel assembly per se was not affected as even though trafficking was blocked, Kir3.1 and Kir3.4 still become associated as demonstrated using co-immunoprecipitation (Figure 20). We and others [10], [30] and [31] have previously demonstrated that the  $\beta_2$ AR also uses these pathways. Curiously, after exit from the ER, the receptor uses a pathway that is also dependent on Rabs 6, 8 and 11 [10] which do not seem to be required for trafficking of Kir3.1/Kir3.4 heterotetramers (Figure 19). An alternative Rab2-dependent pathway is not used by the receptor or channel for ER-Golgi trafficking. These observations either imply that receptor and effector complexes traffic separately to the plasma membrane or that when co-expressed, a subset of these proteins form complexes that are trafficked together. We have shown that this is the case for receptor/G protein complexes and have also demonstrated that the initial site of contact between several different receptors and effectors is in the ER [8] and [11] indicating that the latter situation is more likely. In the absence of the  $\beta_2$ AR, the channel may use other anterograde pathways dependent on Rab 14 and/or Rab 22 for post-Golgi sorting (see [26] for review).

### Specificity of G $\beta$ subunits for Kir3.1.

In this study, we follow up our previous observations that G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 subunits can interact with receptors [10] and [11] and effectors [6] and [12] in the ER and that these complexes are subsequently trafficked to the cell surface. As discussed above, formation of the Kir3.1/Kir3.4 heterotetramer was not affected by DN Rab1 or Sar 1 and not surprisingly, the presence of Kir3.4 did not alter Kir3.1/G $\beta$  $\gamma$  interactions in the presence of WT or DN Sar 1 or Rab isoforms (Figure 29 (Supplementary)). Here, we examined the specificity of several different combinations of G $\beta$  $\gamma$  subunits for two Kir3 channel isoforms with respect to these precocious interactions. Kir3.1 must associate with Kir3.2

or Kir3.4 in order to reach the cell surface [25] (see Figure 16), and thus offers an excellent model for studying precocious G protein and receptor interactions. We demonstrate that G $\beta$ 1- and G $\beta$ 2-containing G $\beta\gamma$  subunits preferentially associate with Kir3.1 (Figure 22) although G $\beta$ 3 $\gamma$ 2 and G $\beta$ 4 $\gamma$ 2 had reduced affinities for the channel. Interestingly, G $\beta$ 5 $\gamma$ 2 could not interact with Kir3.1-Rluc as measured using BRET. However, we could detect G $\beta$ 5 in larger complexes containing the channel using co-immunoprecipitation suggesting that it may participate in its regulation indirectly. A number of recent studies have demonstrated that Kir3 channels may be part of a large signalling web that integrates inputs from multiple GPCR signalling systems [32], [33], [34] and [35]. An elegant study has also shown that FRET between G $\beta$ 5-YFP and Kir3.1-CFP was very low under basal conditions, but increased in response to agonist treatment [15]. Further experiments would also determine if replacing G $\gamma$  with G $\gamma$ -like RGS proteins [36] and [37] might favour a more direct interaction. Preliminary data suggests that RGS7 does not reconstitute the BRET interaction (data not shown).

Our experiments also highlight the need to use multiple techniques to demonstrate and confirm these interactions, as BRET could not detect interactions between eGFP-G $\beta$ 2 and either Kir3.1-Rluc or ACII-Rluc. However, the eGFP-G $\beta$ 2 construct we used was in fact functional demonstrating that even proteins with very similar structures (comparing for example eGFP-G $\beta$ 1 and eGFP-G $\beta$ 2) may result in GFP adjuncts which cannot be used as BRET acceptors. To circumvent this difficulty we used BRET competition and these experiments confirmed that G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 had similar affinities for Kir3.1. In contrast, differences in the expression levels of competitors made experiments with G $\beta$ 4 difficult to interpret but since eGFP- $\beta$ 4 was a good BRET partner, we could demonstrate that it was capable of interacting with Kir3.1 but with a reduced affinity compared to G $\beta$ 1.

### **The role of G $\gamma$ subunits in G $\beta\gamma$ /effector specificity.**

Kir3 channel/G $\beta\gamma$  interactions, although dependent on G $\gamma$  (Figure 21, Figure 31 Supplementary) [6]) do not discriminate between different G $\gamma$  subunits at least as far as



G $\beta$ 1/Kir3.1 interactions are concerned (Figure 25). This latter observation was confirmed using standard BRET assays as well as combined BiFC/BRET assays which required assembly of specific G $\beta\gamma$  pairs to form the BRET acceptor. G $\beta$ 3 $\gamma$ 1, G $\beta$ 3 $\gamma$ 11, G $\beta$ 4 $\gamma$ 1 and G $\beta$ 4 $\gamma$ 11 pairs did not seem to interact with the channel but this may have been due to their reduced affinity for the channel. A similar reduction in affinities for G $\gamma$ 11-containing G $\beta\gamma$  subunits was also noted for other effectors such as P-Rex1 [17], phospholipase-C $\beta$  [38] and PI-3 kinase [39]. G $\gamma$ 11-containing G $\beta\gamma$  subunits also showed differences in their abilities to interact with receptors [38]. Interestingly G $\beta$ 3 $\gamma$ 11 and G $\beta$ 4 $\gamma$ 11 were both shown to increase Kir3.1/Kir3.4 currents [40] suggesting a functional distinction between the precocious interactions detected here and those that are directly involved in signalling events. Further experiments are required to determine the affinities of G $\gamma$  subunits under conditions where G $\beta$  is varied. These experiments would also be easier to interpret in the context of siRNA-based knockdown of the relevant endogenous subunits as well. The role that G $\alpha$  subunits might play in facilitating G $\beta\gamma$  interactions with Kir3 channels or in determining receptor signalling specificity cannot be underestimated. Numerous studies have demonstrated that the G protein heterotrimer can interact with the channel [41] and [42]. We have shown that G $\alpha$  subunits can interact with intracellularly retained Kir3.1 [6] suggesting that G $\alpha$  may be important for both precocious and later signalling interactions. Where exactly these interactions occur needs to be empirically determined as does the specific sites for assembly of the entire receptor/G protein/effector complex. Further, it remains to be determined what happens to these complexes during internalization and recycling or degradation of the receptor.

### **Distinctions between Kir3.1 and Kir3.2.**

Kir3.2 subunits are capable of forming heterotetramers with Kir3.1 which lead to Kir3.1 trafficking to the cell surface. They are also capable of forming functional homotetramers which traffic independently to the plasma membrane [43]. We also studied precocious interactions between G $\beta\gamma$  subunits and Kir3.2 by again blocking trafficking with DN Rab 1 and Sar 1. Confocal microscopy studies using either Kir3.2-

Rluc (this article) or tagged Kir3.2 (MR AND TEH, unpublished observations) indicate that most of the channel is retained intracellularly although a proportion traffics to the cell surface (see for example [25]). We discovered several interesting differences between Kir3.1 and Kir3.2 with respect to their abilities to interact with different G $\beta$  $\gamma$  combinations. First, Kir3.2 seems to only directly interact with G $\beta$ 1- and G $\beta$ 2-containing G $\beta$  $\gamma$  subunits and not with G $\beta$ 3-5, although as for Kir3.1 these other subunits might be part of larger regulatory complexes. Further, in BRET competition experiments, only G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 could compete effectively for the GFP10-G $\beta$ 1/Kir3.2-Rluc interaction. However, unlike similar experiments with Kir3.1-Rluc, even G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 could only compete to a limited extent perhaps indicating that the interaction between Kir3.2 and G $\beta$  $\gamma$  were of different affinities than those detected for Kir3.1. Studies on G $\beta$  $\gamma$  specificity for N-type voltage-gated calcium channels also demonstrated preferential interactions with G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 over other G $\beta$  subunits [44]. Further, both Kir3.2 trafficking and interaction with G $\beta$  $\gamma$  were insensitive to DN Rab1 or Sar1. Further study is required to map out the trafficking itinerary of Kir3.2 homotetramers and Kir3.1/Kir3.2 heterotetramers although it is clear that Kir3.2 likely interacts with G $\beta$  $\gamma$  initially in the ER. There may also be a cell type-specific regulation of channel trafficking which is not faithfully reproduced in heterologous expression systems.

### **Distinct sites for precocious and signalling interactions?**

Both structural studies [41], [45] and [46] and electrophysiological studies [47], [48] and [49] have indicated that there are multiple binding sites for G $\beta$  $\gamma$  on Kir3 channels. These binding sites have been localized to both the N- and C-terminal cytosolic domains. Integrating data from all these studies indicates that there may be anywhere from 4–12 possible binding sites for G $\beta$  $\gamma$  subunits on a tetrameric Kir3 channel. G $\beta$  $\gamma$  binding to a subset of these sites is sufficient to fully open the channel under physiological conditions. Multiple G $\beta$  $\gamma$  binding sites have been noted on other G $\beta$  $\gamma$  effectors such as voltage-gated calcium channels reviewed in [50]. Other classic G $\beta$  $\gamma$  targets such as adenylyl cyclase isoforms have been shown to be multimeric [51],

[52] and [53]. Direct interactions with G $\beta\gamma$  have also been shown for a number of GPCRs which may be multimeric as well [54] and [55]. Taken together, many proteins which bind G $\beta\gamma$  may do so at different times, different interaction sites and in different subcellular compartments. Structurally, the precocious interactions seem somewhat similar to signalling interactions in that both can be blocked by  $\beta$ ARK-CT when it is targeted to the relevant subcellular location (Figure 27). What then are the roles for the other sites? Distinguishing the roles for distinct sites of G $\beta\gamma$  interaction will be critical for dissecting the functional relevance of precocious versus agonist-induced interactions between G $\beta\gamma$  and its partners. Which of these sites are responsible for the precocious interactions before channels or other interactors and G $\beta\gamma$  reach the cell surface? Although numerous studies have demonstrated that G protein heterotrimers remain intact during the basic signalling event [23] a recent study has indicated that this may depend on the nature of the heterotrimer itself ([56], reviewed in [57]). Thus the stoichiometry and dynamics of precocious versus signalling interactions between G $\beta\gamma$  and its interacting proteins remains to be determined in detail as well.

### **Implications of precocious channel/G $\beta\gamma$ interactions.**

A simple argument could be made that the precocious interactions between G $\beta\gamma$  and Kir3 channels or other effectors simply plays a role in signalling specificity once these complexes are targeted to the plasma membrane. The idea that the plasma membrane is the only site of action for GPCR signalling systems has been challenged recently (reviewed in [58]). Regulated trafficking and assembly events must occur to correctly target receptors and their signalling machinery to alternative subcellular destinations. We must begin to consider a wider role for the G $\beta\gamma$ /effector or G $\beta\gamma$ /receptor interactions, especially those that occur before these complexes reach the plasma membrane. What has been missing is an assessment of the comparative roles for these interactions in terms of 1) formation of specific signalling complexes independent of receptor stimulation and 2) specific agonist-induced signalling events. G $\beta\gamma$  subunits interact with all of the components of G protein signalling cascades-receptors, G $\alpha$

subunits, effector molecules and many regulatory molecules. Thus, they are well positioned to play key roles in organizing these complexes during biosynthesis. A number of studies have shown the loss of specific effector pathways when isoforms of  $G\alpha$ ,  $G\beta$  or  $G\gamma$  were either knocked down using shRNAs or knocked out in transgenic animals. For example, deletion of  $G\gamma 3$  in mice leads to selective losses of  $G\beta 2$  and  $G\alpha i 3$  [59]. Knockdown of  $G\beta 1$  and  $G\beta 2$  in J774A.1 mouse macrophages led to a loss of numerous GPCR signalling pathways [60]. Whether these result from loss of signalling per se or from a deficiency in assembly and/or targeting events remains to be determined. Interestingly, these studies all demonstrate a reduced expression of signalling partners rather than simply a loss of signalling (also see [61] and [62] for review). Different combinations of  $G\beta\gamma$  may therefore act as “chaperones”, in effect facilitating the assembly of specific signalling complexes destined for different intracellular destinations. The formation of specific combinations of  $G\beta\gamma$  at different times or in different cells may be a tightly regulated process involving a number of molecular chaperones including phosphatidylinositol-3-OH kinase, the cytosolic chaperonin complex and DRiP78 (see [20], [63], [64], [65] and [66], reviewed in [67] and [68]). These findings may have significant impact on our notions of signalling specificity and the organization of signalling complexes.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Quebec to T.E.H. T.E.H. is a Chercheur National of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. M.R. holds a doctoral award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. NR is a recipient of a McGill Faculty of Medicine Internal Studentship Award. We thank Dr. Denis J. Dupré (Dalhousie University, Halifax, Canada) for generating a number of the reagents (listed in publications cited here) used in this study. We thank Dr. Dupré and Dr. Vic Rebois (NIH, Bethesda, USA) for helpful discussions.

## References

- [1] Sodickson DL, Bean BP. *J Neurosci* 1996;16(20):6374-6385.
- [2] Benians A, Leaney JL, Milligan G, Tinker A. *J Biol Chem* 2003;278(12):10851-10858.
- [3] Rebois RV, Hebert TE. *Receptors Channels* 2003;9(3):169-194.
- [4] Nobles M, Benians A, Tinker A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(51):18706-18711.
- [5] Lachance M, Ethier N, Wolbring G, Schnetkamp PP, Hebert TE. *Cell Signal* 1999;11(7):523-533.
- [6] Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupre DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hebert TE. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 13):2807-2818.
- [7] Kitano J, Nishida M, Itsukaichi Y, Minami I, Ogawa M, Hirano T, Mori Y, Nakanishi S. *J Biol Chem* 2003;278(27):25101-25108.
- [8] Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH. *J Biol Chem* 2002;277(48):46010-46019.
- [9] Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S, Bouvier M. *J Biol Chem* 2004;279(32):33390-33397.
- [10] Dupre DJ, Robitaille M, Ethier N, Villeneuve LR, Mamarbachi AM, Hebert TE. *J Biol Chem* 2006;281(45):34561-34573.
- [11] David M, Richer M, Mamarbachi AM, Villeneuve LR, Dupre DJ, Hebert TE. *Cell Signal* 2006;18(12):2172-2181.
- [12] Dupre DJ, Baragli A, Rebois RV, Ethier N, Hebert TE. *Cell Signal* 2007;19(3):481-489.
- [13] Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. *Nature* 1987;325(6102):321-326.
- [14] Wickman KD, Iniguez-Lluhl JA, Davenport PA, Taussig R, Krapivinsky GB, Linder ME, Gilman AG, Clapham DE. *Nature* 1994;368(6468):255-257.
- [15] Riven I, Iwanir S, Reuveny E. *Neuron* 2006;51(5):561-573.

- [16] Bayewitch ML, Avidor-Reiss T, Levy R, Pfeuffer T, Nevo I, Simonds WF, Vogel Z. *J Biol Chem* 1998;273(4):2273-2276.
- [17] Mayeenuddin LH, McIntire WE, Garrison JC. *J Biol Chem* 2006;281(4):1913-1920.
- [18] Pflieger KD, Eidne KA. *Nat Methods* 2006;3(3):165-174.
- [19] Hebert TE, Gales C, Rebois RV. *Cell Biochem Biophys* 2006;45(1):85-109.
- [20] Dupre DJ, Robitaille M, Richer M, Ethier N, Mamarbachi AM, Hebert TE. *J Biol Chem* 2007;282(18):13703-13715.
- [21] Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE, Bouvier M. *Nat Methods* 2005;2(3):177-184.
- [22] Sarac R, Hou P, Hurley KM, Hriciste D, Cohen NA, Nelson DJ. *J Neurosci* 2005;25(7):1836-1846.
- [23] Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13(9):778-786.
- [24] Pellegrino S, Zhang S, Garritsen A, Simonds WF. *J Biol Chem* 1997;272(40):25360-25366.
- [25] Ma D, Zerangue N, Raab-Graham K, Fried SR, Jan YN, Jan LY. *Neuron* 2002;33(5):715-729.
- [26] Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 22):3905-3910.
- [27] Zerial M, McBride H. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(2):107-117.
- [28] Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairat S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(7):3684-3689.
- [29] Hynes TR, Mervine SM, Yost EA, Sabo JL, Berlot CH. *J Biol Chem* 2004.
- [30] Filipeanu CM, Zhou F, Claycomb WC, Wu G. *J Biol Chem* 2004.
- [31] Duvernay MT, Filipeanu CM, Wu G. *Cell Signal* 2005;17(12):1457-1465.
- [32] Doupnik CA. *J Recept Signal Transduct Res* 2008;28(1-2):83-91.
- [33] Jaen C, Doupnik CA. *J Biol Chem* 2006;281(45):34549-34560.
- [34] Nikolov EN, Ivanova-Nikolova TT. *J Biol Chem* 2004;279(22):23630-23636.
- [35] Nikolov EN, Ivanova-Nikolova TT. *J Biol Chem* 2007;282(39):28669-28682.

- [36] Witherow DS, Wang Q, Levay K, Cabrera JL, Chen J, Willars GB, Slepak VZ. *J Biol Chem* 2000;275(32):24872-24880.
- [37] Yost EA, Mervine SM, Sabo JL, Hynes TR, Berlot CH. *Mol Pharmacol* 2007;72(4):812-825.
- [38] McIntire WE, MacCleery G, Murphree LJ, Kerchner KR, Linden J, Garrison JC. *Biochemistry* 2006;45(38):11616-11631.
- [39] Kerchner KR, Clay RL, McCleery G, Watson N, McIntire WE, Myung CS, Garrison JC. *J Biol Chem* 2004;279(43):44554-44562.
- [40] Lei Q, Jones MB, Talley EM, Schrier AD, McIntire WE, Garrison JC, Bayliss DA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(17):9771-9776.
- [41] Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY. *Neuron* 1995;15(5):1133-1143.
- [42] Clancy SM, Fowler CE, Finley M, Suen KF, Arrabit C, Berton F, Kosaza T, Casey PJ, Slesinger PA. *Mol Cell Neurosci* 2005;28(2):375-389.
- [43] Schoots O, Wilson JM, Ethier N, Bigras E, Hebert TE, Van Tol HH. *Cell Signal* 1999;11(12):871-883.
- [44] Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B. *J Neurosci* 1998;18(22):9163-9170.
- [45] Huang CL, Jan YN, Jan LY. *FEBS Lett* 1997;405(3):291-298.
- [46] Kunkel MT, Peralta EG. *Cell* 1995;83(3):443-449.
- [47] Ivanova-Nikolova TT, Nikolov EN, Hansen C, Robishaw JD. *J Gen Physiol* 1998;112(2):199-210.
- [48] Nemeč J, Wickman K, Clapham DE. *Biophys J* 1999;76(1 Pt 1):246-252.
- [49] Corey S, Clapham DE. *J Biol Chem* 2001;276(14):11409-11413.
- [50] Tedford HW, Zamponi GW. *Pharmacol Rev* 2006;58(4):837-862.
- [51] Gu C, Cali JJ, Cooper DM. *Eur J Biochem* 2002;269(2):413-421.
- [52] Cooper DM, Crossthwaite AJ. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(8):426-431.
- [53] Baragli A, Grieco ML, Trieu P, Villeneuve LR, Hebert TE. *Cell Signal* 2008;20(3):480-492.

- [54] Wu G, Benovic JL, Hildebrandt JD, Lanier SM. *J Biol Chem* 1998;273(13):7197-7200.
- [55] Wu G, Bogatkevich GS, Mukhin YV, Benovic JL, Hildebrandt JD, Lanier SM. *J Biol Chem* 2000;275(12):9026-9034.
- [56] Digby GJ, Lober RM, Sethi PR, Lambert NA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(47):17789-17794.
- [57] Lambert NA. *Sci Signal* 2008;1(25):re5.
- [58] Boivin B, Vaniotis G, Allen BG, Hébert TE. *J Receptors Sig. Transduct.* 2008;28(1-2):15-28.
- [59] Schwindinger WF, Giger KE, Betz KS, Stauffer AM, Sunderlin EM, Sim-Selley LJ, Selley DE, Bronson SK, Robishaw JD. *Mol Cell Biol* 2004;24(17):7758-7768.
- [60] Hwang JI, Choi S, Fraser ID, Chang MS, Simon MI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(27):9493-9498.
- [61] Krumins AM, Gilman AG. *J Biol Chem* 2006;281(15):10250-10262.
- [62] Robishaw JD, Berlot CH. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(2):206-209.
- [63] Humrich J, Bermel C, Bunemann M, Harmark L, Frost R, Quitterer U, Lohse MJ. *J Biol Chem* 2005;280(20):20042-20050.
- [64] Knol JC, Engel R, Blaauw M, Visser AJ, van Haastert PJ. *Mol Cell Biol* 2005;25(18):8393-8400.
- [65] Lukov GL, Baker CM, Ludtke PJ, Hu T, Carter MD, Hackett RA, Thulin CD, Willardson BM. *J Biol Chem* 2006;281(31):22261-22274.
- [66] Lukov GL, Hu T, McLaughlin JN, Hamm HE, Willardson BM. *Embo J* 2005;24(11):1965-1975.
- [67] Willardson BM, Howlett AC. *Cell Signal* 2007;19(12):2417-2427.
- [68] Marrari Y, Crouthamel M, Irannejad R, Wedegaertner PB. *Biochemistry* 2007;46(26):7665-7677.



## Figures

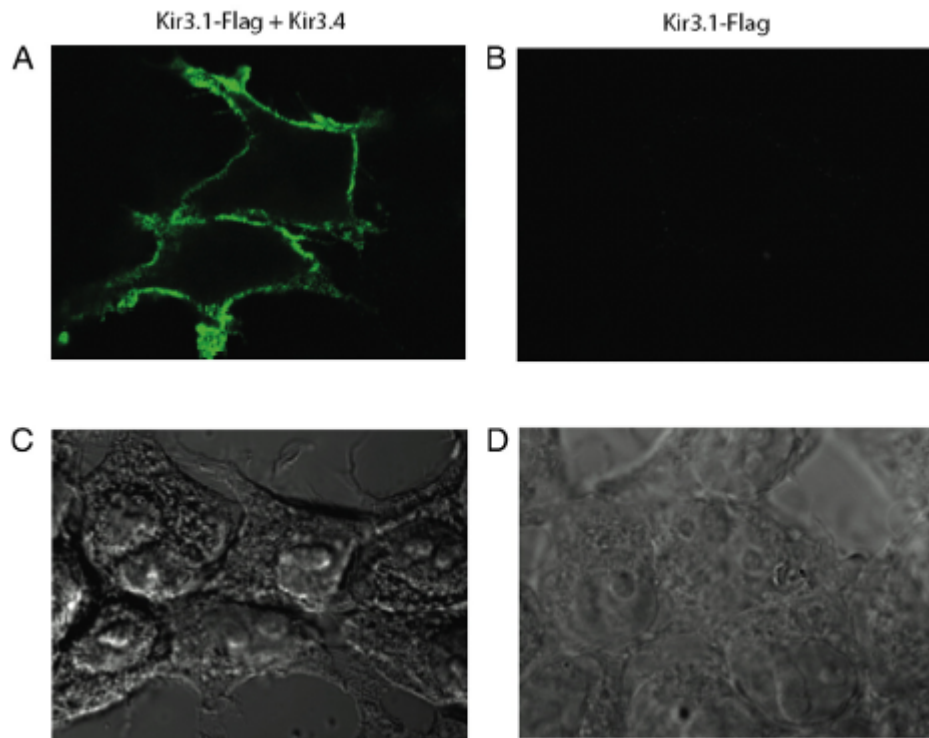


Figure 16. *Kir3.4* subunit allows *Kir3.1* subunit to reach the plasma membrane.

Confocal microscopy of non-permeabilized HEK293 cells using an anti-Flag antibody. A) Extracellularly Flag-tagged Kir3.1 subunits were expressed in HEK293 cells without (B) and with Kir3.4 subunits (A). Surface Flag labelling is only detected when both subunits were co-expressed. C and D) Phase contrast images of the respective cells in A and B used for confocal imaging. These images are representative of three individual experiments.

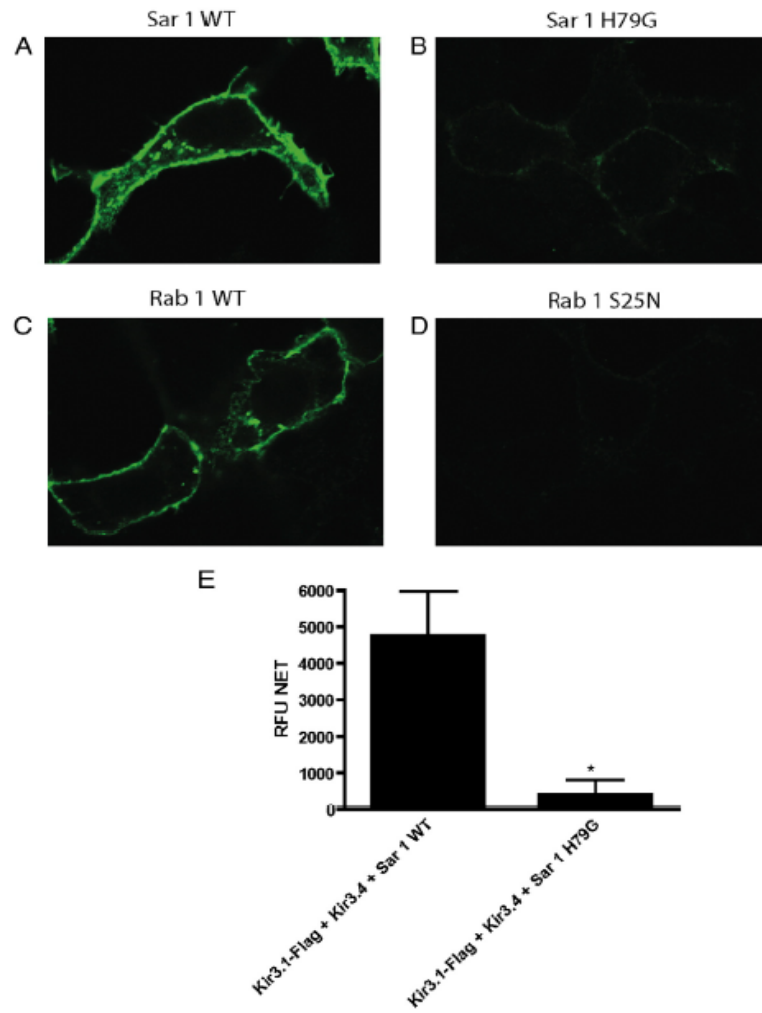


Figure 17. *Sar 1* and *Rab 1* dominant negative forms block channel trafficking to the cell surface.

Extracellularly Flag-tagged Kir3.1 was expressed in HEK293 cells with Kir3.4 subunits. Non-permeabilized cells were incubated with anti-Flag antibody and an Alexa-tagged secondary antibody. A) Confocal microscopy of cells also expressing Sar1 WT, B) Sar 1 H79G, C) Rab1 WT, and D) Rab 1 S25N showing that both Sar 1 and Rab 1 dominant negative forms blocked the cell surface trafficking of the Kir3.1/3.4 channel. These images are representative of three individual experiments. E) Chemiluminiscent labelling of cell surface channel subunits was monitored more quantitatively using a microplate reader and showed that Sar 1 H79G again blocked Kir3.1/3.4 trafficking to the cell surface. Data here is presented as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* indicates  $p < 0.05$  compared with controls using a one-tailed Student's *t*-test.

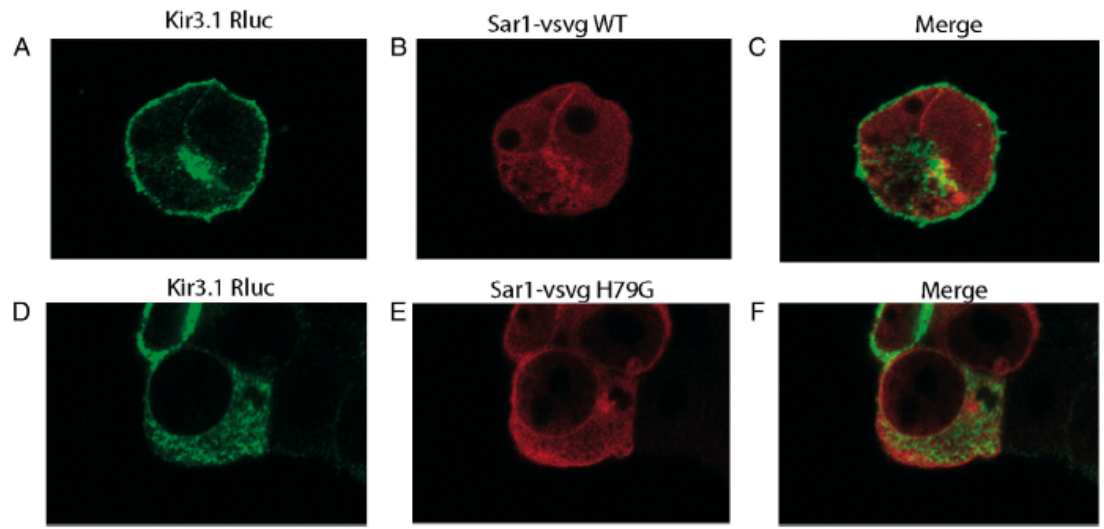


Figure 18. *Kir3.1/Kir3.4* expression levels and distribution in the presence of WT and DN *Sar 1*.

HEK293 cells were transfected with Kir3.1-RLuc, Kir3.4 and Sar 1 – VSVG WT and DN forms. Confocal microscopy on permeabilized cells show A) cell surface expression of Kir3.1RLuc when co-expressed with Kir3.4 and WT Sar1, B) intracellular localization of vsvg-tagged WT Sar 1 and C) merged image showing the lack of co-localization between the Kir3.1 and WT Sar 1 in the presence of Kir3.4, D) When expressed with vsvg-tagged H79G DN Sar 1, Kir3.1-RLuc was trapped inside the cell, even when co-expressed with Kir3.4. E) H79G DN Sar1 shows a similar localization as WT Sar 1. F) Merged image showing intracellular co-localization of Kir3.1 and H79G DN Sar 1 in presence of Kir3.4. Data are representative of at least 3 different experiments.

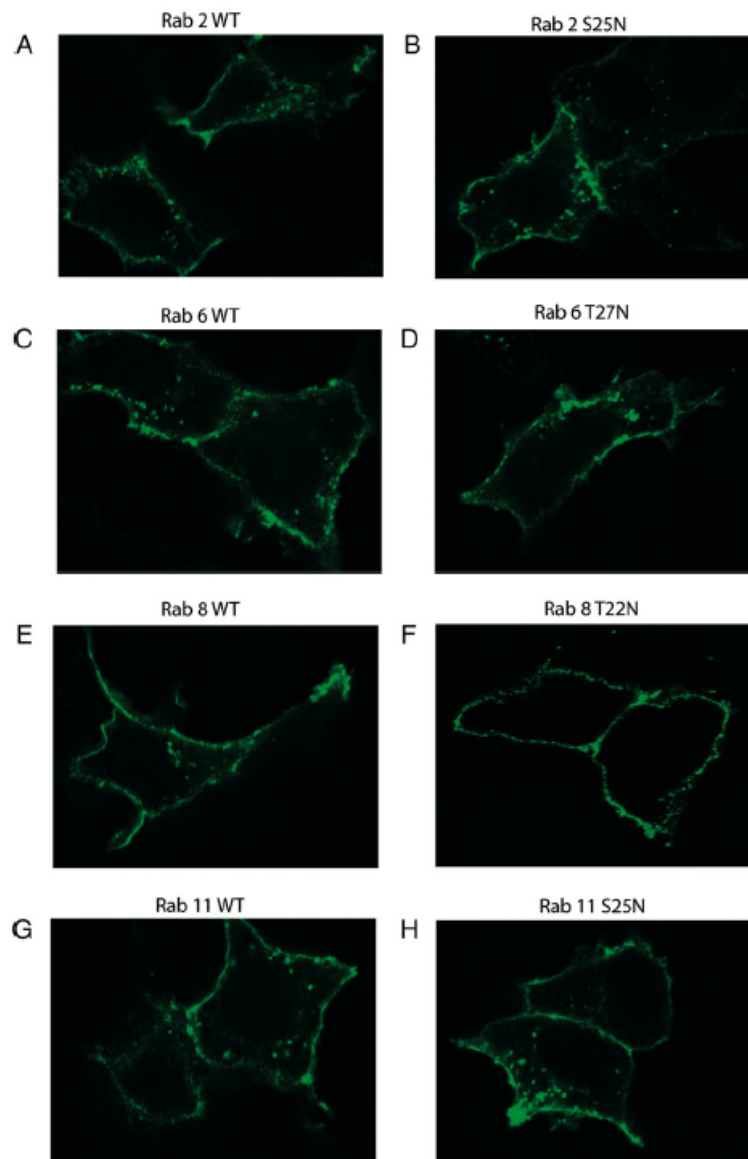


Figure 19. *Kir3.1/3.4* trafficking is independent of *Rabs 2,6,8,and 11*.

Extracellularly Flag-tagged Kir3.1 subunits were expressed in HEK293 cells with the Kir3.4 subunit. Non-permeabilized cells were incubated with anti-Flag antibody and an Alexa-tagged secondary antibody. Confocal microscopy images show that co-expression of the channels with A) Rab 2 WT, B) Rab 2 S25N, C) Rab 6 WT, D) Rab 6 T27N, E) Rab 8 WT, F) Rab 8 T22N, G) Rab 11 WT, and H) Rab 11 S25N did not affect the cell surface channel trafficking. These images are representative of three individual experiments.

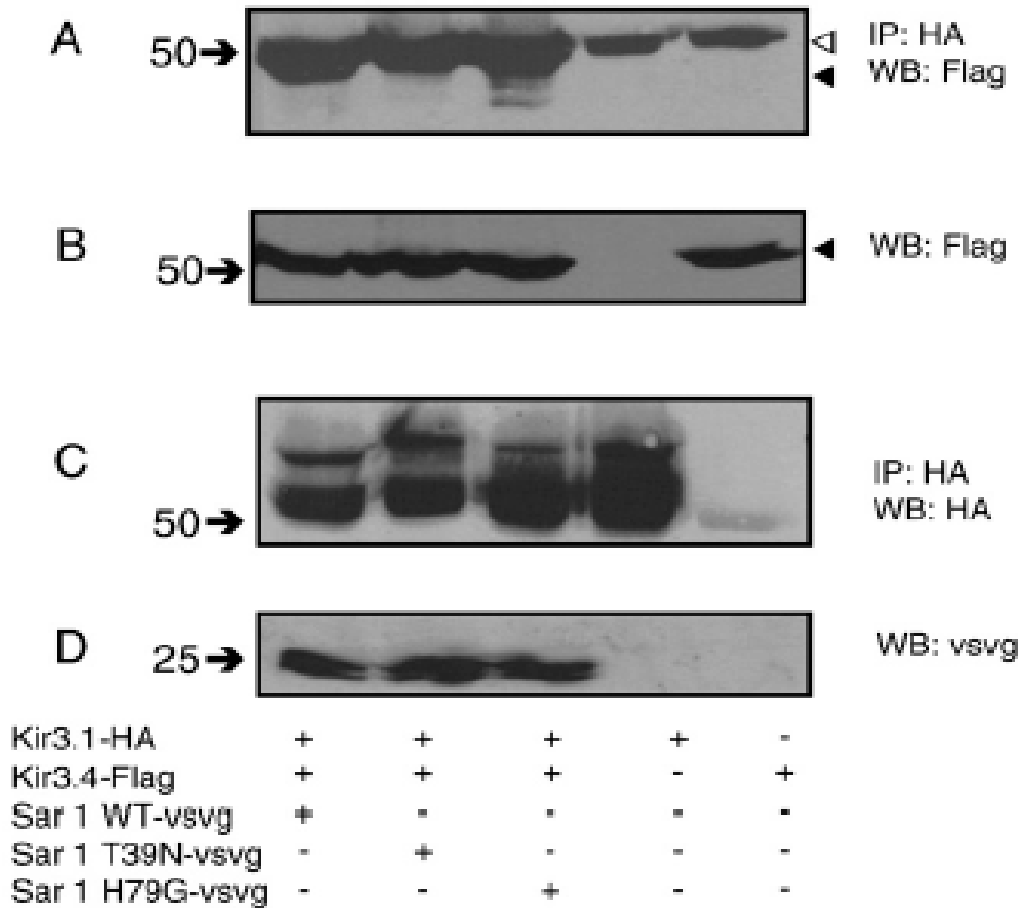
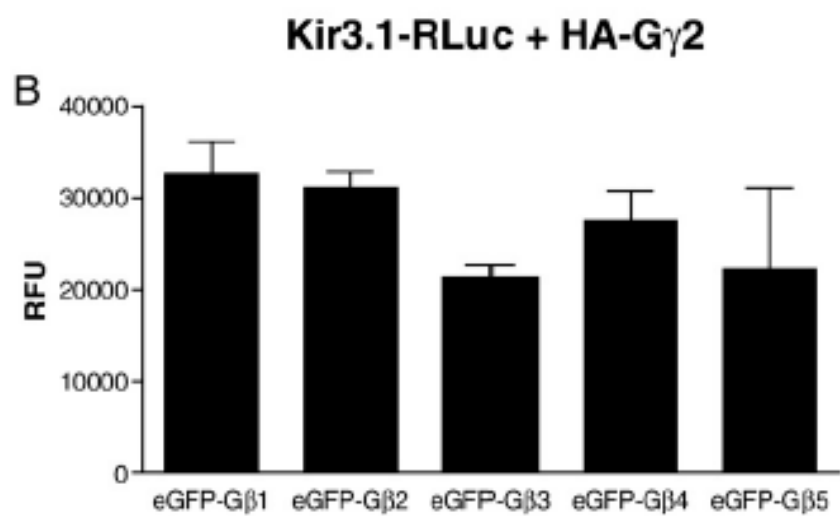
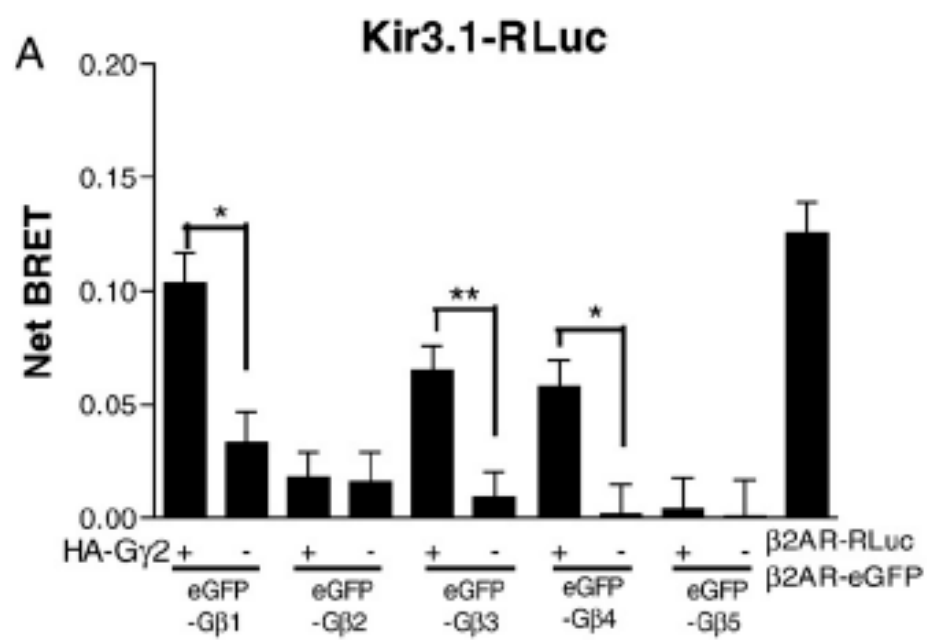


Figure 20. *DN Sar 1 did not prevent assembly of the channel heterotetramer.*

HEK293 cells transfected with the indicated proteins were solubilized in lysis buffer before immunoprecipitation. Precipitated proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred on nitrocellulose for western blotting. A) HA-tagged Kir3.1 was immunoprecipitated by anti-HA and the presence of Kir3.4 was revealed by blotting with anti-Flag antibodies. The presence of either WT or DN Sar 1 did not effect channel formation as measured by co-immunoprecipitation of the two channel subunits. B) Cell lysates blotted to confirm expression of Flag-tagged Kir3.4. C) Detection of HA-tagged Kir3.1 channel to confirm efficacy of the immunoprecipitation procedure. D) Cell lysates blotted to confirm co-expression of WT or DN vsvg-tagged Sar 1. Open arrows indicate non-specific bands while the closed arrows indicate Flag-tagged Kir3.4. Data are representative of 2 independent experiments.



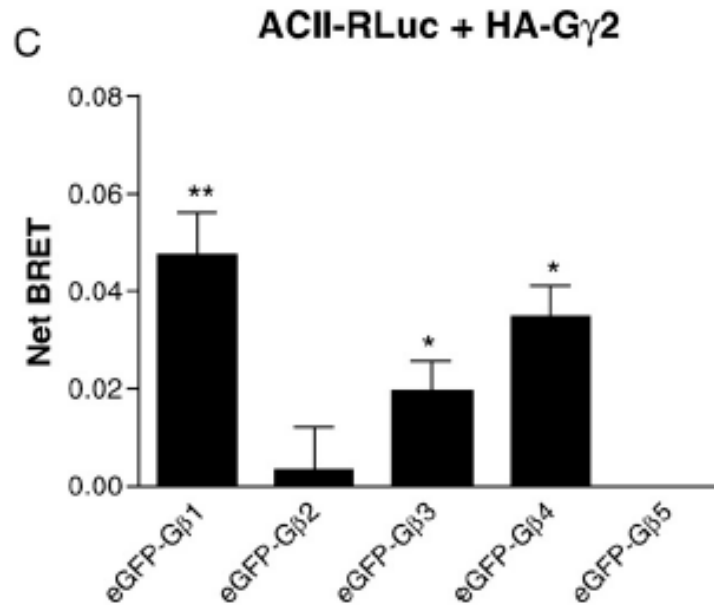


Figure 21. *Specific G $\beta$  subunits interact with Kir3.1 in presence of G $\gamma$ 2.*

A) HEK293 cells were transfected with recombinant plasmids to express Kir3.1-RLuc and eGFP-G $\beta$  subunits in the presence or in the absence of HA-G $\gamma$ 2. The presence of G $\gamma$ 2 is necessary to optimize the channel/G $\beta$  interaction as measured by BRET. Kir3.1-RLuc interacts with eGFP-G $\beta$ 1, eGFP-G $\beta$ 3 and eGFP-G $\beta$ 4 but not with eGFP-G $\beta$ 2 or eGFP-G $\beta$ 5. Data are expressed as net BRET mean  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments. \*indicates  $p < 0.05$  and \*\*indicates  $p < 0.005$  compared to the condition without G $\gamma$ 2 using a one-tailed Student's  $t$ -test. B) Fluorescence measurements of the cells used in Figure 21. Ashowing that each eGFP-G $\beta$  subunit was expressed at a similar level. No statistical difference was shown using a one-way ANOVA. C) BRET measurement in HEK293 cells transfected with ACII-RLuc, eGFP-G $\beta$ 1-5 and HA-G $\gamma$ 2 showing the same specificity for the different eGFP-G $\beta$  for both Kir3.1 and ACII. Data are expressed as net BRET mean  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments. \*indicates  $p < 0.05$  and \*\*indicates  $p < 0.005$  compared with the negative control using a one-tailed Student's  $t$  test.

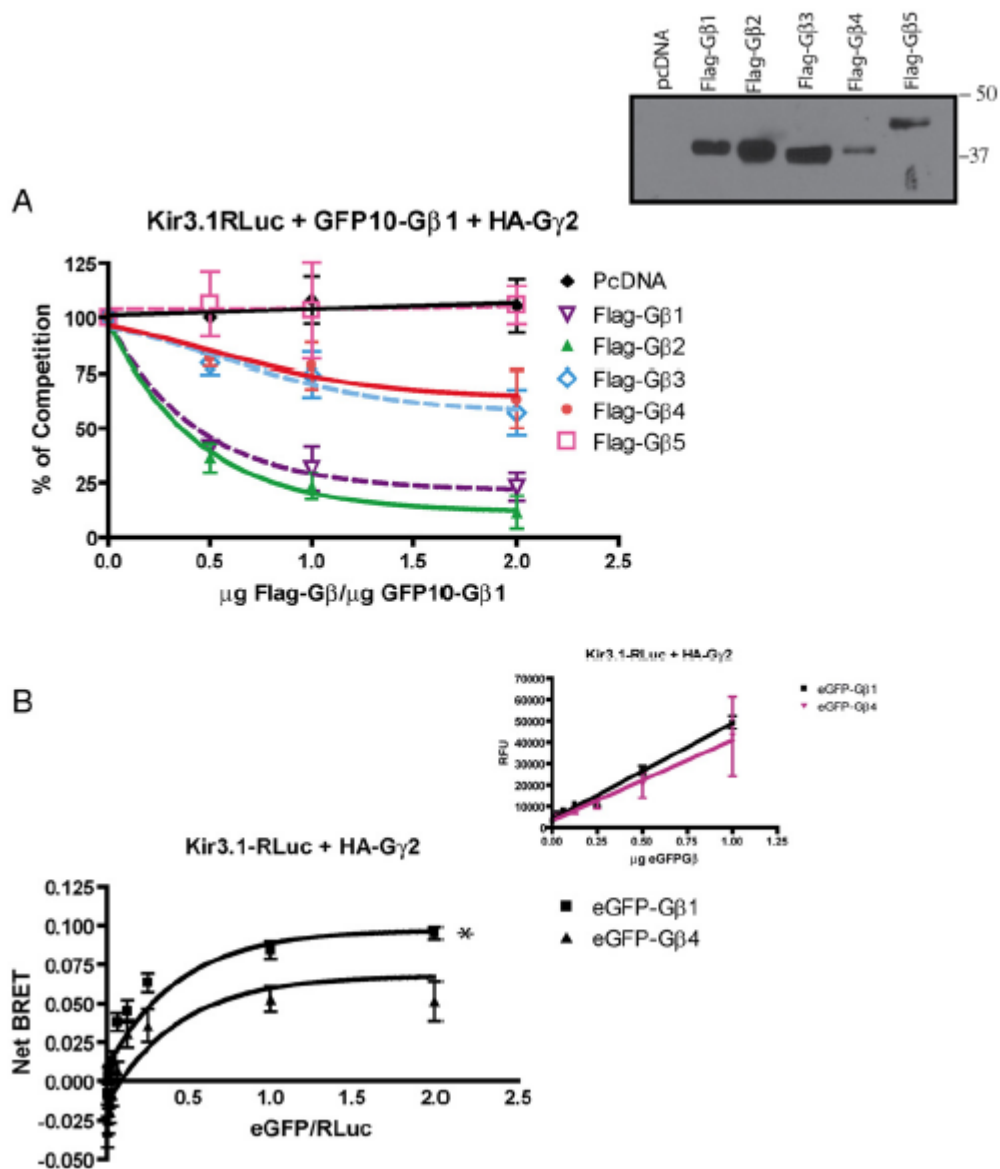


Figure 22. *G*β subunits show different affinities for *Kir3.1-RLuc*.

A) HEK 293 cells were transfected with *Kir3.1-RLuc*, GFP10-Gβ1, HA-Gγ2 and increasing amounts of either pcDNA, or Flag-Gβ1-5 subunit cDNAs. BRET experiments showed that neither pcDNA nor Flag-Gβ5 could compete for the *Kir3.1RLuc*/GFP10-Gβ1 (+ HA-Gγ2) interaction while Flag-Gβ1 and Flag-Gβ2 effectively inhibited this interaction. Flag-Gβ3 and Flag-Gβ4 inhibited the interaction to a lesser extent. Results are presented as % competition  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments. Data were fit to one-site binding curves with the exception of the pcDNA control which was better



fit using simple linear regression *Inset*: Individual Flag-G $\beta$  subunit expression was verified by western blot with anti-Flag. Data was analyzed using a one-way ANOVA and G $\beta$ 1 and G $\beta$ 2 were significantly different from pcDNA3 or G $\beta$ 5 at  $p < 0.05$  for all points. G $\beta$ 3 and G $\beta$ 4 were significantly different from pcDNA3 or G $\beta$ 5 at  $p < 0.05$  at a concentration of 2.0  $\mu$ g FLAG-G $\beta$ / $\mu$ g GFP10-G $\beta$ 1. B) HEK293 cells were transfected with Kir3.1-RLuc and HA-G $\gamma$ 2 and increasing amounts of eGFP-G $\beta$ 1 or eGFP-G $\beta$ 4. BRET titration curves indicated a higher affinity for eGFP-G $\beta$ 1 than for eGFP-G $\beta$ 4. All points for eGFP-G $\beta$ 1 are different than the corresponding points of eGFP-G $\beta$ 4 as determined using a one-tailed Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ). *Inset*: eGFP-G $\beta$ 1 and eGFP-G $\beta$ 4 expression levels are shown. Data are expressed as net BRET (or relative fluorescence units, RFU) and represent mean  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments and were not significantly different as determined by a one-tailed Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

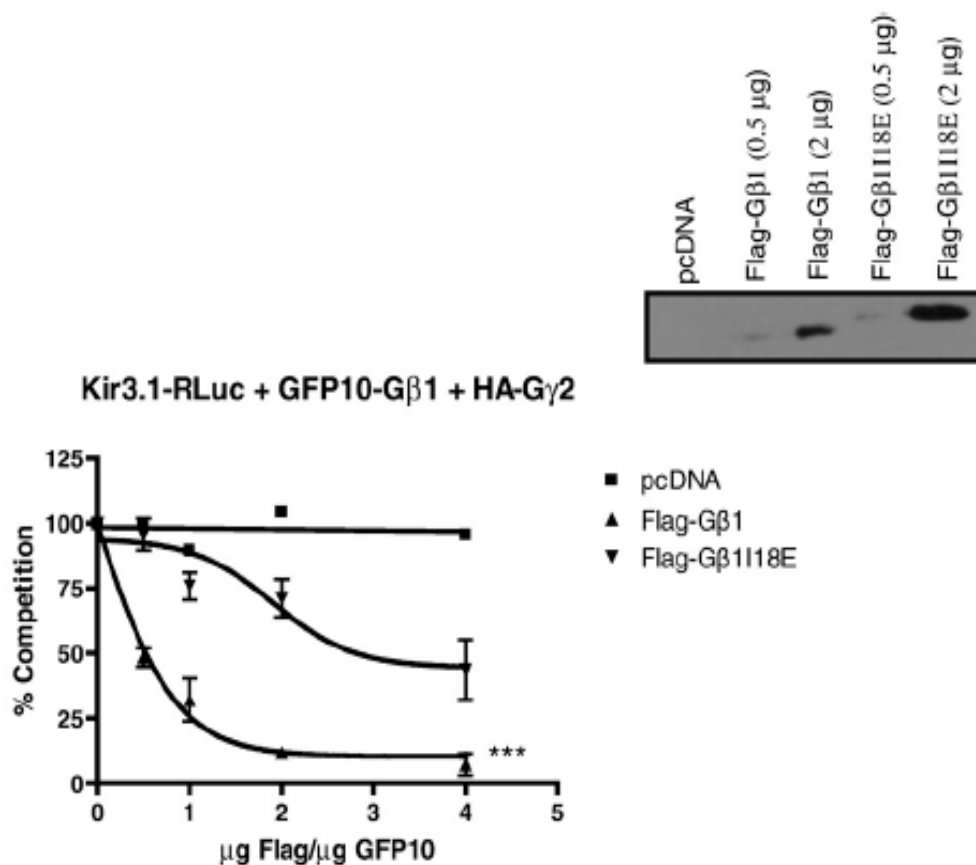


Figure 23. *Gβ1118E* shows a reduced ability to compete for the *GFP10-Gβ1/Kir3.1-Rluc* interaction.

To confirm the requirement for  $G\beta$  to interact with  $G\gamma$  as a pre-requisite to Kir3.1 interaction, BRET competition experiments were conducted. BRET experiments showed that Flag-Gβ1118E could not compete for the Kir3.1RLuc/GFP10-Gβ1 (+ HA-Gγ2) interaction as effectively as WT Flag-Gβ1. Results are presented as % competition  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments. A one tailed Student's t-test was used to compare Flag-Gβ1 and Flag-Gβ1118E competition curves. All points were different with  $p < 0.001$ . Inset: WT-Flag-Gβ1 or Flag-Gβ1118E subunit expression was verified by western blot with anti-Flag.

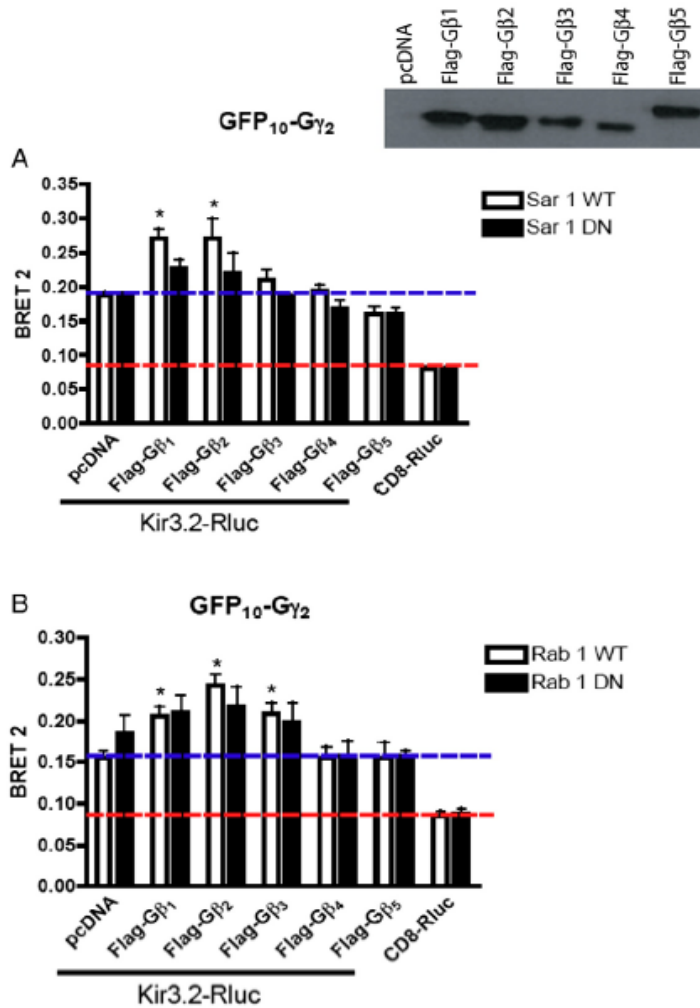


Figure 24. *Gβ* subunits show specificity in interactions with *Kir3.2-RLuc*.

A) HEK 293 cells were transfected with *Kir3.1-RLuc*, *GFP10-Gγ2*, with or without co-expressed *Flag-Gβ1-5* in the absence or presence of WT or DN *Sar 1*. Inset: Individual *Flag-Gβ* subunit expression was verified by western blot with anti-*Flag*. B) Similar experiments conducted in the absence or presence of WT and DN *Rab1*. Data are expressed as BRET mean  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments. Dotted blue line indicates BRET above that fostered by endogenous *Gβ* subunits. \* indicates  $p < 0.05$  compared with *pcDNA3* for the different *Gβ* subunits when *Sar1* or *Rab1* constructs were not expressed using an unpaired t test. Dotted red line indicates non-specific BRET seen in the negative control using *CD8-RLuc*. No differences were detected when comparing the presence or absence of *Sar1* or *Rab1*.

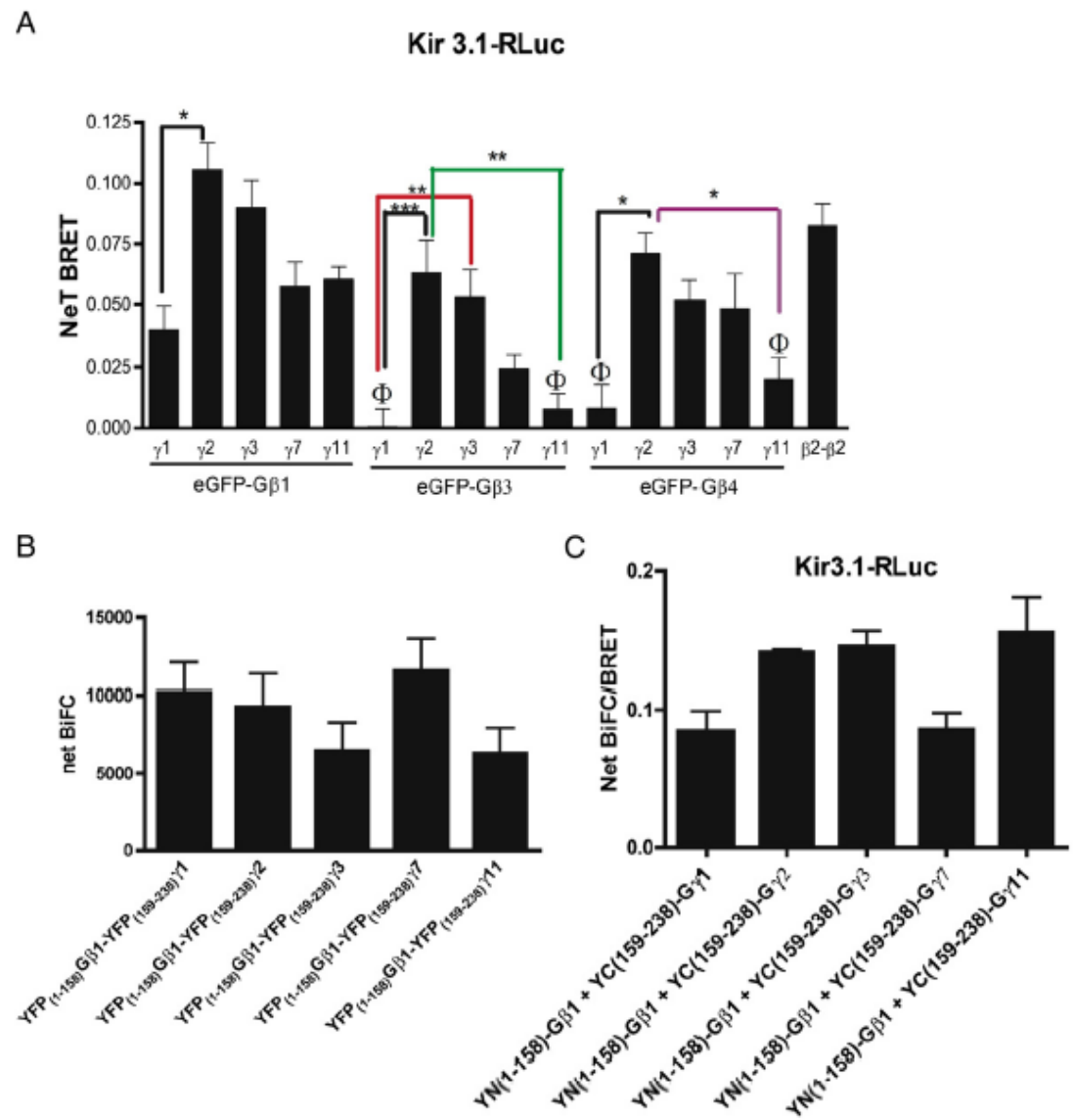


Figure 25. *Differential Gγ subunit effects on Kir3.1/Gβγ interactions.*

A) HEK293 cells were transfected with Kir3.1-RLuc, eGFP-Gβ1, 3 or 4 and HA-Gγ1, 2, 3, 7 or 11. Gβγ composed of eGFP-Gβ3 and eGFP-Gβ4 with HA-Gγ1 or HA-Gγ11 lose their capacity to interact with Kir3.1-RLuc as measured by BRET. A one-way ANOVA followed by Tukeys test was used to compare between each condition within the same group (eGFP-Gβ<sub>n</sub> with different Gγ subunits, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001). Φ indicates using a one-tailed student's *t*-test with Bonferroni correction that BRET was not different from the negative control. B) BiFC was measured in HEK293 cells

transfected with YFP<sub>(1-158)</sub>Gβ1 and YFP<sub>(159-238)</sub>Gγ1, 2, 3, 7 or 11. Data are expressed as net BiFC where BiFC from cells co-expressing YFP<sub>(1-158)</sub>Gβ1 and the vector YFP<sub>(159-238)</sub> was subtracted. C) BiFC/BRET was measured in cells transfected with YFP<sub>(1-158)</sub>Gβ1 and YFP<sub>(159-238)</sub>Gγ1, 2, 3, 7 or 11 and Kir3.1-RLuc. Data are expressed as net BiFC/BRET where the ratio of the negative control, (CD8-RLuc, YFP<sub>(1-158)</sub>Gβ1 and YFP<sub>(159-238)</sub>Gγ2) was subtracted. Data represent mean ± s.e.m. for at least 3 different experiments. A one-tailed Student's *t*-test with Bonferroni correction was used to demonstrate that BRET was significantly greater than the negative control ( $p < 0.001$  for all conditions).

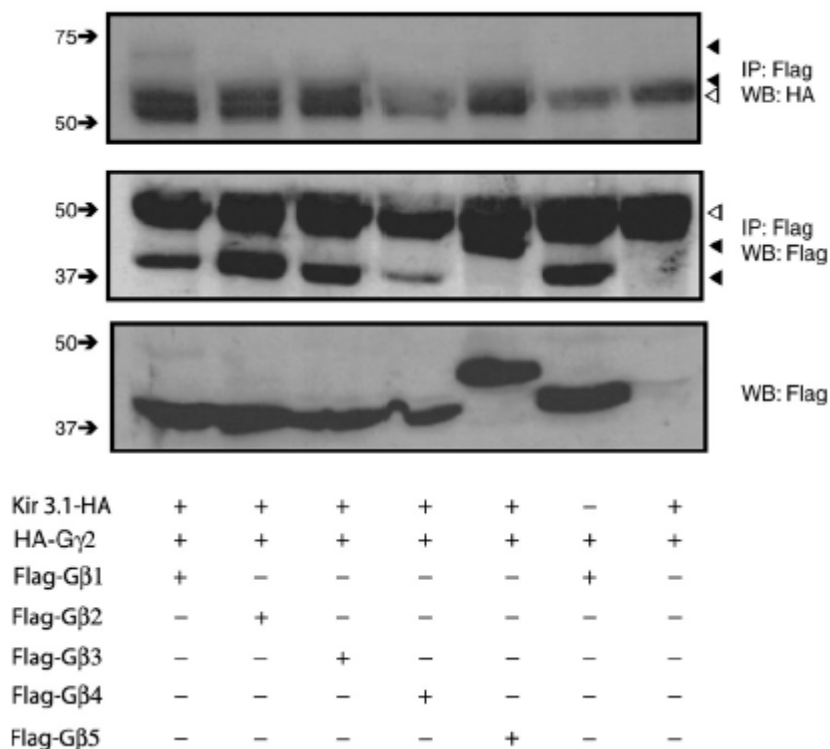


Figure 26. Interactions between *Kir3.1* and *G $\beta$  $\gamma$*  detected using co-immunoprecipitation.

HEK293 cells transfected with the indicated proteins were solubilized in lysis buffer before immunoprecipitation. Precipitated proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred on nitrocellulose for western blotting. Flag-G $\beta$ 1-5 was immunoprecipitated using anti-Flag antibodies and the presence of HA-tagged Kir3.1 was revealed by anti-HA (top panel). Open arrows indicate non-specific bands while the closed arrows indicate HA-tagged Kir3.1. Efficacy of immunoprecipitation of individual Flag-tagged G $\beta$ 1-5 subunits is shown in the middle panel. Open arrows indicate non-specific bands while the closed arrows indicate either Flag-tagged G $\beta$ 1- or G $\beta$ 5. Cell lysates were blotted to confirm the expression of individual Flag-G $\beta$ 1-5 subunits (lower panel). Data are representative of at least 3 different experiments.

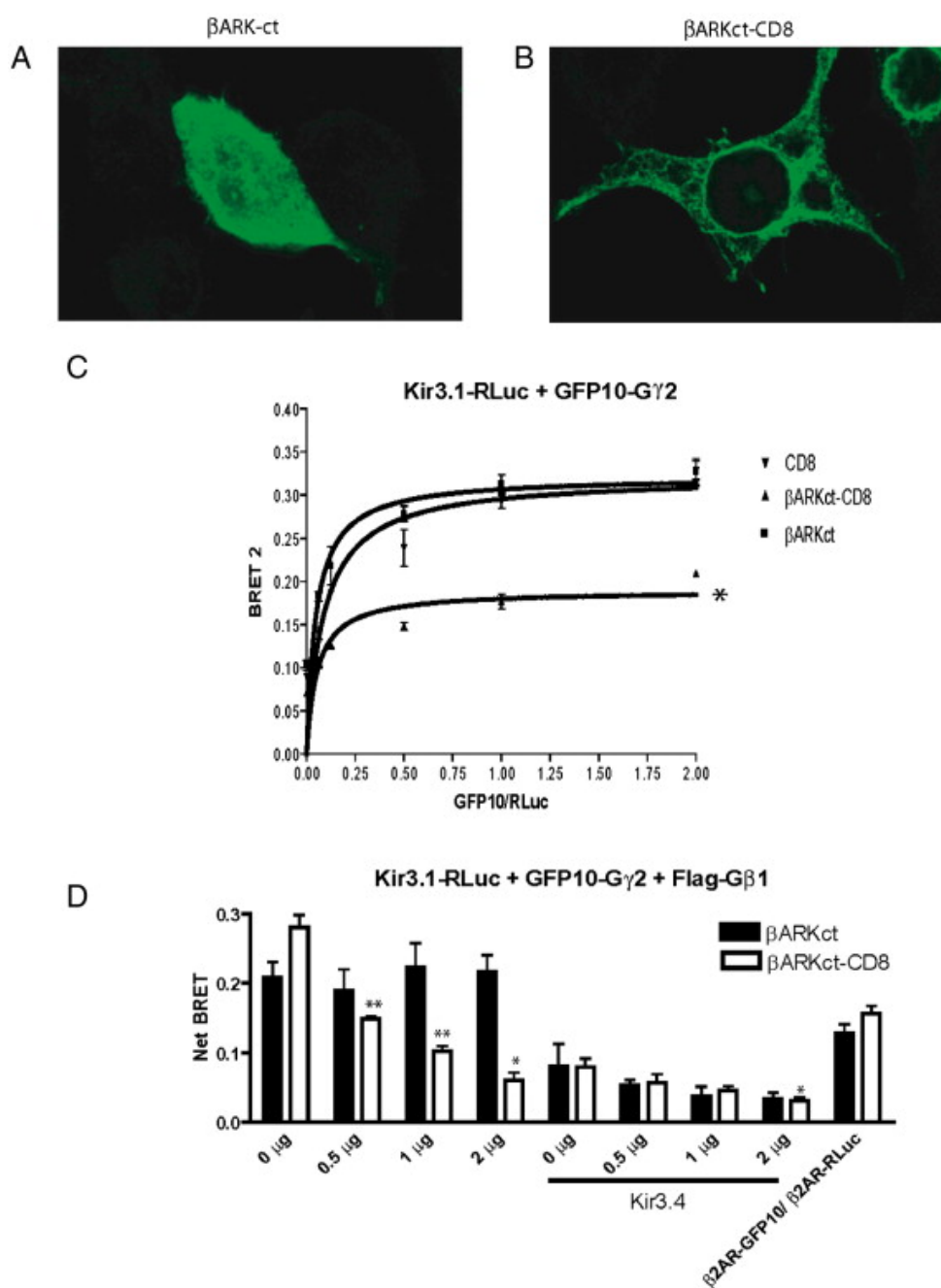


Figure 27. *Effect of soluble and membrane-localized  $\beta$ ARKct on Kir3.1/ $G\beta\gamma$  interactions.*

HEK 293 cells were transfected with A) soluble  $\beta$ ARKct or B) membrane-localized  $\beta$ ARKct-CD8. Confocal microscopy on permeabilized cells labelled with an antibody against  $\beta$ ARKct showed a cytosolic localization for soluble  $\beta$ ARKct and a membrane localization for  $\beta$ ARKct-CD8. C) Kir3.1-RLuc, Flag-G $\beta$ 1 and CD8,  $\beta$ ARKct or  $\beta$ ARKct-CD8 were transfected in HEK293 cells and BRET titration experiments were performed after co-transfecting with an increasing amount of GFP10-G $\gamma$ 2. Data represent mean  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments. \*indicates where a one way ANOVA followed by Tukeys test was used to show that all points on the  $\beta$ ARKct-CD8 curve were significantly different than either soluble  $\beta$ ARKct or CD8. D) Kir3.1-RLuc, Flag-G $\beta$ 1 and GFP10-G $\gamma$ 2 were transfected in HEK293 cells with or without Kir3.4 with various concentrations of  $\beta$ ARKct and  $\beta$ ARKct-CD8. BRET was measured between Kir3.1-Rluc and GFP10-G $\gamma$ 2. BRET between  $\beta_2$ AR-GFP10 and  $\beta_2$ AR-Rluc was used as a positive control. Data are plotted as net BRET and represent mean  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments. A one-tailed student's *t*-test with Bonferroni correction to measure inhibition of BRET was different than the 0  $\mu$ g condition for each group ( $\beta$ ARKct,  $\beta$ ARKct-CD8,  $\beta$ ARKct + Kir3.4,  $\beta$ ARKct-CD8 + Kir3.4, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01). Reduced BRET signals were detected when Kir3.4 was co-expressed as it competes with Kir3.1-Rluc for G $\beta\gamma$  (demonstrated previously in Rebois et al., 2006).



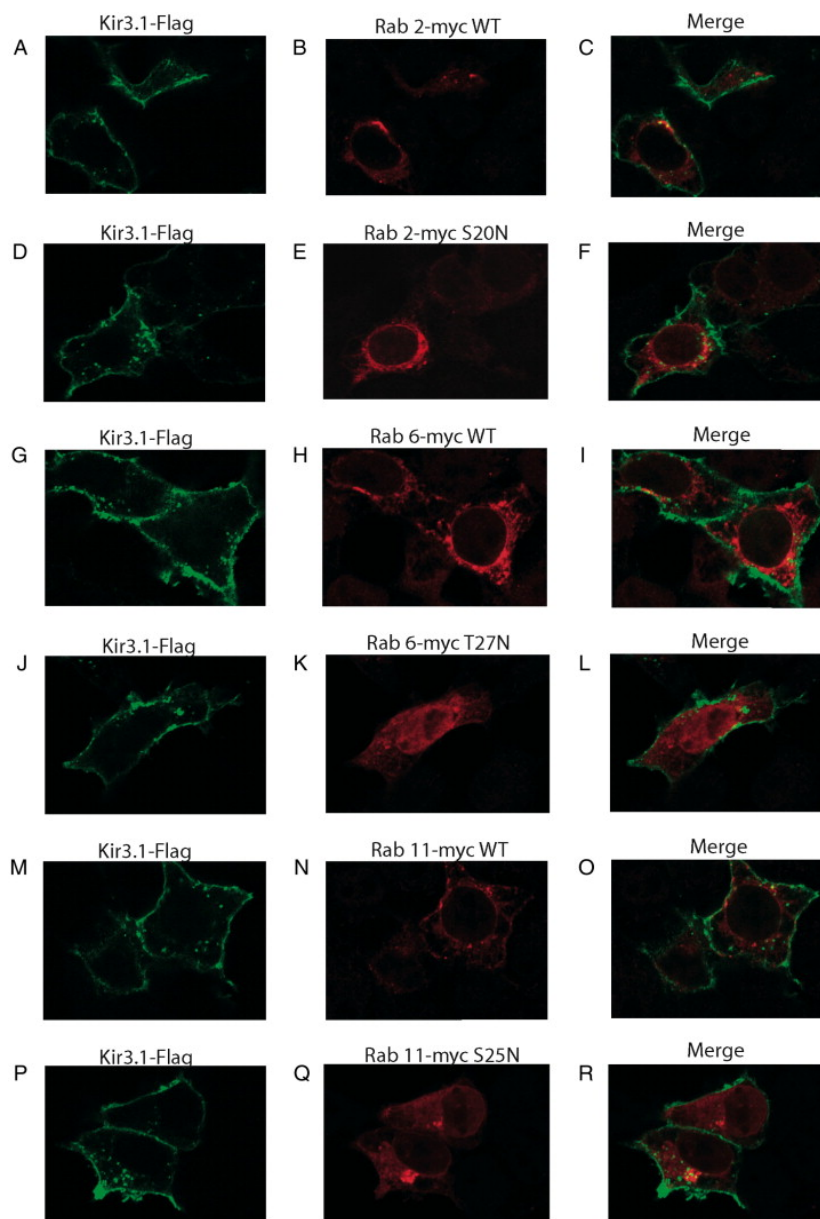


Figure 28 (Supplementary). *Kir3.1/Kir3.4* expression levels and distribution in the presence of WT and DN Rab isoforms.

HEK293 cells were transfected with extracellularly Flag-tagged Kir3.1, Kir3.4 and WT and DN Rab 2,6 or 11 isoforms. Cells were labelled with anti-Flag and then permeabilized to allow labelling of myc-tagged Rabs. Confocal microscopy show the cell surface localization of Flag-Kir3.1 in presence of Kir3.4 (left column), expression of the Rabs (middle column) and merged images (right column). Data are representative of at least 3 different experiments.

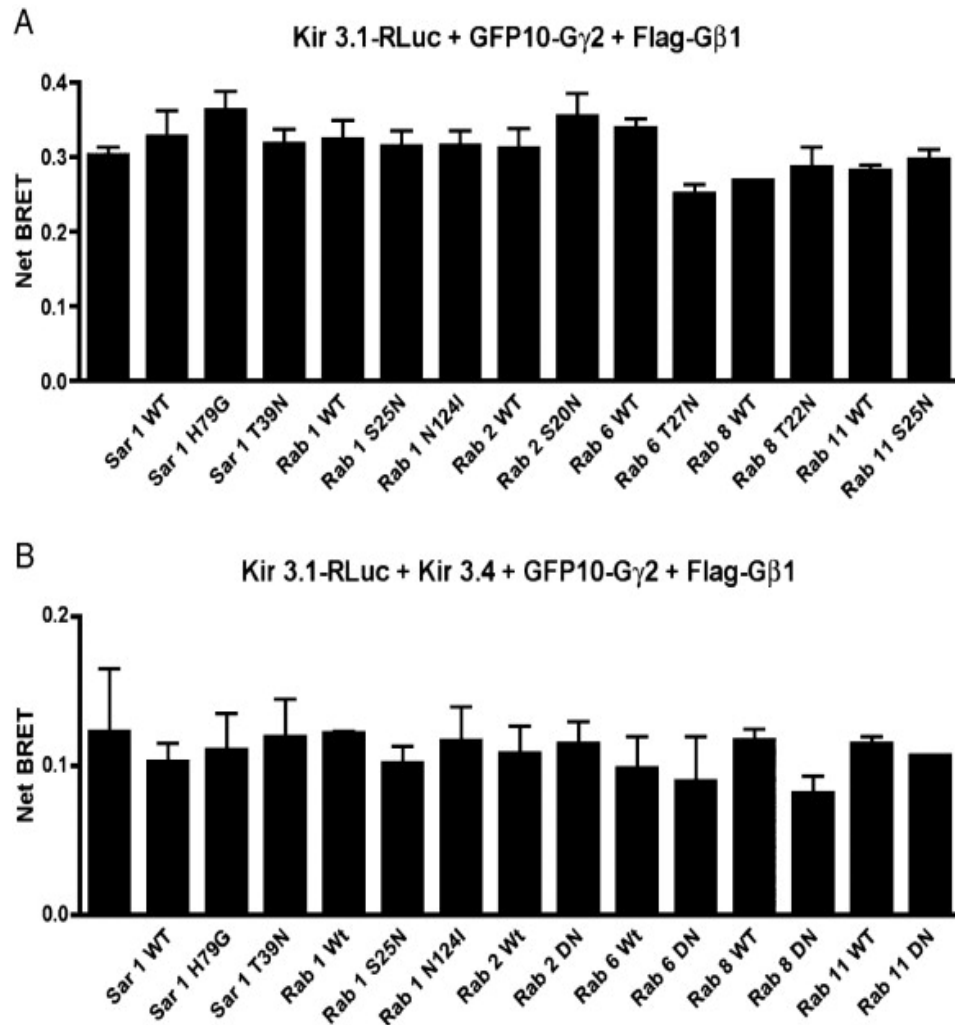


Figure 29 (Supplementary). *Kir3.1* and *G $\beta$  $\gamma$*  interact in the ER.

The interaction between Kir3.1-RLuc and GFP10-G $\gamma$ 2 (in the presence of Flag-G $\beta$ 1) was assessed by BRET in transfected HEK293 cells in the presence of the different WT and DN GTPase isoforms in the absence (A) or presence (B) of the Kir3.4 subunit. None of the DN GTPase constructs blocked the G $\beta$  $\gamma$  interaction with Kir3.1, indicative of an initial ER interaction of this complex. Data are expressed as net BRET mean  $\pm$  SEM for at least 3 different experiments. No differences were detected due to the presence of WT or DN Rab or Sar 1 isoforms in either A or B using a one-way ANOVA. Values were lower in B since Kir 3.4 can compete with Kir3.1-RLuc for interaction with GFP10-G $\gamma$ 2.

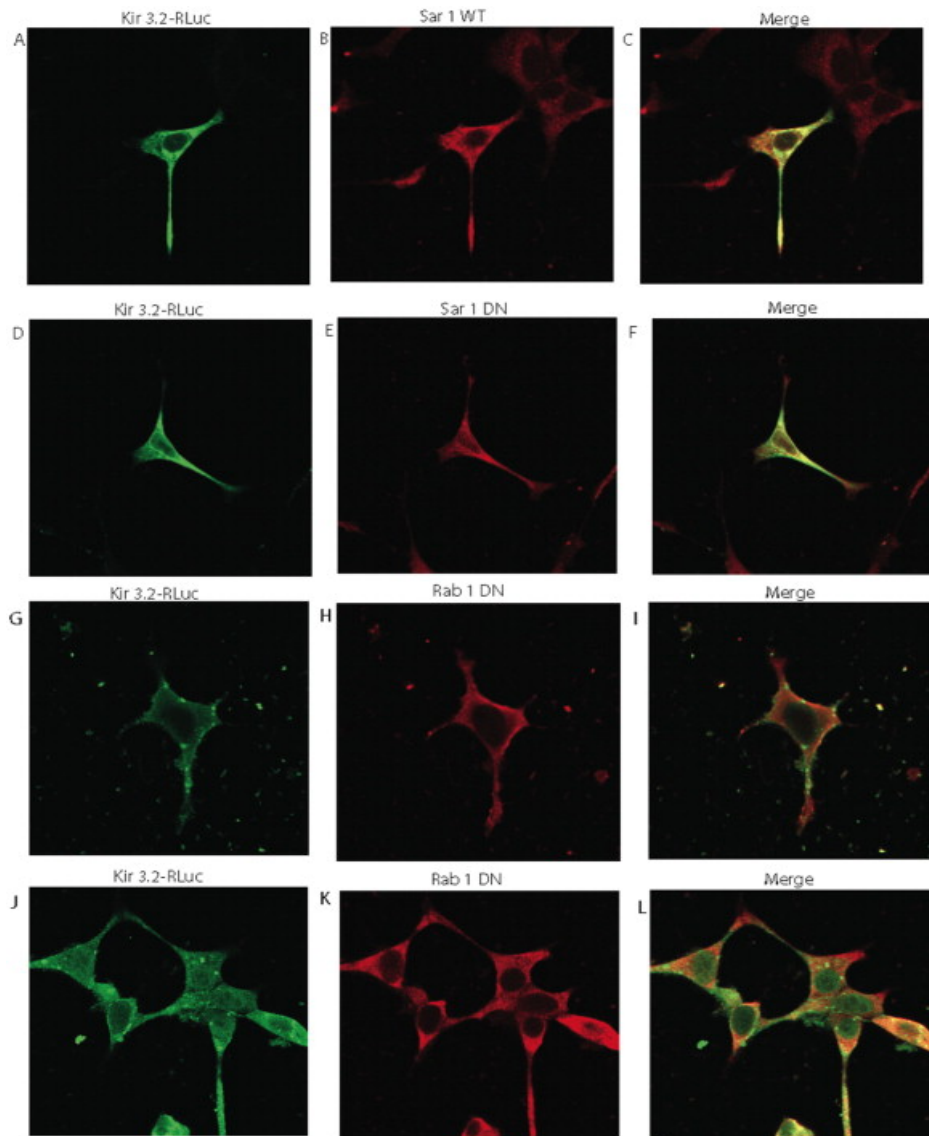


Figure 30 (Supplementary). *Effects of DN Sar 1 and Rab 1 on Kir3.2 trafficking.*

HEK293 cells were transfected with Kir3.2-RLuc and WT and DN Sar 1 or Rab 1 isoforms. Cells were permeabilized and labelled with anti-RLuc and anti-vsvG. Confocal microscopy shows the localization of Kir3.2-RLuc (left column), expression of the Rab1 or Sar 1 (middle column) and merged images (right column). Data are representative of at least 3 different experiments.

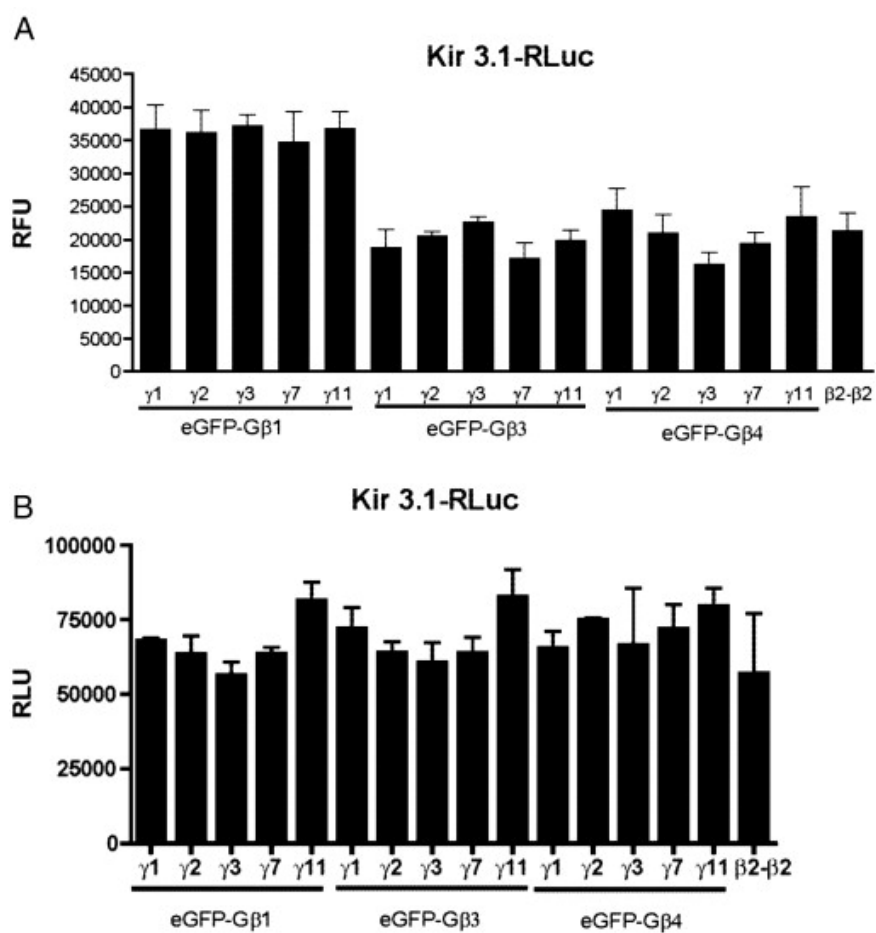


Figure 31 (Supplementary). Expression levels of BRET partners in experiments shown in Figure 23

A) Control of expression level of the different eGFP-G $\beta$  of the Figure 24A. B) Kir3.1-RLuc expression level of Figure 24A. Data are expressed as relative fluorescence or luminescence units (RFU or RLU) and represent mean  $\pm$  s.e.m. for at least 3 different experiments.

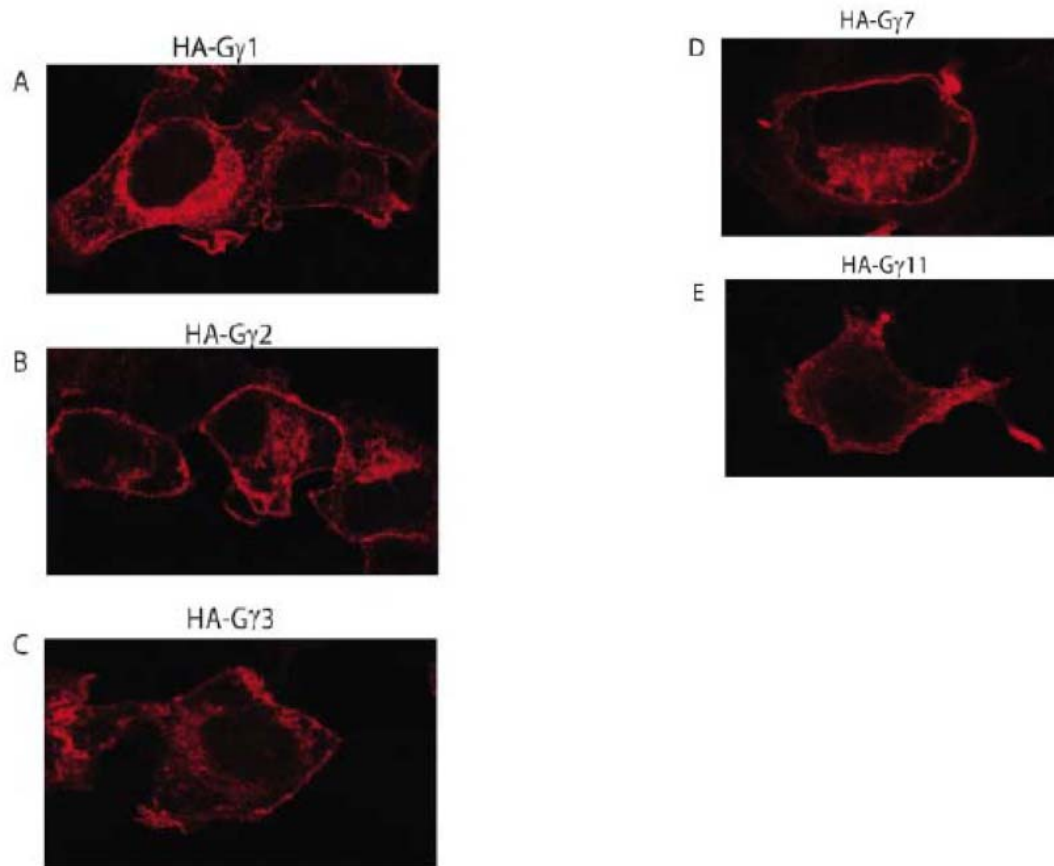


Figure 32 (Supplementary). Expression levels of different HA-tagged G $\gamma$  subunits used for experiments in Figure 24.

Confocal microscopy of permeabilized HEK293 cells transfected with Flag-G $\beta$ 1 and A) HA-G $\gamma$ 1, B) HA-G $\gamma$ 2, C) HA-G $\gamma$ 3, D) HA-G $\gamma$ 7, and E) HA-G $\gamma$ 11. Data are representative of at least 3 different experiments

## Chapitre 4

### **G $\beta$ $\gamma$ is a negative regulator of AP-1 mediated transcription**

Mélanie Robitaille, Ying Wang, Eugénie Goupil, Darlaine Pétrin, Stéphane A. Laporte,  
Daniel J. Bernard, and Terence E. Hébert

*Soumis à Embo Journal, Août 2009*

## Summary

Following activation of G protein-coupled receptors (GPCRs) at the cell surface, heterotrimeric G proteins are activated. Both  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$  subunits regulate specific effectors to transmit signals received by the receptor. Recent data suggest potential nuclear localization or translocation of the  $G\beta\gamma$  subunit. Here, we identified Fos transcription factors as novel interactors of the  $G\beta 1$  subunit, using protein fragment complementation assays, as well as co-immunoprecipitation in HEK 293 cells or rat brain lysates. Fos proteins dimerize with Jun proteins to form activator protein-1 (AP-1) transcription factor complexes, which regulate target gene expression. Co-expression of the  $G\beta\gamma$  dimer decreased phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-stimulated AP-1 gene reporter activity in HEK293 cells as well as the AP-1 dependent gonadotropin-releasing hormone-stimulated human follicle-stimulating hormone  $\beta$  reporter activity in L $\beta$ T2 gonadotrope cells.  $G\beta\gamma$  did not interfere with the dimerization of Fos and Jun or their ability to bind DNA. Rather,  $G\beta\gamma$  co-localized with the AP-1 complex in the nucleus and recruited histone deacetylases (HDAC) to inhibit AP-1 transcriptional activity.

## Introduction

Many extracellular signals, such as photons, hormones, or chemical compounds are natural ligands for GPCRs. Receptor activation leads to subsequent activation of heterotrimeric G proteins and a diverse array of downstream effectors. G $\beta$  and G $\gamma$  subunits are tightly associated and function as a unit under physiological conditions (Hildebrandt et al, 1984). Originally, the unique role of G $\beta\gamma$  dimers was thought to be prevention of spontaneous activation of the G $\alpha$  subunit (Neer, 1995). The first evidence of a more direct role for G $\beta\gamma$  dimer in effector regulation came in 1987 when G $\beta\gamma$  purified from bovine brain was shown to activate a cardiac potassium channel usually activated by muscarinic receptor stimulation (Logothetis et al, 1987). It is now well established that G $\beta\gamma$  can directly regulate several effectors, including distinct phospholipase C $\beta$  (Smrcka & Sternweis, 1993) and adenylyl cyclase isoforms (Taussig et al, 1994) as well as voltage-gated calcium channels (Zamponi et al, 1997). In addition to these now classical G $\beta\gamma$  effectors associated with the plasma membrane, a number of new intracellular G $\beta\gamma$  targets have been identified in different sub-cellular sites [reviewed in (Dupré et al, 2009)]. For example, G $\beta\gamma$  directly interact with the Golgi resident protein kinase PKD1 (Jamora et al, 1999) and the nuclear proteins histone deacetylase 5 (HDAC5) (Spiegelberg & Hamm, 2005), transcriptional repressor adipocyte enhancer-binding protein (AEBP1) (Park et al, 1999) and the glucocorticoid receptor (GR; Kino et al, 2005b).

Here, we identified a novel interactor for the G $\beta\gamma$  dimer, the transcription factors cFos and FosB. These transcription factors are members of the dimeric activator protein 1 (AP-1) transcription factor family, along with members of the Jun family. AP-1 transcription factors control cell proliferation and cell differentiation in response to various stimuli. In order to regulate gene transcription, Fos family members dimerize with Jun via their leucine zipper domains, whereas Jun isoforms can form functional homodimers.



However, Jun homodimers are less stable and less active than the Jun/Fos heterodimers (Smeal et al, 1989). We show that G $\beta\gamma$  interacts directly with FosB or cFos and decreases AP-1 transcriptional activity stimulated either by phorbol ester or gonadotropin-releasing hormone (GNRH1). G $\beta\gamma$  does not block Fos/Jun dimerization or their interaction with DNA, but recruits histone deacetylases (HDACs) thereby inhibiting AP-1 mediated transcriptional activity.

## Results

### *Gβ1 interacts with Fos*

Protein fragment complementation assays (PCA), including bimolecular fluorescence complementation (BiFC), are useful in screening for new direct protein-protein interactions. YFP can be fragmented into two peptides, YFP<sub>(1-158)</sub> and YFP<sub>(159-238)</sub>, which are not fluorescent either when expressed alone or when co-expressed. However, when the two fragments are brought together by fusing them to proteins that do associate, a functional YFP can be reconstituted [see (Kerppola, 2008; Michnick et al, 2007) for review]. Expression of Gβ1 when fused to the YFP<sub>(1-158)</sub> fragment and Gγ2 to the YFP<sub>(159-238)</sub> fragment results in complementation of YFP [(Hynes et al, 2004) and Figure 33a]. Unexpectedly, complementation was also detected in cells expressing Gβ1YFP<sub>(1-158)</sub> and FosYFP<sub>(159-238)</sub>, indicating a possible direct interaction between these two proteins. As described previously (Hu et al, 2002), JunYFP<sub>(1-158)</sub> and FosYFP<sub>(159-238)</sub> reconstituted YFP fluorescence in living cells. A Fos mutant, FosΔzipYFP<sub>(159-238)</sub>, where the leucine zipper domain was deleted, blocking AP-1 formation, abolished the BiFC signal (Figure 33a); as described previously (Hu et al, 2002). Cells expressing Gβ1YFP<sub>(1-158)</sub> and FosΔzipYFP<sub>(159-238)</sub> also showed a reduced fluorescent signal compared with the wild type indicating perhaps that dimerization of the AP-1 complex favored the interaction between Fos and Gβ1 or that the FosΔzipYFP<sub>(159-238)</sub> was less stable. No interaction was detected between JunYFP<sub>(1-158)</sub> and Gγ2YFP<sub>(159-238)</sub> or between Gβ1YFP<sub>(1-158)</sub> and the free YFP<sub>(159-238)</sub> (Figure 33a). We cannot exclude the possibility that Gβγ interacts with Jun as well but the complementation assays indicate that the interaction with Fos is direct.

Major limitations of PCA techniques are that overexpression of fused proteins may lead to false positive interactions and that YFP re-association is irreversible. This may result in the capture of unstable non-physiological interactions. In order to ensure that Gβ1

and Fos actually formed a stable complex, we performed co-immunoprecipitation in HEK 293 cells. Flag-G $\beta$ 1 was pulled down by either anti-FosB antibody (Figure 33b) or anti-cFos antibody (data not shown) in cells over-expressing both Fos and the G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 dimer, suggesting that G $\beta$ 1/Fos complexes are stable. No G $\beta$  was pulled down when Fos was not co-expressed or if membranes from cells expressing FosB and G $\beta$  $\gamma$  were solubilized and simply mixed (Figure 33b, lanes 3 and 4). To determine if this novel interaction could be detected *in vivo*, at physiologic levels of the endogenous proteins and to account for non-specific bands (which partially overlapped with G $\beta$  in HEK 293 cells), we treated rats with amphetamine, a known activator of FosB transcription (Alibhai et al, 2007; Nye et al, 1995). Proteins from isolated striatal samples were solubilized and G $\beta$ 1-4 proteins were pulled down by anti-FosB antibodies but not by normal rabbit IgG (Figure 33c). Thus, the G $\beta$  $\gamma$  interaction with Fos can be detected by two independent techniques and is observed *in vivo*.

#### *Inhibition of AP-1 transcriptional activity by G $\beta$ 1*

In an effort to identify the functional relevance of the interaction between G $\beta$  $\gamma$  and Fos, gene reporter assays using AP-1 dependent promoters were performed. We first used a luciferase reporter under the control of an artificial promoter composed of four repeats of the consensus DNA binding sequence for AP-1 (Chen et al, 1997). In order to activate the transcriptional activity of AP-1, cells were treated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a potent activator of PKC and subsequently AP-1 activity. Over-expression of the G $\beta$ 1 subunit led to a 50% reduction in PMA-stimulated AP-1 activity, whereas overexpression of G $\gamma$ 2 alone had no effect (Figure 34a). Overexpression of G $\gamma$ 2 with G $\beta$ 1 yielded marginally better inhibition than G $\beta$ 1 expressed alone. Though these data suggest that the G $\gamma$  may not be required for the Fos interaction, it was possible that endogenous levels were sufficient to partner with over-expressed G $\beta$ . To address this idea, we over-expressed a mutated G $\beta$ 1 subunit with reduced ability to interact with G $\gamma$ 2 (G $\beta$ 1I18E,

(Pellegrino et al, 1997)). G $\beta$ 1I18E was not as efficient as WT G $\beta$ 1 in reducing PMA-induced AP-1 reporter activity (data not shown). Further, Fos does not compete for interactions between G $\beta$  and G $\gamma$  (Figure 40 (Supplementary)) indicating that it is likely the G $\beta\gamma$  dimer which interacts with Fos and not simply G $\beta$ .

We then performed experiments where we knocked down G $\gamma$ 2 expression in HEK 293 cells using shRNA. As can be seen in Figure 34b, transfection of a stable HA-tagged G $\gamma$ 2 cell line with an shRNA targeted against G $\gamma$ 2, efficiently reduced G $\gamma$ 2 expression and also increased basal reporter gene activity as well as the response to PMA stimulation. Similar results were obtained by knocking down G $\beta$ 1 (data not shown). Taken together, these data show that increasing expression of G $\beta\gamma$  reduces AP-1 transcriptional activity, whereas reducing G $\beta\gamma$  expression engenders the opposite effect.

Next, we confirmed the inhibitory activity of G $\beta\gamma$  dimers on AP-1 mediated *trans*-activation in a more physiologically relevant context. Gonadotropin-releasing hormone (GNRH1) stimulates transcription of the human follicle-stimulating hormone  $\beta$  subunit gene (*FSHB*) in pituitary gonadotrope cells via AP-1 proteins binding to a conserved proximal *cis*-element (Wang et al, 2008). Here, GNRH1 stimulated a greater than 20-fold induction of a human *FSHB* luciferase reporter in the gonadotrope cell line L $\beta$ T2 (Figure 34c). Co-transfection of any of the five G $\beta$  subunits with G $\gamma$ 2 resulted in a 50-75% reduction in GNRH1-stimulated reporter activity (Figure 34c). Further experiments were done using G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 since it was the combination that appeared most efficient. G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 efficiently inhibited activation of the *FSHB* reporter in the presence of several combinations of overexpressed AP-1 proteins, FosB/cJun, FosB/JunB and cFos/JunB (data not shown). Collectively, these data indicate that G $\beta\gamma$  dimers may function as generalized antagonists of AP-1 mediated transcription.

### *Localization of the AP-1/G $\beta\gamma$ complex*

According to the classical paradigm, G $\beta\gamma$  dimers mainly function at the plasma membrane whereas AP-1 transcription factors function in the nucleus. Confocal microscopy was therefore used to localized the site(s) of Fos/G $\beta$  interaction. The G $\beta$ 1 and Fos BiFC pair showed a diffuse expression pattern across both the cytoplasm and the nucleus, whereas endogenous c-Jun was localized exclusively to the nucleus (Figure 35a). A similar distribution was seen when either EGFP-G $\beta$ 1 or HA-tagged G $\beta$ 1 was used (data not shown). Sub-cellular fractionation of CHO cells transfected with either or both the AP-1 complex partners and the G $\beta\gamma$  dimer showed G $\beta$ 1 predominantly in the cytoplasmic fraction when compared with the nuclear fraction. However, co-expression of the G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 dimer with both c-Fos and c-Jun resulted in translocation or accumulation of some tagged G $\beta$ 1 in the nuclear fractions (Figure 35b top panel). Endogenous G $\beta$  was distributed to both compartments as well. c-Fos was detected equally in both cytoplasmic and nuclear fractions and interestingly, the amount of c-Fos detected was increased when G $\beta\gamma$  was co-expressed, suggesting that it might stabilize the c-Fos protein (Figure 35b, middle panel). In order to validate sub-cellular fractionation and gel loading, specific markers of the cytoplasmic (GAPDH) and nuclear (Nup62) fractions were used (Figure 35b bottom panels).

### *Mechanism of AP-1 activity inhibition by G $\beta\gamma$*

As described above, over-expression of G $\beta\gamma$  inhibits AP-1 transcriptional activity. We next endeavored to explore the connection between this observation and the direct interaction between Fos and G $\beta\gamma$ . Inhibition of AP-1 activity could arise through many possible mechanisms. The observation that over-expression of G $\beta$ 1 stabilized c-Fos protein expression (Figure 35) effectively excluded the possibility of down-regulation of AP-1 proteins. FosB, cJun, and JunB were all stably expressed in the presence of G $\beta\gamma$  (data not shown). Another possible mechanism by which G $\beta\gamma$  might inhibit AP-1 activity could be

through competition with Jun for binding to Fos. In order to assess this possibility, we transfected cells with cJun and FosB or cFos, in presence of increasing amounts of G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 dimer. The expression of G $\beta$  $\gamma$  did not alter the amount of c-Jun proteins immunoprecipitating with cFos whereas it seemed to increase the interaction between FosB and c-Jun (Figure 36).

A third hypothesis was that G $\beta$  $\gamma$  might inhibit AP-1 binding to DNA. We tested this possibility using electromobility shift assays (EMSA). cJun with cFos or FosB over-expressed in CHO cells increased binding activity to a double-stranded probe containing the AP-1 site in the human *FSHB* promoter (Figure 37a, lanes 3 and 4). Co-expression of A-Fos, a dominant-negative inhibitor of AP-1/DNA binding (Olive et al, 1997), completely abrogated binding by both AP-1 pairs (lanes 7 and 8). In contrast, co-expression of G $\beta$  $\gamma$  did not block, but may have even potentiated both endogenous (Figure 37, lane 6) and exogenous Fos/Jun binding to the probe (Figure 37a, lanes 9 and 10). Thus, G $\beta$  $\gamma$  did not reduce the association between AP-1 and DNA. Examination of the nuclear and cytosolic fractions used in these assays indicated that G $\beta$  $\gamma$  did not alter the abundance or sub-cellular distribution of FosB or cJun, and slightly increased cFos levels (as described above). This contrasts with A-Fos, which appeared to inhibit cFos expression as well as block nuclear accumulation of both cJun and FosB (Figure 37B).

As G $\beta$  $\gamma$  did not block either AP-1 formation or its interaction with DNA, we next considered whether G $\beta$  $\gamma$  might effect AP-1 association with transcriptional co-activators or co-repressors. We first looked at the association of cFos/cJun with p300/CBP, a histone acetyltransferase component recruited as a transcriptional co-activator (Bannister & Kouzarides, 1995). No difference was detected in the ability of cFos to co-immunoprecipitate p300/CBP (Figure 41(Supplementary)). We then considered whether the mechanism of inhibition could involve recruitment of transcriptional co-repressors. In

the literature, a number of repressor complexes associated with AP-1 dimer include the HDAC3 protein (Jin et al, 2002; Zhang et al, 2002). As mentioned above, a novel interaction between HDAC4 and HDAC5 and the G $\beta$ 1 proteins was been reported recently (Spiegelberg & Hamm, 2005). We first determined whether we could verify the interaction between G $\beta$  $\gamma$  and the HDACs and then examined the effect of c-Jun and c-Fos co-expression on this interaction. Under basal conditions, we detected an interaction between G $\beta$  $\gamma$  and Flag-HDAC4 by co-immunoprecipitation as well as very weak interactions between G $\beta$ 1 and Flag-HDAC3 or Flag-HDAC5 (Figure 38a, lanes 2-4). Interestingly, co-expression of the AP-1 dimer (cFos and cJun) dramatically increased the association of the three HDAC sub-types co-immunoprecipitating with G $\beta$  $\gamma$  (Figure 38a, lanes 5-8). Loading controls show equivalent expression of HDAC isoforms and G $\beta$  $\gamma$  whether or not cFos and cJun were co-expressed (Figure 38b-d). Taken together, these data suggested that G $\beta$  $\gamma$  complex formation with HDACs is potentiated by AP-1 proteins.

The enhanced HDAC recruitment might explain, at least in part, the observed G $\beta$  $\gamma$  inhibition of AP-1 activity. To test this notion directly, we first assessed the effect of HDAC over-expression on AP-1 transcriptional activity. As shown earlier, G $\beta$  $\gamma$  overexpression reduced PMA stimulated AP-1 reporter activity (Figure 34 and Figure 39a). HDAC3 expression similarly reduced basal and PMA-induced reporter activity, whereas HDACs 4 and 5 only affected the PMA induction (Figure 39a). Inhibition of HDAC activity with TSA also reduced the effect of G $\beta$  $\gamma$  on AP-1 (Figure 39a, inset). When HDACs and G $\beta$  $\gamma$  were expressed together, inhibition of transcriptional activity was maximal for all three HDAC isoforms tested, suggesting that they acted in concert. To demonstrate that G $\beta$  $\gamma$  enhances HDAC recruitment to AP-1 *cis*-elements, we conducted ChIP assays using the *FSHB* reporter construct in HEK 293 cells. We detected little HDAC5 associated with the promoter when expressed with cFos/cJun alone (Figure 39b, lane 3). However, when G $\beta$  $\gamma$  was co-expressed with cFos/cJun, we observed enhanced

HDAC5 association with the promoter (Figure 39b, lane 4). Controls with unrelated antibodies (lanes 5 and 6) or no antibodies (lanes 7 and 8) indicated the specificity of the effect. In summary, these data suggest that through its association with both Fos proteins and HDACs, G $\beta$  $\gamma$  can induce transcriptional silencing of AP-1-sensitive promoters.



## Discussion

G proteins are involved in numerous signalling pathways regulated by GPCRs. Recently, however, a number of novel interactors of G $\beta\gamma$  have been identified as have G $\beta\gamma$ -dependent signalling events, some of which are independent of the receptor *per se* [for review see (Dupré et al, 2009)]. Interestingly, a number of these events occur at sub-cellular sites distinct from the plasma membrane. Among these, a number of nuclear targets for G $\beta\gamma$  have been identified. We report here a novel interaction between G $\beta\gamma$  and members of AP-1 complexes, Fos proteins. This interaction inhibits AP-1 transcriptional activity at least partially via recruitment of HDAC proteins into a complex containing G $\beta\gamma$  and AP-1 proteins.

### *A direct interaction between Fos and G $\beta$*

Protein complementation techniques are useful for detecting protein/protein interaction in living or intact cells (reviewed in (Kerppola, 2008; Michnick et al, 2007; Remy et al, 2002)). In one type of these assays, the coding region for a GFP variant is split and each half fused to two potential interacting proteins (Hu et al, 2002; MacDonald et al, 2006; Remy et al, 2004). Only when the two proteins interact is GFP reconstituted. G $\beta\gamma$  normally regulates its effectors' activity by direct interactions [see (Dupré et al, 2009) for review]. Our co-immunoprecipitation experiments indicated that Fos and G $\beta\gamma$  are part of the same complex, and the BiFC/PCA technique showed that their interaction is direct. The FosYFP<sub>(159-238)</sub> and JunYFP<sub>(1-158)</sub> plasmids were constructed such that they only encoded the bZIP domains of cJun and cFos (Hu et al, 2002). This domain includes the basic region responsible for DNA binding and the leucine zipper required for dimerization of cJun and cFos. That an interaction between G $\beta$ 1YFP<sub>(1-158)</sub> and FosYFP<sub>(159-238)</sub> was detected by fluorescence complementation indicates that the binding site of G $\beta$ 1 on cFos likely overlaps with the these two domains. The fluorescent signal decreased when G $\beta$ 1 was

expressed with the truncated version of FosYFP<sub>(159-238)</sub> in which residues 179–193 of the leucine zipper were deleted. This suggests that these residues stabilize the complex Gβ1/Fos, but we cannot rule out that the FosΔzipYFP<sub>(159-238)</sub> is physically less stable than is wild type counterpart. Further studies need to be done to identify the specific residues important for the interaction of Fos with Gβ1.

*Where do Gβ and Fos interact?*

cFos can be detected in the cytoplasm under various conditions and translocation to the nucleus depends on both extra- and intracellular signals. In cells constitutively expressing cFos protein, cFos becomes progressively and exclusively cytoplasmic within a few hours following serum starvation (Roux et al, 1990; Vriza et al, 1992). Cytoplasmic cFos may have an important biological function. It has been reported that the cytoplasmic cFos can become membrane-associated to the ER and may regulate metabolism of phospholipids, a mechanism independent of AP-1 transcriptional activity (Bussolino et al, 2001), which may be required for neurite elongation (Gil et al, 2004). Although cFos can shuttle between the nucleus and the cytoplasm, cJun is predominately localized to the nucleus (Malnou et al, 2007). The heterodimerization of cFos with cJun likely decreases cFos shuttling and retains it in the nucleus (Malnou et al, 2007).

Perhaps more surprisingly, Gβγ dimers can also be found in the nucleus in addition to their plasma membrane-bound location. However, Gβγ dimers are probably less able to translocate to the nucleus and require association with proteins that can target them to that sub-cellular compartment. For example, RGS proteins mediate localization of Gβ5 (independently of Gγ) to the nucleus (Rojkova et al, 2003; Zhang et al, 2001). Gγ5-containing combinations of Gβγ can interact with the adipocyte enhancer-binding protein (AEBP1), a transcriptional repressor (Park et al, 1999). Gβγ also interacts with the glucocorticoid receptor and is translocated to the nucleus in the presence of the GR agonist

dexamethasone (Kino et al, 2005a; Kino et al, 2005b).  $G\beta\gamma$  association with the GR results in suppression of transcriptional activity and this was dependent on the presence on an intact AF-2 domain in the GR; however, the mechanism of repression was not explored in detail and it is unclear as to whether it involves HDAC recruitment, as we describe here (Kino et al, 2005b).

Interestingly, heterotrimeric G proteins may also be involved in the non-genomic actions of steroid receptors as well (see for example (Kumar et al, 2007), suggesting that there may be extranuclear functional consequences to these interactions. These previous observations and our own data indicate that cFos and  $G\beta\gamma$  might interact together in the cytoplasm and that this interaction favors  $G\beta\gamma$  entry to the nucleus, as seen in Figure 35 and Figure 37. Although the level of  $G\beta\gamma$  in the nucleus varied from experiment to experiment, it was consistently localized there and consistently co-localized with AP-1 proteins. We noted that all five  $G\beta$  subunits were capable of inhibiting activity in reporter assays (Figure 34c).

#### *G $\beta\gamma$ is implicated in the control of transcription*

Expression of  $G\beta\gamma$  did not prevent the formation of the AP-1 complex and indeed seemed to stabilize or increase levels of FosB/cJun complexes (compared with cFos/cJun; Figure 36, Figure 37b). Whether this was at the level of protein/protein interactions, changes in rates of degradation or because net synthesis of particular AP-1 subunits was altered remains to be determined. There is some evidence that  $G\beta\gamma$  may actually regulate Fos expression (Sun et al, 1999). It would be interesting to determine if more stable AP-1 components such as Fra-1 and Fra-2 are also sensitive to  $G\beta\gamma$ .  $G\beta\gamma$  did not alter the interaction of various combinations of AP-1 subunits with a promoter reporter as shown by EMSA (Figure 37). However, transcriptional inhibition may have in part been mediated through the recruitment of HDAC proteins (Figure 38 and Figure 39). HDAC3 has

previously been detected as part of Fos/Jun transcriptional complexes (Ogawa et al, 2004; Weiss et al, 2003). Both these studies demonstrated that phosphorylation of cJun by JNK relieved the inhibitory effects of HDAC3 association. We have demonstrated that G $\beta$  $\gamma$  in the presence of Fos and Jun becomes stably associated with several different HDAC subtypes and that a complex containing HDAC5 is recruited to an AP-1-sensitive promoter in G $\beta$  $\gamma$ -dependent fashion (Figure 38 and Figure 39).

The nuclear effects of G $\beta$  $\gamma$  can lead to both activation and repression of the transcription depending on the transcription factor or the promoter in question. For example, interaction of G $\beta$  $\gamma$  with AEBP1 activates transcription (Park et al, 1999) whereas interaction with the glucocorticoid receptor (Kino et al, 2005b) or AP-1 results in the inhibition of transcription. Interestingly, the recruitment of HDAC subtypes by G $\beta$  $\gamma$  may also lead to distinct outcomes depending on the promoter involved. It has been reported that direct interaction between HDAC5 and G $\beta$  $\gamma$  enhanced MEF2 transcriptional activity by inhibiting HDAC activity (Spiegelberg & Hamm, 2005), in contrast with what we have shown here regarding the activity of AP-1. We also did not see any effect of the G $\beta$  $\gamma$  inhibitor  $\beta$ ARK-CT on transcriptional inhibition of AP-1 (data not shown) whereas it blocked the modulation of MEF2 activity (Spiegelberg & Hamm, 2005). This suggests that G $\beta$  $\gamma$  may directly affect gene transcription but that multiple outcomes are possible depending on the particular constituents of G $\beta$  $\gamma$ -containing transcriptional complexes and further that the structural features of these complexes might be distinct. We did not assess directly whether G $\beta$  $\gamma$  modulated HDAC activity *per se* but our data indicating additivity when G $\beta$  $\gamma$  and HDAC were co-expressed (particularly with HDAC4, (Figure 39a)). In addition, chemical inhibition of HDACs led to increased AP-1 reporter activity in the presence of G $\beta$  $\gamma$ , indicating that there are likely distinct outcomes and mechanisms at play which depend on the nature of the complexes and promoters involved. We cannot rule out

the involvement of other endogenous HDAC isoforms, which may compete for G $\beta\gamma$ . Experiments with more selective HDAC inhibitors may be informative in this regard [reviewed in (Kazantsev & Thompson, 2008)].

*Inhibition of AP-1 activity by G $\beta\gamma$  is part of a feedback loop?*

cFos transcription can be activated by several GPCRs. M2 muscarinic receptor stimulation leads to activation of the cFos promoter and this event is mediated through Gq and G $\beta\gamma$ , and is dependent on ERK and JNK (Sun et al, 1999). On one hand, activation of heterotrimeric G proteins leads to activation of cFos transcription, whereas on the other, subsequent interaction of G $\beta\gamma$  with AP-1 proteins decreases transcriptional activity providing, in effect, a negative feedback loop. The source of G $\beta\gamma$  for these two classes of events may in fact be different, i.e. the formation of G $\beta\gamma$ /transcription factor complexes may not necessarily be receptor-dependent and these proteins may interact directly following their biosynthesis. Over-expression of G $\alpha_q$  did not alter the response of the AP-1 reporter to the presence of G $\beta\gamma$  suggesting that this is the likely case (data not shown). Interestingly, the promoter for G $\beta_1$  contains putative AP-1 response elements (Kitanaka et al, 2002). *De novo* synthesis or release of G $\beta\gamma$  may therefore result from increased levels of Fos synthesis. We noted that all five G $\beta$  subunits were capable of inhibiting activity in reporter assays (Figure 34c), suggesting that this may be a common feature of G $\beta\gamma$  signalling. Taken together, we have identified a number of novel G $\beta\gamma$  interacting proteins which expand the roles that they sub-serve in cellular signalling.

## Materials and Methods

### *Constructs*

Flag-G $\beta$ 1-5 and HA-G $\gamma$ 2 were obtained from UMR cDNA Resource Center ([www.cdna.org](http://www.cdna.org)). HA-TAP-tagged-G $\beta$ 1 and G $\gamma$ 2 were engineered from Flag-G $\beta$ 1 or HA-G $\gamma$ 2 plasmids by and then ligated into the *EcoRI* and *BamHI* sites of the TAP-tag vector pIRESpuro-GLUE (from Dr. Stéphane Angers, University of Toronto, (Angers et al, 2006). YFP (1-158)-G $\beta$ 1 and YFP (158-239)-G $\gamma$ 2 were used as previously described (Rebois et al, 2006). FosYFP<sub>(1-158)</sub>, Fos $\Delta$ zipYFP<sub>(1-158)</sub>, cJun-YFP<sub>(158-239)</sub> and YFP<sub>(1-158)</sub> constructs were a generous gift from Dr. Tom Kerppola (University of Michigan). Mammalian expression vectors for FosB and cJun were obtained from Eric Nestler (University of Texas Southwestern Medical Center). The c-Fos and JunB expression vectors were from Drs. Paul Dobner (University of Massachusetts) and Alain Mauviel (Hôpital Saint-Louis, Vellefaux), respectively. A 4X AP-1-luciferase reporter construct was obtained from Dr. Steven Hyman at Harvard University. The HA-tagged p300 construct was obtained from Dr. Ralf Janknecht at the Mayo Clinic. Flag-HDAC3, Flag-HDAC4 and Flag-HDAC5 constructs were obtained from Dr. Eric Olson (University of Texas Southwestern Medical Center). Rluc-tagged G $\beta$ 1 and GFP-G $\gamma$ 2 constructs were used as described (Rebois et al, 2006; Robitaille et al, 2009). The human follicle-stimulating hormone  $\beta$  promoter-reporter was described in (Wang et al, 2008). shRNA vectors targeting G $\beta$ 1 and G $\gamma$ 2 as well as the pLKO.1 control vector were obtained from Open Biosystems (TRCN0000036779 and TRCN0000142146, respectively). A vector encoding G $\beta$ 1I18E was a generous gift of Dr. W.F. Simonds (NIH, Bethesda, MD). G $\beta$ 1I18E was also engineered into the Flag-G $\beta$ 1 vector using the Quikchange system (Stratagene).

### *Cell culture and transfection*

HEK 293, CHO and L $\beta$ T2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (Invitrogen) supplemented with 5%, 5% and 10% fetal bovine serum (Hyclone) respectively and penicillin/streptomycin or gentamycin (Invitrogen) at a final concentration of 100 U/ml and 100  $\mu$ g/ml. CHO cells were cultured in DMEM/F-12 (Hyclone) supplemented with 5% fetal bovine serum (Hyclone) and penicillin streptomycin (Invitrogen) at a final concentration of 100 U/ml and 100  $\mu$ g/ml respectively. CHO cells and HEK 293 cells were transfected with PEI (polyethylenimine; Sigma) (1mg/ml stock) used at 1:3 ratio with DNA whereas L $\beta$ T2 cells were transfected with Lipofectamine 2000 as previously described (Wang et al, 2008). Stable cell lines with HA-TAP-tagged G $\beta$ 1 or G $\gamma$ 2 in pIRESpuro-GLUE were generated using puromycin selection.

### *Fos induction and protein isolation from rat brain*

Amphetamine sulphate dissolved in 0.9% saline (Sigma-Aldrich Co. Ltd, Poole, Dorset, UK) was administered to four 250g male Long-Evans rats by intraperitoneal injection at a dose of 4 mg/kg. Three hours after treatment, rats were killed by rapid decapitation, brains were dissected to isolate the left and right striata and snap frozen under liquid nitrogen. Striatal tissue was homogenized (Dounce Potter) in 3 ml of lysis buffer (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and 1X protease inhibitor), incubated on ice for 1 hour and then centrifuged at 45 000  $\times$  g for 30 minutes. All animal experiments were performed in accordance with institutional and federal guidelines.

### *Protein complementation assays*

PCA experiments were conducted as previously described (Dupré et al, 2006; Dupré et al, 2007; Rebois et al, 2006). Briefly, 48 hr after the transfection in 6-well plates with the split YFP-tagged fusion protein-containing vectors, cells were washed twice with PBS,

resuspended in PBS + (0.1% glucose and 1x protease inhibitor) and distributed into 96-well microplates (white Optiplate; Perkin Elmer Life and Analytical Sciences). Fluorescent signals were collected using a 485/10 filter (excitation) and 535/25 filter (emission) on a Packard Fusion instrument (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences).

#### *Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)*

BRET was performed as described previously (Dupré et al, 2007; Rebois et al, 2006). Briefly, HEK-293 cells were co-transfected with vectors expressing the GFP- and Rluc-fusion proteins. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested and washed once with phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then suspended in PBS+ (PBS + 0.1% glucose), and distributed into 96-well microplates (white Optiplate; PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Experiments were conducted using the BRET<sup>2</sup> technology, using Coelenterazine 400a at a final concentration of 5  $\mu$ M. Signals were collected on a Packard Fusion instrument (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) using either 410/80-nm (luciferase) and 515/30-nm (GFP) band pass filters for GFP<sub>10</sub> constructs. Whether or not BRET occurred was determined by calculating the ratio of the light passed by the 515/30 filter to that passed by the 410/80 or 535/25 to the 450/58 filter.

#### *Confocal microscopy*

The day after transfection in 6-well plates, HEK 293 cells were seeded on glass coverslips. Twenty-four hr after seeding, cells were washed twice with 1X PBS (pH 7.3) and fixed with 2% paraformaldehyde for 20 min followed by three washes of 1X PBS. Cells were blocked and permeabilized 60 min at room temperature in 2% normal goat serum (Jackson Immuno Research Laboratories) and 0.2% Triton X-100 (Sigma) in 1X PBS. Permeabilized cells were incubated overnight at 4°C with anti-cJun antibodies (BD Biosciences) diluted 1:200 in 1X PBS containing 1% normal goat serum and 0.04% Triton X-100. Following incubation, cells were washed three times with 1X PBS and incubated 45



min at room temperature with secondary antibody goat anti-mouse Alexa fluor 555 (Molecular Probes) diluted 1:600 in 1% normal goat serum and 0.04% Triton in 1X PBS. Cells were washed three times, fixed on microscope slides, and examined on a Zeiss LSM-510 Meta laser scanning microscope with a 63 x oil immersion lens. YFP, goat anti-mouse Alexa-Fluor 555- and goat anti-rabbit Alexa-Fluor 647- conjugated antibodies were visualized using the multitrack mode with dual excitation (514 nm for YFP, 543 nm for Alexa-555, 633 nm for Alexa-647) and emission (BP 530-600 nm for YFP, BP 605-615 nm for Alexa-555, LP 650 for Alexa-647 nm) filter sets.

#### *Preparation of nuclear extracts*

Forty-eight hr after transfection in 100 mm culture dishes, CHO cells were washed twice with cold 1X PBS supplemented with 0.6 mM EDTA. Cells were scraped and harvested in 1 ml of cold 1X PBS-0.6 mM EDTA and spun at 5000 x g for 30 sec. The pellet was resuspended in 800 µl of Buffer A (10 mM Tris pH 8, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml aprotinin). Cells were allowed to swell for 15 min on ice. Twenty five µl of 10% NP-40 was added, followed by vortexing for 5 sec and a further incubation on ice for 1 min. Nuclei were pelleted by centrifugation at 12 000 x g for 5 sec. The supernatant, representing the cytosolic fraction was collected and the nuclear pellet was washed briefly with Buffer A followed by brief centrifugation. The nuclear pellet was then resuspended in 150 µl of buffer B (20 mM Tris pH 8, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin and 1 µg/ml aprotinin) and incubated at 4°C with shaking for 1 hr. Non-solubilized material was removed by centrifugation at 12 000 x g for 5 minutes at 4°C.

### *Immunoprecipitation/Western Blotting*

Forty-eight hr after transfection in T75 culture dishes, HEK 293 cells were washed three times with 1X PBS and harvested in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1% SDS, 1% Tergitol, 1x protease inhibitor, 0.5% sodium deoxycholate). Cells were incubated at 4°C with shaking for 1 hr, sonicated for 5 sec, and non-solubilized material removed by centrifugation at 10000  $\times$  g for 20 min at 4°C. Five hundred  $\mu$ g of HEK 293 cell or striatal tissue lysate was pre-cleared with 40  $\mu$ l of anti-mouse or anti-rabbit agarose beads at 4°C with shaking for 1 hr. Cell lysates were incubated overnight with 3  $\mu$ l of anti-cFos (Santa Cruz), anti-FosB (Santa Cruz) or anti-HA (Covance) at 4°C with shaking. Brain lysates were incubated with 1.2  $\mu$ g of anti-FosB (Santa Cruz) or 1.2  $\mu$ g of normal rabbit IgG. Forty  $\mu$ l of anti-rabbit agarose beads were added to the mixture and incubated with shaking at 4°C for 3 hr. Beads were washed once with their respective lysis buffers, three times with lysis buffer containing 1M NaCl, and once again with the lysis buffer. Proteins were resuspended in SDS-PAGE sample buffer and heated for 15 min at 65°C. Following electrophoresis, proteins from lysates (25  $\mu$ g) or immunoprecipitations were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and detected with anti-Flag polyclonal (Sigma, 1:1000), anti-anti-HA monoclonal (Covance, 1:5000), anti-cJun (BD Biosciences, 1:500), anti-G $\beta$ 1-4 polyclonal (Santa Cruz, 1:3000), anti-GAPDH (Ambion 1:20000) or anti-Nup62 (BD Biosciences 1:3000) antibodies. HRP-conjugated secondary antibodies were from Sigma (anti-mouse or anti-rabbit, 1:20000). Detailed information on antibody usage is available upon request.

### *Gene reporter assays*

The day after transfection, HEK 293 cells were serum starved overnight and then treated for 6 hours with 100 nM PMA or the vehicle equivalent of DMSO. Cells were washed twice with 1X PBS and harvested in lysis buffer (0.1 M potassium phosphate buffer pH7.8, 1% Triton-X100, 1 mM DTT and 2 mM EDTA) for 15 min at 4°C with shaking.

Lysates were collected and non-solubilized material was removed by centrifugation 10000 x g for 5 sec. Twenty  $\mu$ l of lysate was distributed into 96 well microplates (White Optiplate; Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) and 100  $\mu$ l of assay buffer (30 mM Tricine, 2 mM ATP, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, 1 mM D-Luciferin, 1mM CoA) was added to individual wells just prior their reading. Measurement of luciferase activity was taken for 30 sec using a Synergy 2 microplate reader (Biotek). In some cases, cells were treated with trichostatin A (Sigma) for 24 hours at the concentrations indicated in the text.

Reporter assays in L $\beta$ T2 cells were performed as previously described (Wang et al, 2008). Briefly, cells were plated in 24-well plates and transfected two days later using the human *FSHB*-luc reporter and the indicated expression constructs using Lipofectamine 2000. The amount of DNA transfected was balanced across conditions. The following day, cells were washed and then incubated overnight in serum free DMEM. Cells were then treated with vehicle or 100 nM GNRH1 (Sigma) for 6 h prior to collection of lysates for use in luciferase assays, as previously described (Wang et al, 2008). All treatments were performed in triplicate and each experiment repeated a minimum of three times.

#### *shRNA-mediated knockdown of G $\beta$ 1 and G $\gamma$ 2*

Gene reporter experiments were in some cases conducted in stable cell lines expressing either G $\beta$ 1 or G $\gamma$ 2. To monitor protein expression, HEK 293 cells stably expressing the pIRES-puro-Glue-G $\gamma$ 2 or pIRES-puro-Glue-G $\beta$ 1 (both HA-tagged) were transfected with either 15  $\mu$ g of pCDNA3.1 or shRNA expressing plasmids. 48 hours after transfection, cells were lysed in RIPA buffer and 25  $\mu$ g of lysate was run on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blotted with anti-HA (Covance) antibody as described above. For gene reporter assay, HEK cells stably expressing the pIRES-puro-Glue-G $\gamma$ 2 or pIRES-puro-Glue-G $\beta$ 1 were transfected with 250 ng of AP-1 reporter construct described

above, and with 2  $\mu\text{g}$  of shRNA or PLKO.1 control vector in a 6 well plate. Reporter assays were again performed as described above.

#### *Electrophoretic mobility shift assays*

Gel shift experiments were performed as previously described using a radio-labeled probe corresponding to the high affinity AP-1 binding site in the human *FSHB* promoter (Wang et al, 2008). Briefly, nuclear extracts were prepared (as described above) from CHO cells transfected with the indicated expression vectors. Protein/DNA complexes were resolved by native PAGE and then revealed by autoradiography of the dried gels.

#### *Chromatin immunoprecipitation (ChIP)*

HEK 293 cells transfected with the FSH $\beta$  reporter construct and other constructs as required were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min at RT. Cross-linking was stopped by adding glycine to a final concentration of 125 mM. Cells were incubated 5 min at RT, washed twice with cold-ice 1X PBS, harvested in 1 ml 1X PBS, and pelleted by centrifugation for 5 min at  $\times 1000$  g. Cells were resuspended in 900  $\mu\text{l}$  of SDS lysis buffer (1% SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris and 1X protease inhibitor) and incubated 10 min on ice. Four hundred fifty  $\mu\text{l}$  of the lysate was sonicated in order to shear DNA to lengths of 100 to 1000 bp. Non-solubilized material was removed by centrifugation at 10000  $\times$  g for 10 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ . One hundred  $\mu\text{l}$  of lysate/condition was pre-cleared 1 hr at 4  $^{\circ}\text{C}$  with shaking with protein G agarose (Upstate) pre-blocked with BSA and sonicated salmon sperm DNA. Beads were spun down and the supernatant incubated with 4  $\mu\text{g}$  of anti-Flag monoclonal antibody (Sigma) or anti-myc monoclonal antibody (Covance), in the presence of BSA and sonicated salmon sperm DNA overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$  with shaking. Pre-incubated protein G agarose beads with BSA and sonicated salmon sperm DNA were added to the supernatant and incubated 3 hr with shaking at 4 $^{\circ}\text{C}$ . Beads were spun down and washed for 5 min each with: three times with low salt buffer, five times with high salt

buffer, two times with LiCl and three times with TE. The beads were incubated twice with 240  $\mu$ l of elution buffer (1% SDS and 0.1M NaHCO<sub>3</sub>) for 15 min and the supernatant collected. Reverse cross-linking was performed with 283 mM NaCl overnight at 65 °C. DNA was treated with RNase for 30 minutes at 37°C and proteinase K for 1 hour at 45°C. DNA was purified by phenol/chloroform extraction and precipitated in ethanol in presence of tRNA. PCR was performed on DNA using the following primers specific for the reporter construct: FshB FWRD 5' - TCT AAA CAC TGA TTC ACT TAC AGC AAG CTT CAG - 3' and FshB RV (Luc) 5' - TGC TCT CCA GCG GTT CCA TC - 3'.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research to T.E.H (MOP-36279 and MOP-79354), and D.J.B. (MOP-89991) as well as the Heart and Stroke Foundation of Quebec to T.E.H. S.A.L. and T.E.H. were also supported by the CIHR Team in GPCR Allosteric Regulation (CTiGAR). T.E.H. is a Chercheur National and D.J.B. a Chercheur boursier of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). S.A.L. holds a Canada Research Chair in Molecular Endocrinology. M.R. was supported by a doctoral award from FRSQ. We thank Dr. Paul Clarke (McGill University) for assistance with experiments using amphetamine injection in rats. We also thank Dr. Jason Tanny (McGill University) for advice and assistance with ChIP experiments.

## References

- Alibhai IN, Green TA, Potashkin JA, Nestler EJ (2007) Regulation of fosB and DeltafosB mRNA expression: in vivo and in vitro studies. *Brain Res* 1143: 22-33
- Angers S, Thorpe CJ, Biechele TL, Goldenberg SJ, Zheng N, MacCoss MJ, Moon RT (2006) The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol* 8(4): 348-357
- Bannister AJ, Kouzarides T (1995) CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *Embo J* 14(19): 4758-4762
- Bussolino DF, Guido ME, Gil GA, Borioli GA, Renner ML, Grabois VR, Conde CB, Caputto BL (2001) c-Fos associates with the endoplasmic reticulum and activates phospholipid metabolism. *Faseb J* 15(3): 556-558
- Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ (1997) Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 17(13): 4933-4941
- Dupré DJ, Robitaille M, Ethier N, Villeneuve LR, Mamarbachi AM, Hébert TE (2006) Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J Biol Chem* 281(45): 34561-34573
- Dupré DJ, Robitaille M, Rebois RV, Hébert TE (2009) The role of G $\beta$  subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 31-56
- Dupré DJ, Robitaille M, Richer M, Ethier N, Mamarbachi AM, Hébert TE (2007) Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for G $\gamma$  subunits before assembly with G $\beta$ . *J Biol Chem* 282(18): 13703-13715
- Gil GA, Bussolino DF, Portal MM, Pecchio AA, Renner ML, Borioli GA, Guido ME, Caputto BL (2004) c-Fos activated phospholipid synthesis is required for neurite elongation in differentiating PC12 cells. *Mol Biol Cell* 15(4): 1881-1894
- Hildebrandt JD, Codina J, Risinger R, Birnbaumer L (1984) Identification of a  $\gamma$  subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins Ns and Ni. *J Biol Chem* 259(4): 2039-2042

Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9(4): 789-798

Hynes TR, Tang L, Mervine SM, Sabo JL, Yost EA, Devreotes PN, Berlot CH (2004) Visualization of G protein  $\beta\gamma$  dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both  $\beta$  and  $\gamma$  in subcellular targeting. *J Biol Chem* 279(29): 30279-30286

Jamora C, Yamanouye N, Van Lint J, Laudenslager J, Vandenheede JR, Faulkner DJ, Malhotra V (1999) G $\beta\gamma$ -mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell* 98(1): 59-68

Jin C, Li H, Murata T, Sun K, Horikoshi M, Chiu R, Yokoyama KK (2002) JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Mol Cell Biol* 22(13): 4815-4826

Kazantsev AG, Thompson LM (2008) Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7(10): 854-868

Kerppola TK (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37: 465-487

Kino T, Kozasa T, Chrousos GP (2005a) Statin-induced blockade of prenylation alters nucleocytoplasmic shuttling of GTP-binding proteins  $\gamma 2$  and  $\beta 2$  and enhances their suppressive effect on glucocorticoid receptor transcriptional activity. *Eur J Clin Invest* 35(8): 508-513

Kino T, Tiulpakov A, Ichijo T, Chheng L, Kozasa T, Chrousos GP (2005b) G protein  $\beta$  interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J Cell Biol* 169(6): 885-896

Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Wang XB, Hembree CM, Goodman NL, Uhl GR (2002) Isolation and sequencing of a putative promoter region of the murine G protein  $\beta 1$  subunit (GNB1) gene. *DNA Seq* 13(1): 39-45

Kumar P, Wu Q, Chambliss KL, Yuhanna IS, Mumby SM, Mineo C, Tall GG, Shaul PW (2007) Direct Interactions with G $\alpha i$  and G $\beta\gamma$  mediate nongenomic signaling by estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol Endocrinol* 21(6): 1370-1380



Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic  $K^+$  channel in heart. *Nature* 325(6102): 321-326

MacDonald ML, Lamerdin J, Owens S, Keon BH, Bilter GK, Shang Z, Huang Z, Yu H, Dias J, Minami T, Michnick SW, Westwick JK (2006) Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nat Chem Biol* 2(6): 329-337

Malnou CE, Salem T, Brockly F, Wodrich H, Piechaczyk M, Jariel-Encontre I (2007) Heterodimerization with Jun family members regulates c-Fos nucleocytoplasmic traffic. *J Biol Chem* 282(42): 31046-31059

Michnick SW, Ear PH, Manderson EN, Remy I, Stefan E (2007) Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nat Rev Drug Discov* 6(7): 569-582

Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80(2): 249-257

Nye HE, Hope BT, Kelz MB, Iadarola M, Nestler EJ (1995) Pharmacological studies of the regulation of chronic Fos-related antigen induction by cocaine in the striatum and nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 275(3): 1671-1680

Ogawa S, Lozach J, Jepsen K, Sawka-Verhelle D, Perissi V, Sasik R, Rose DW, Johnson RS, Rosenfeld MG, Glass CK (2004) A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(40): 14461-14466

Olive M, Krylov D, Echlin DR, Gardner K, Taparowsky E, Vinson C (1997) A dominant negative to activation protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. *J Biol Chem* 272(30): 18586-18594

Park JG, Muise A, He GP, Kim SW, Ro HS (1999) Transcriptional regulation by the  $\gamma 5$  subunit of a heterotrimeric G protein during adipogenesis. *Embo J* 18(14): 4004-4012

Pellegrino S, Zhang S, Garritsen A, Simonds WF (1997) The coiled-coil region of the G protein  $\beta$  subunit. Mutational analysis of  $G\gamma$  and effector interactions. *J Biol Chem* 272(40): 25360-25366

Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupre DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hebert TE (2006) Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci* 119(Pt 13): 2807-2818

Remy I, Galarneau A, Michnick SW (2002) Detection and visualization of protein interactions with protein fragment complementation assays. *Methods Mol Biol* 185: 447-459

Remy I, Montmarquette A, Michnick SW (2004) PKB/Akt modulates TGF- $\beta$  signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol* 6(4): 358-365

Robitaille M, Ramakrishnan N, Baragli A, Hebert TE (2009) Intracellular trafficking and assembly of specific Kir3 channel/G protein complexes. *Cell Signal* 21(4): 488-501

Rojkova AM, Woodard GE, Huang TC, Combs CA, Zhang JH, Simonds WF (2003) Ggamma subunit-selective G protein  $\beta 5$  mutant defines regulators of G protein signaling protein binding requirement for nuclear localization. *J Biol Chem* 278(14): 12507-12512

Roux P, Blanchard JM, Fernandez A, Lamb N, Jeanteur P, Piechaczyk M (1990) Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell* 63(2): 341-351

Smeal T, Angel P, Meek J, Karin M (1989) Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev* 3(12B): 2091-2100

Smrcka AV, Sternweis PC (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C $\beta$  by G protein  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits. *J Biol Chem* 268(13): 9667-9674

Spiegelberg BD, Hamm HE (2005) G $\beta\gamma$  binds histone deacetylase 5 (HDAC5) and inhibits its transcriptional co-repression activity. *J Biol Chem* 280(50): 41769-41776

Sun Y, Yamauchi J, Kaziro Y, Itoh H (1999) Activation of c-fos promoter by G $\beta\gamma$ -mediated signaling: involvement of Rho and c-Jun N-terminal kinase. *J Biochem* 125(3): 515-521

Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG (1994) Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 269(8): 6093-6100

Vriz S, Lemaitre JM, Leibovici M, Thierry N, Mechali M (1992) Comparative analysis of the intracellular localization of c-Myc, c-Fos, and replicative proteins during cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 12(8): 3548-3555

Wang Y, Fortin J, Lamba P, Bonomi M, Persani L, Roberson MS, Bernard DJ (2008) Activator protein-1 and smad proteins synergistically regulate human follicle-stimulating hormone  $\beta$ -promoter activity. *Endocrinology* 149(11): 5577-5591

Weiss C, Schneider S, Wagner EF, Zhang X, Seto E, Bohmann D (2003) JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *Embo J* 22(14): 3686-3695

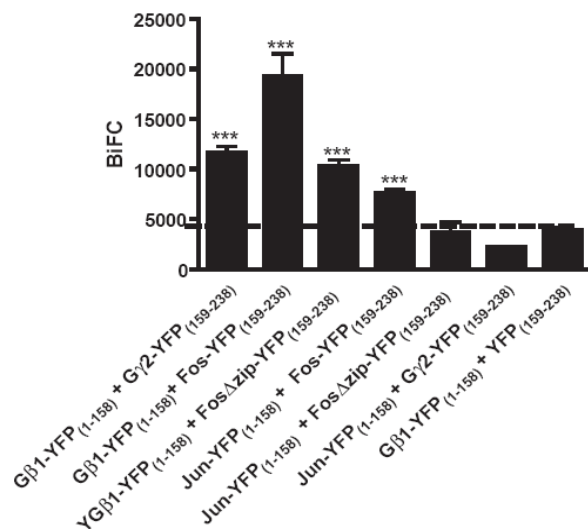
Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha$ 1 subunit. *Nature* 385(6615): 442-446

Zhang J, Kalkum M, Chait BT, Roeder RG (2002) The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol Cell* 9(3): 611-623

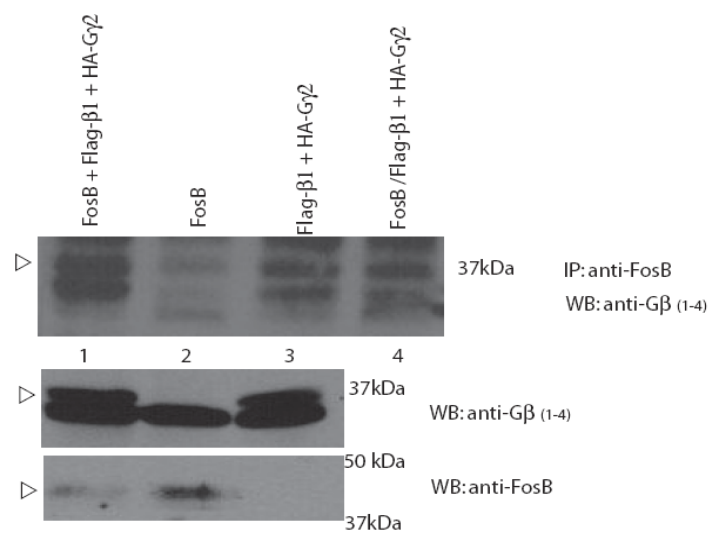
Zhang JH, Barr VA, Mo Y, Rojkova AM, Liu S, Simonds WF (2001) Nuclear localization of G protein  $\beta$ 5 and regulator of G protein signaling 7 in neurons and brain. *J Biol Chem* 276(13): 10284-10289

Figures

A



B



C

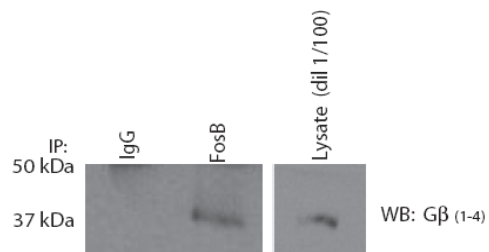


Figure 33: *Gβ1* interacts with *Fos*.

A) BiFC was measured in HEK cells transfected with Gβ1-YFP<sub>(1-158)</sub> or JunYFP<sub>(1-158)</sub> and with either Gγ2-YFP<sub>(159-238)</sub>, FosYFP<sub>(159-238)</sub>, FosΔzipYFP<sub>(159-238)</sub> or YFP<sub>(159-238)</sub>. The negative control is represented by the cells transfected with the Gβ1-YFP<sub>(1-158)</sub> and the soluble protein YFP<sub>(159-238)</sub>. An interaction was detected between Gβ1-YFP<sub>(1-158)</sub> and Gγ2-YFP<sub>(159-238)</sub>, between Gβ1-YFP<sub>(1-158)</sub> and FosYFP<sub>(159-238)</sub> or between JunYFP<sub>(1-158)</sub> and FosYFP<sub>(159-238)</sub>, but not between JunYFP<sub>(1-158)</sub> and the Gγ2-YFP<sub>(159-238)</sub>. The truncation of the AP-1 dimerization domain of Fos inhibits totally the BiFC interaction with the JunYFP<sub>(1-158)</sub> but partially the interaction with the Gβ1-YFP<sub>(1-158)</sub>. The data are presented as BiFC with a mean ± S.E for at least five different experiments. \*\*\* indicates p<0.0001 compared to the negative control using a one-tailed student's *t*-test with Bonferroni correction. B) HEK 293 cells transfected with the expression vectors were solubilized in RIPA buffer before immunoprecipitation. FosB was immunoprecipitated by anti-FosB antibody and the presence of Flag-Gβ1 was revealed, after separation on SDS-polyacrylamide gels and transfer to nitrocellulose, by blotting with anti-Gβ<sub>(1-4)</sub> antibodies. Arrow denotes the specific band for Gβ as it appears as the upper part of a poorly distinguished doublet. The other bands are non-specific bands associated with Fos immunoprecipitation in HEK 293 cells. Lane 4 is the negative control where lysates of cells expressing FosB were mixed prior to immunoprecipitation with lysates of cells transfected with Flag-Gβ1 and HA-Gγ2. C) Immunoprecipitation was performed on striatal lysates of amphetamine treated rats using anti-FosB or normal rat IgG. The presence of Gβ subunits was revealed by blotting with anti-Gβ<sub>(1-4)</sub> antibodies. Data in B) and C) are representative of three independent experiments.

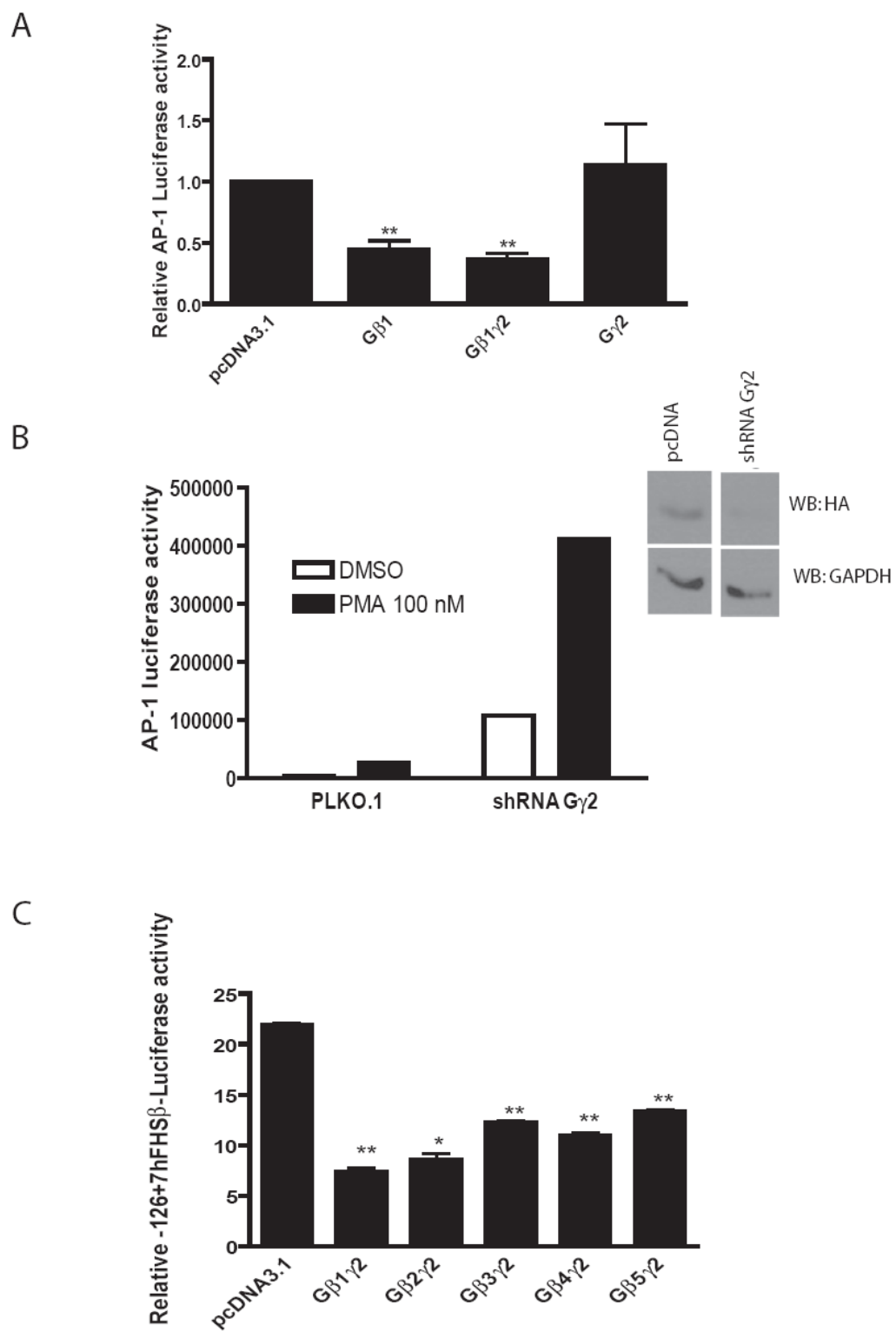


Figure 34: *AP-1* transcriptional activity is inhibited by co-expression of *Gβγ* dimer.

A) HEK 293 cells transfected with an AP-1 luciferase reporter construct with or without *Gβ* and/or *Gγ* were serum starved for two hours and treated six hours with 100 nM PMA prior to measurement of firefly luciferase activity. Data are expressed as relative AP-1 activity normalized for the pcDNA condition with means  $\pm$ S.E for at least five different experiments. \*\* indicates  $p < 0.005$  compared to the pcDNA condition using a one-tailed student's *t*-test with a Bonferroni correction. B) Knockdown of endogenous *Gγ2* increases AP-1 reporter activity. Reporter gene assays were conducted as shown above using cells transfected with vector (pLKO.1 or pcDNA3) or an shRNA construct targeting *Gγ2*. Inset: Western blot confirming knockdown of *Gγ2* in vector or shRNA-transfected cells. Data are representative of two independent experiments. C) LβT2 cells were transfected with a human FSHβ luciferase reporter gene with or without *Gβ1-5/Gγ2*. Cells were washed in 1 X PBS, placed in serum-free media and treated with 100 nM GNRH1 for 6 hours. Data are expressed as Relative -126+7hFHSβ-luciferase activity with means  $\pm$ S.E for duplicate of a same experiment. Data are representative of three separate experiments. \*\* indicates  $p < 0.005$  and \* indicates  $p < 0.05$  compared to the pcDNA condition using a one-tailed student's *t*-test with a Bonferroni correction.

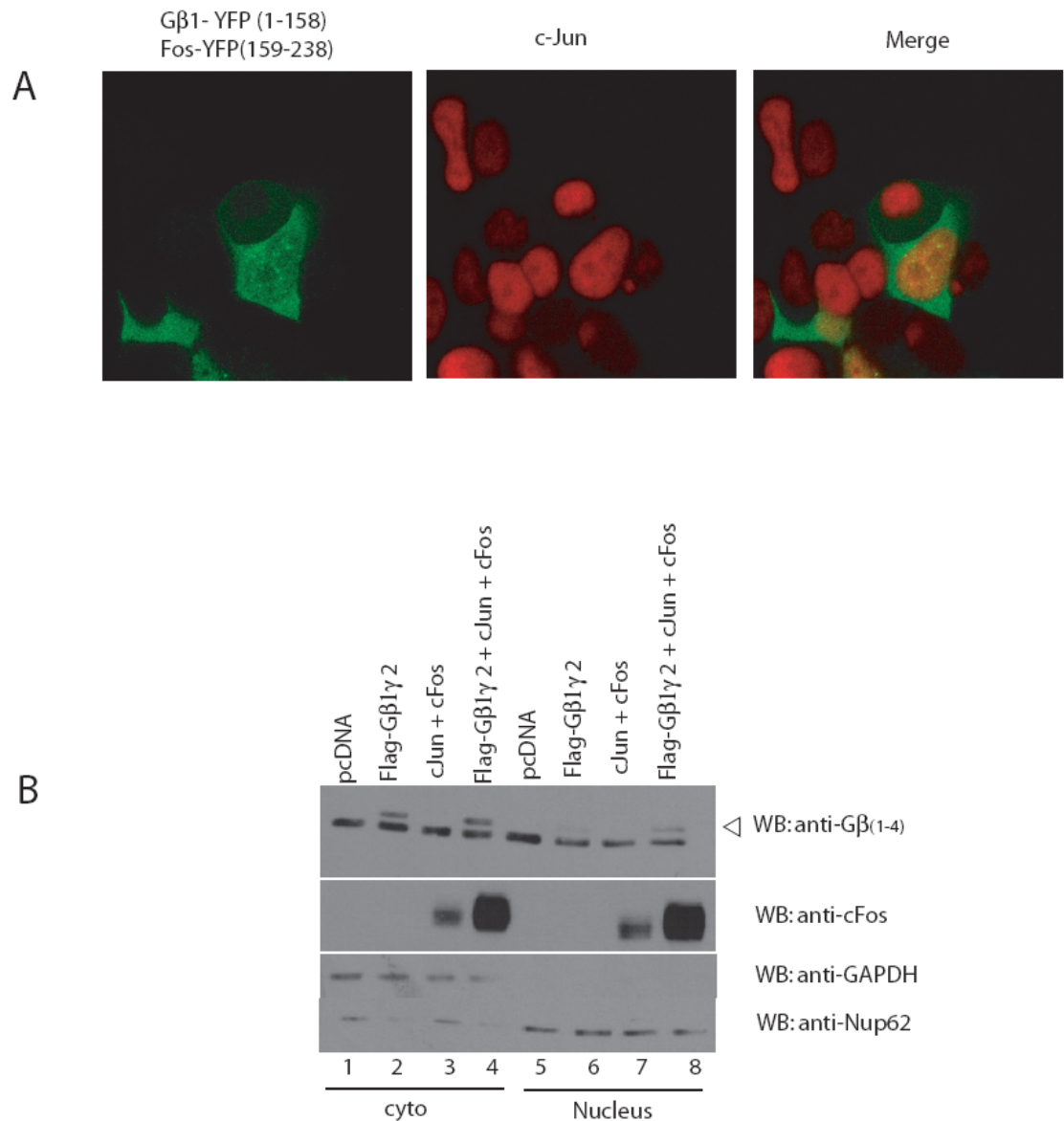


Figure 35: *Gβγ* and the AP-1 complex colocalize to the nucleus.

A) HEK 293 cells were transfected with Gβ1-YFP<sub>(1-158)</sub>, FosYFP<sub>(159-238)</sub>, and cJun. Confocal microscopy of cells shows that cJun (red) is exclusively localized to the nucleus while the BiFC pair Gβ1/Fos shows both cytoplasmic and nuclear localization. B) CHO cells were transfected with indicated proteins and subcellular fractionation was performed 48 hours after transfection. Proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and



transferred to nitrocellulose. Blotting with anti-G $\beta\gamma_{(1-4)}$  antibodies revealed the presence of Flag-G $\beta\gamma_1$  (white arrow) in both cytoplasmic and nuclear fractions (top panel). Reblotting the membrane with anti-cFos specific antibodies showed the presence of cFos in both nuclear and cytoplasmic fractions (second panel). The membrane was also blotted with anti-GAPDH (third panel) or anti-Nup62 (bottom panel) antibodies as control of the loading as well as marker of cytoplasmic (GAPDH) and nuclear (Nup62) fractions. Data are representative of at least three independent experiments.

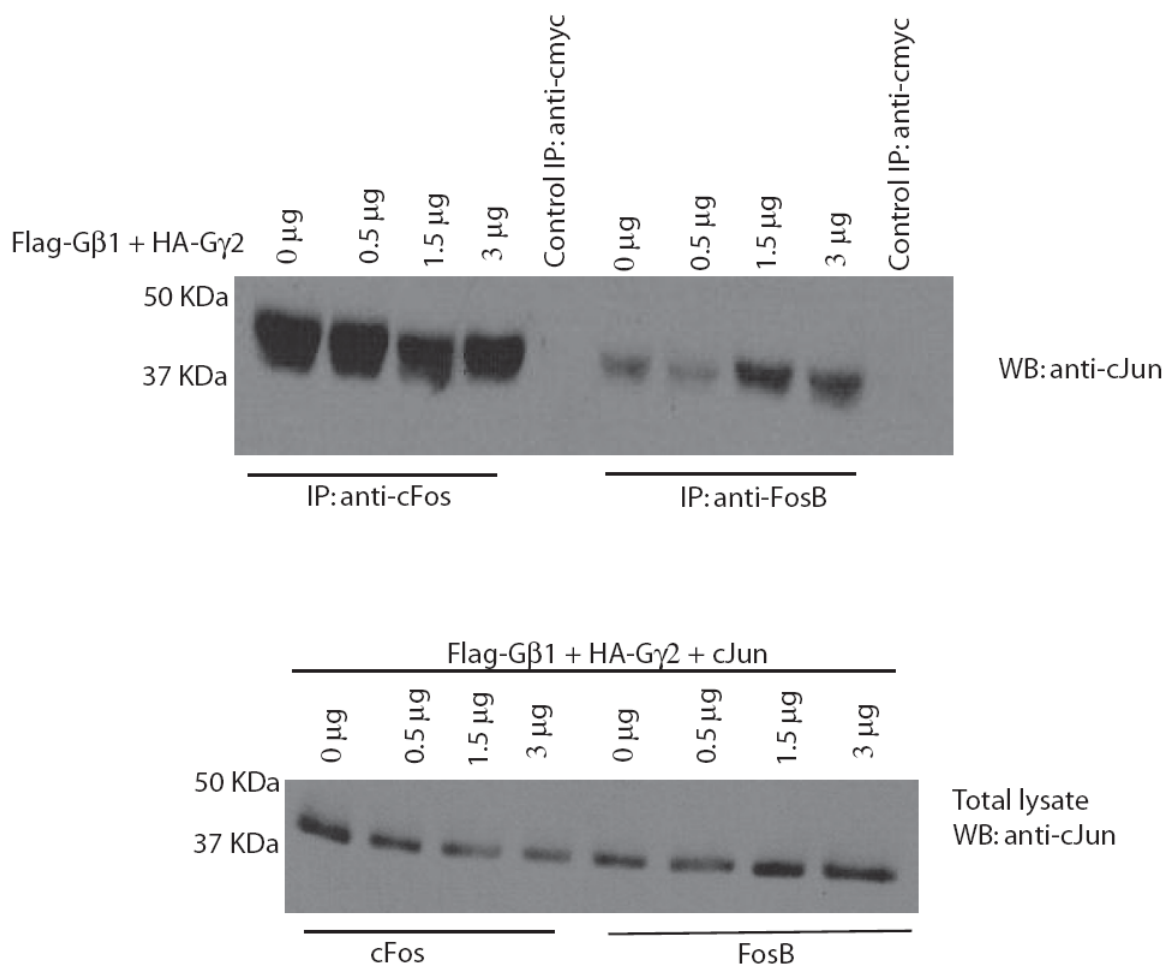
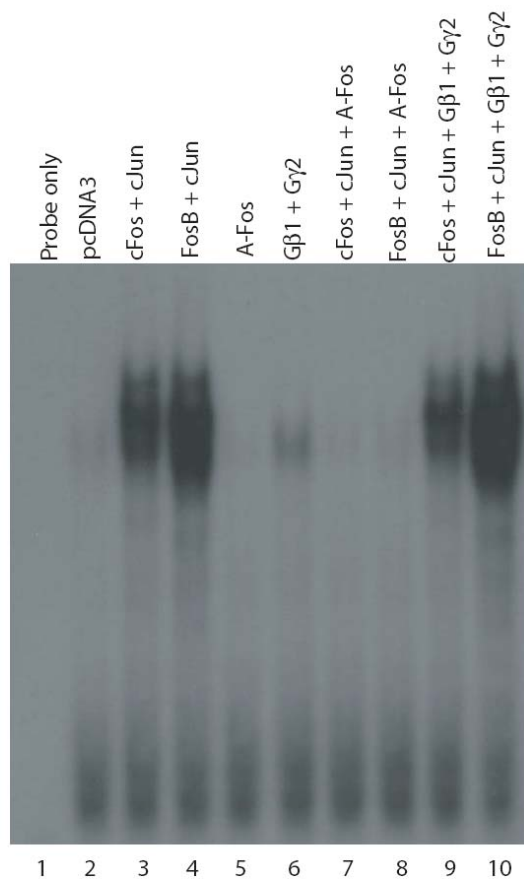


Figure 36: *AP-1* dimerization is not blocked by *Gβγ* expression.

HEK 293 cells were transfected with cJun and either cFos or FosB with increasing amounts of Flag-Gβ1 and HA-Gγ2. Top panel: cFos or FosB proteins were immunoprecipitated with their respective specific antibodies and the presence of cJun was revealed with anti-cJun antibodies following the separation of proteins on SDS-polyacrylamide gels and transfer to nitrocellulose. The presence of Gβγ dimer did not alter the amount of cJun precipitating with cFos but seemed to increase or stabilize the cJun/FosB complex. Bottom panel: Total cell lysate showing expression levels of cJun. Data are representative of three independent experiments.

A



B

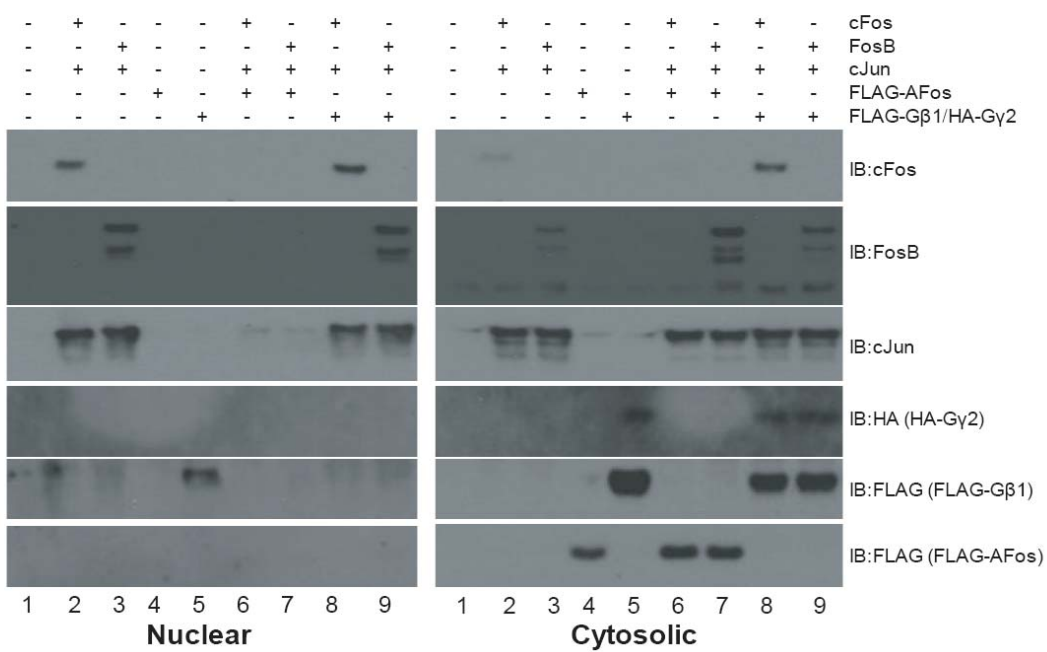


Figure 37: *Gβγ* does not change AP-1 DNA binding properties.

A) CHO cells were seeded in 10 cm plates and transfected with the indicated combinations of cFos, FosB, and cJun (1 μg each per plate) and AFos (μg/plate) or Gβ1/Gγ2 (4 μg each/plate). Cytosolic and nuclear proteins were isolated as described in Materials and Methods. A) Nuclear extracts were used in EMSAs with a probe corresponding to the high affinity AP-1 site in the human FSHB promoter. Free probe is not shown. B) Nuclear (same as used in A) and cytosolic proteins were subjected to SDS-PAGE using 4-12% Bis-Tris gels and transferred to nitrocellulose prior to immunoblotting (IB) with the indicated antibodies (right). B) CHO cells were seeded in 10 cm plates and transfected with the indicated combinations of cFos, FosB, and cJun (1 μg each per plate) and AFos (8 μg/plate) or Gβ1/Gγ2 (4 μg each/plate). Cytosolic and nuclear proteins were isolated as indicated in Materials and Methods and subjected to SDS-PAGE using 4-12% Bis-Tris gels. Proteins were transferred to nitrocellulose and immunoblotted (IB) with the indicated antibodies (right). Data are representative of three independent experiments.

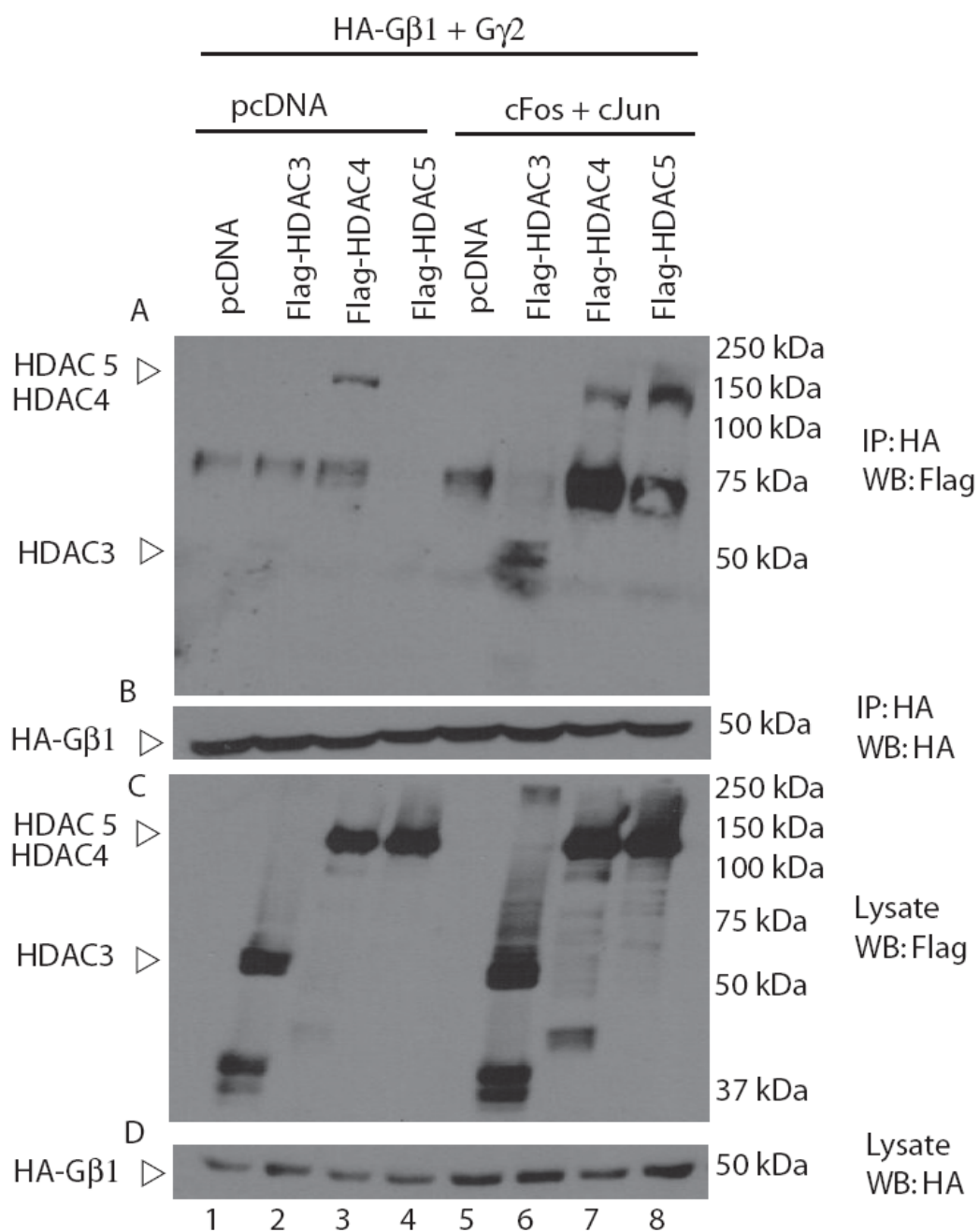
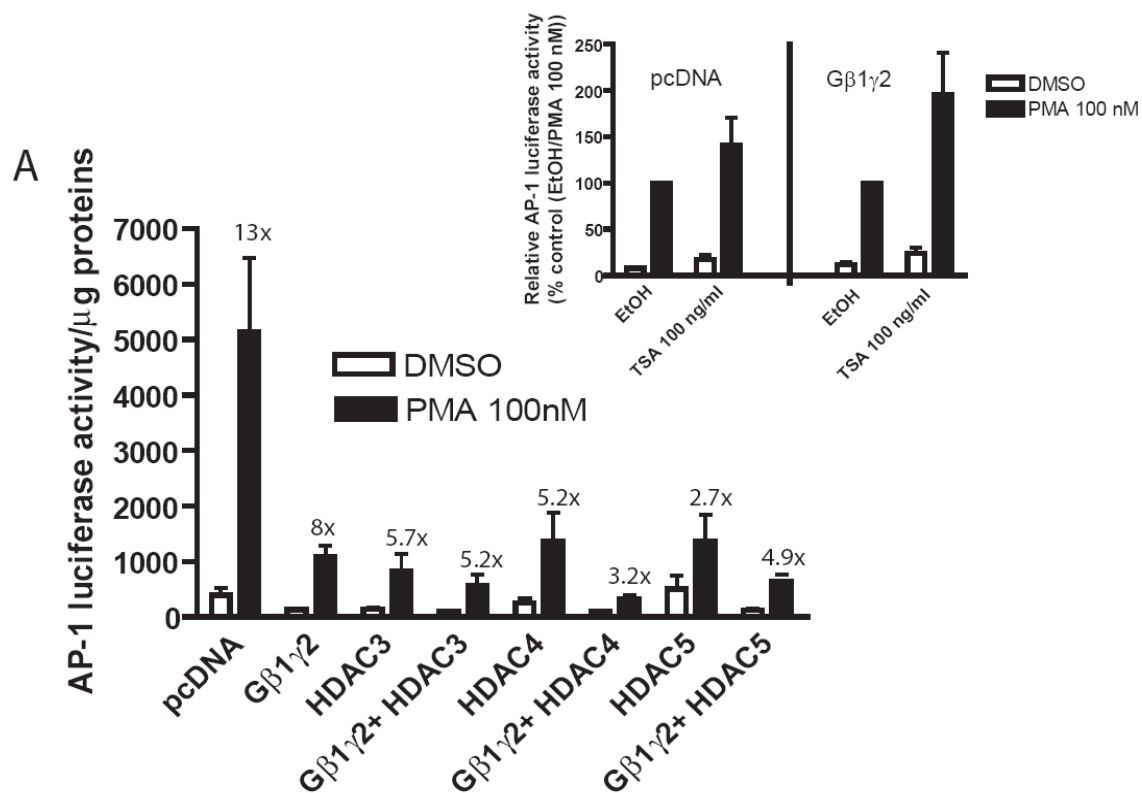


Figure 38: Interaction of HDAC isoforms and G $\beta$ 1 is fostered by AP-1.

HEK 293 cells were transfected with HA-TAP-G $\beta$ 1 and G $\gamma$ 2 in combination with Flag-HDAC3,4 or 5 and cFos/cJun complex and proteins were solubilized in RIPA buffer. A) HA-G $\beta$ 1 was immunoprecipitated with anti-HA antibodies and presence of Flag-HDACx was revealed with anti-Flag antibodies following the separation of the proteins on SDS-polyacrylamide gels and transfer to nitrocellulose. Co-expression of the cFos/cJun complex favors the co-immunoprecipitation of G $\beta$ 1 and HDAC proteins. B) Detection of HA-TAP-G $\beta$ 1 to confirm expression the efficiency of immunoprecipitation procedure. C) Cell lysates blotted to confirm the expression of HA-TAP-G $\beta$ 1 (molecular weight 49 kDa). D) Cell lysates blotted to confirm the expression of Flag-HDACs. Data are representative of three independent experiments.



**B**

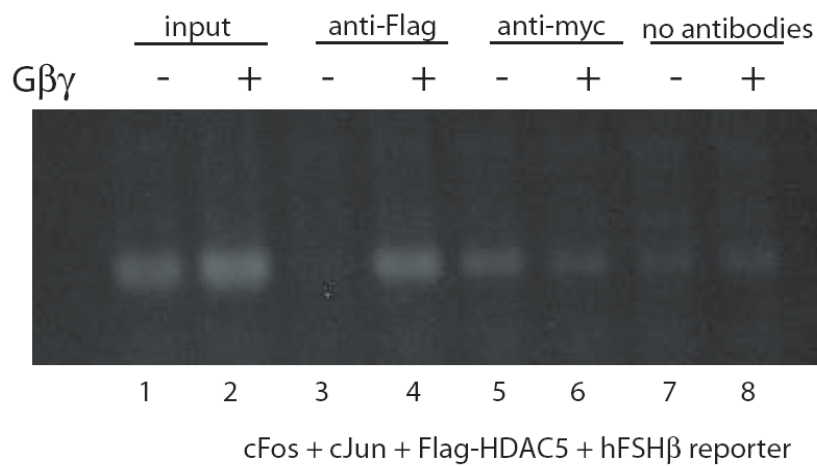
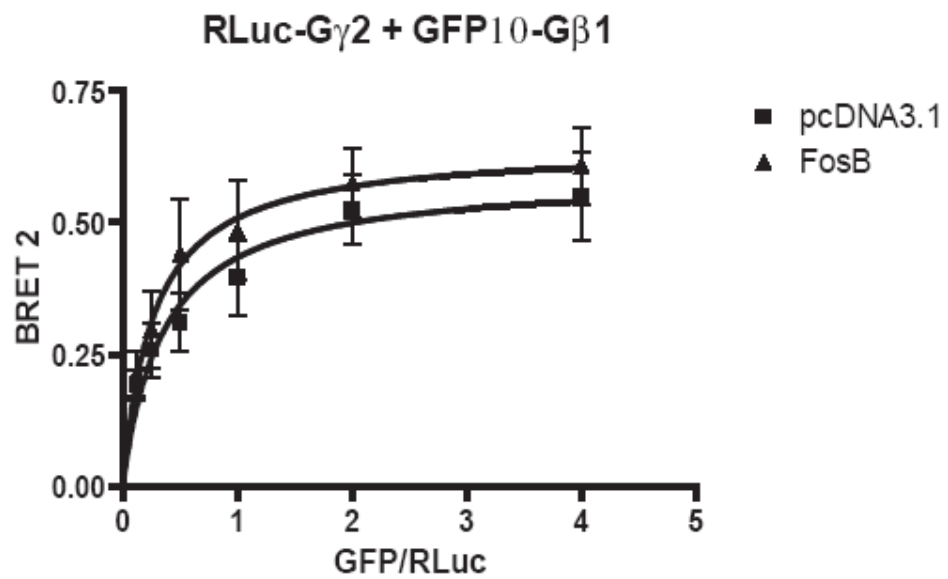


Figure 39: *Recruitment of HDAC proteins by G $\beta\gamma$  inhibits AP-1 activity.*

A) Gene reporter assay with the AP-1 dependent promoter was performed in presence of G $\beta\gamma$  and/or different HDAC isoforms. As also seen in Figure 34, the presence of G $\beta\gamma$  results in inhibition of AP-1 transcriptional activity. Overexpression of HDAC isoforms also caused a decrease in AP-1 transcriptional activity and this reduction was greater when both HDAC and G $\beta\gamma$  proteins were co-expressed. However, while HDAC3 decreased both basal and PMA-induced AP-1 activity, HDAC4 and HDAC5 only decreased PMA induction. Numbers above lanes indicate fold-induction over basal in response to PMA treatment. *Inset*: Cells treated with 100 ng/ml Trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor show increased AP-1 activity induced by PMA treatment and this induction was greater when G $\beta\gamma$  was coexpressed. B) ChIP experiments were done in order to determine if HDAC proteins were present on AP-1 dependent promoters. Chromatin from cells expressing Flag-HDAC5, cJun, cFos and the hFSH $\beta$  promoter, in absence or in presence of G $\beta\gamma$  was immunoprecipitated with either anti-Flag or anti-cmyc antibodies, the latter as a negative control. The presence the hFSH $\beta$  promoter in immunoprecipitates was assessed by PCR. Data are representative of three independent experiments.



A



B

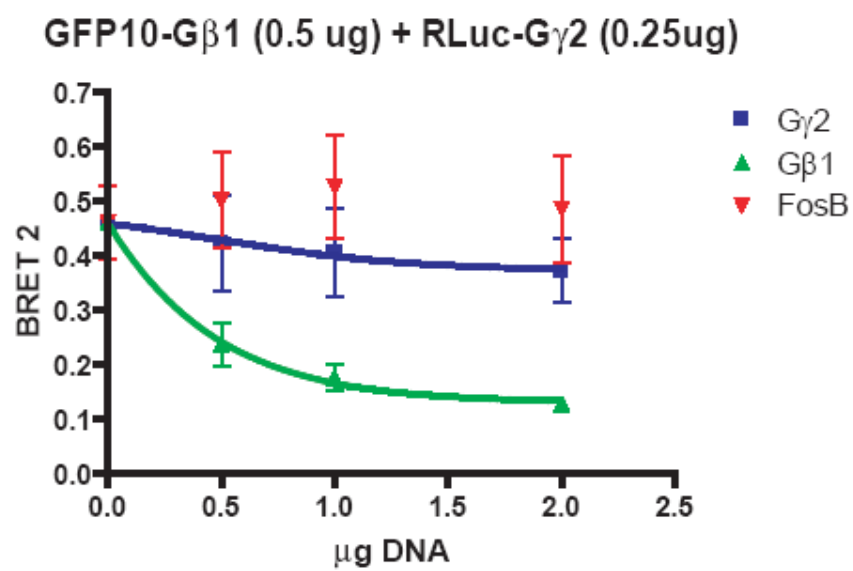


Figure 40(Supplementary): *FosB* does not interfere with  $G\beta\gamma$  dimerization.

A) BRET saturation curve shows that increasing amounts of GFP10- $G\beta 1$ , while keeping the expression of Rluc- $G\gamma 2$  constant lead to a saturation of the BRET signal, indicating a specific interaction between the  $G\beta 1$  and the  $G\gamma 2$ . Co-transfection with constant amount of FosB do not change the  $BRET_{MAX}$  or the  $BRET_{50}$ , suggesting that FosB protein do not interfere with  $G\beta\gamma$  dimerization. B) Competition assay was done in keeping the amount of GFP10- $G\beta 1$  and Rluc- $G\gamma 2$  constant and increasing the amount of cold competitor. BRET signal was rapidly decreases with the increasing of  $G\beta$ . Increasing amount of cold  $G\gamma 2$  succeed to decrease the BRET signal, but to a lesser extend. However, the presence of FosB, even at the highest concentration did not occasion any change in the BRET signal, suggesting that FosB do not block  $G\beta 1\gamma 2$  interaction. Data are representative of three separate experiments.

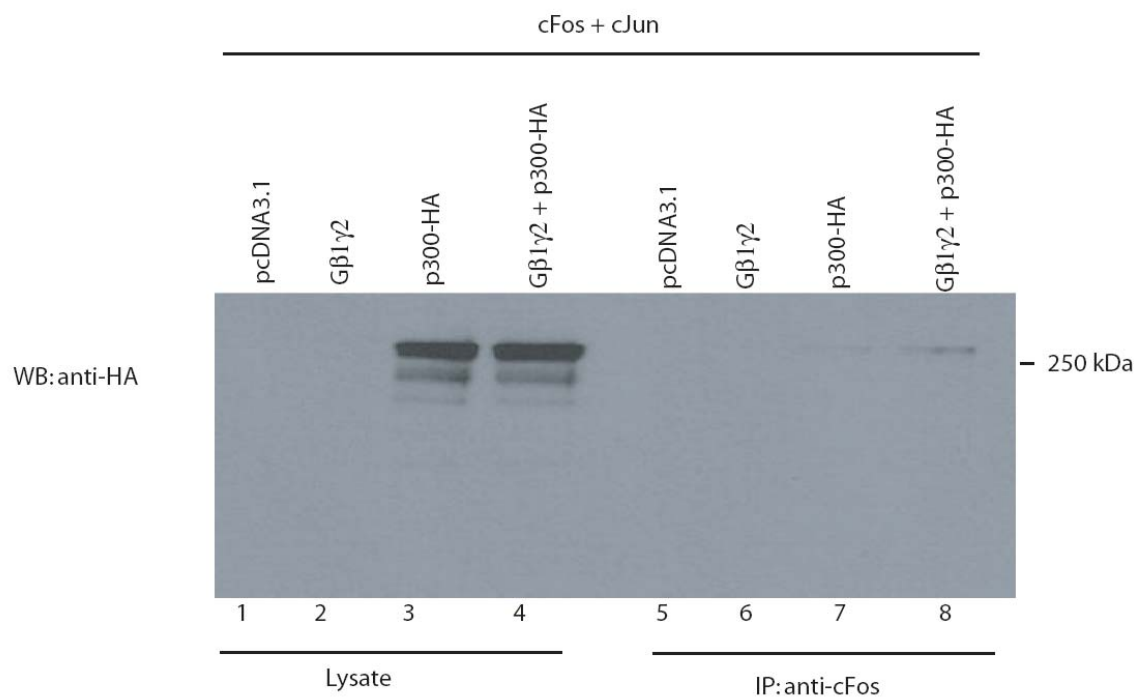


Figure 41(Supplementary): *Gβγ* does not change *cFos/p300-HA* interaction.

HA-tagged p300 proteins co-immunoprecipitated with antibodies against cFos (lane 7) and the expression of exogenous Gβγ did not block the interaction between cFos and p300 (lane 8). Total cell lysates are shown in lanes 1-4. Data are representative of two independent experiments.

## Chapitre 5

### Discussion

La majorité des types cellulaires expriment plusieurs RCPGs, protéines G hétérotrimériques et effecteurs différents. Les mécanismes permettant de préserver la spécificité des voies de transduction, malgré la présence de toutes ces différentes composantes de la signalisation, ne sont pas encore bien compris. Les protéines G, leurs récepteurs connexes et leurs effecteurs immédiats peuvent colocaliser dans des microdomaines sous-cellulaires [150, 242] et la proximité spatiale de ces composantes pourrait permettre la transduction d'un signal spécifique. Au début des années 2000, des études suggèrent que, en plus de la colocalisation dans les mêmes micro-domaines, les récepteurs et leurs effecteurs forment un complexe protéique stable et constitutif présent à la membrane plasmique. Il fut montré, à partir de membranes de cerveaux antérieurs de rat et en système de surexpression, que le récepteur  $\beta_2$ AR et le canal Cav1.2 co-immunoprécipitent ensemble [243], même en absence de la stimulation du récepteur. En 2002, le laboratoire du Dr. Hébert publia une étude intéressante soulignant l'interaction constitutive des récepteurs et des effecteurs [98]. En plus de détecter une interaction entre les récepteurs à la dopamine et les canaux potassiques homomériques Kir3.2 et Kir3.4, ils détectèrent aussi une interaction protéique entre ces récepteurs et la sous-unité Kir3.1 exprimée seule. Ceci suggère que les récepteurs et les effecteurs forment un complexe stable, même lorsque l'effecteur est retenu à l'intérieur de la cellule. C'est à partir de ces résultats que nous nous sommes intéressés à l'étude du lieu de formation des complexes de signalisation ainsi que de leurs compositions. Pour ma part, je me suis concentrée plus particulièrement sur l'étude de l'interaction entre les protéines G et les effecteurs, dont les canaux potassiques composés de la sous-unité Kir3.1.

## Interaction constitutive entre les protéines G et leurs effecteurs

Plusieurs groupes ont montré, par des techniques *in vitro*, que la sous-unité Kir3.1 et le dimère G $\beta\gamma$  interagissent directement ensemble. Il fut, par la suite, montré que ces deux protéines peuvent être co-immunoprécipitées à partir de membranes d'oreillettes de rat [244], soulignant l'assemblage *in vivo* d'un complexe de signalisation entre les canaux et les protéines G. L'article présenté au chapitre 2 suggère que les protéines G hétérotrimériques et leurs effecteurs forment un complexe stable en condition basale, c'est-à-dire en absence de la stimulation des récepteurs. L'interaction entre le dimère G $\beta\gamma$  et ses effecteurs Kir3.1 et ACII a pu être détectée par co-immunoprécipitation ainsi que par la technique de BRET. Ces résultats sont complémentaires à certaines études antérieures suggérant que les récepteurs et les effecteurs [243] ainsi que les protéines G et les récepteurs [94, 95] forment aussi des complexes stables et constitutifs.

Afin de s'assurer de la spécificité des interactions effecteur/G $\beta\gamma$  observées, diverses méthodes ont été utilisées. Par des méthodes de compétition, nous avons montré que le signal de BRET représentant l'interaction entre la sous-unité Kir3.1-RLuc et le dimère GFP-G $\beta 1\gamma 2$  est réduit de façon dose dépendante avec l'ajout de Kir3.1 ou Kir3.4 non étiquetés pour le BRET (Figure 12), alors que l'expression de la sous-unité Flag-G $\beta 1$  fait diminuer la quantité de protéines ACII-Rluc co-immunoprécipitant avec la sous-unité GFP-G $\beta 1$  (Figure 10). En plus des études de compétition, la spécificité du BRET a été évaluée avec l'aide de courbes de saturation. Une interaction spécifique est caractérisée par une hyperbole atteignant la saturation lorsque toutes les molécules acceptrices sont complexées aux molécules donneuses d'énergie. Les interactions découlant d'une collision aléatoire causée par une grande densité de protéines exprimées sont représentées par une droite quasi linéaire en relation avec l'augmentation de la quantité de molécules acceptrices présentes. La Figure 11C et la Figure 13A représentent la relation hyperbolique des interactions entre les effecteurs et le dimère G $\beta\gamma$  alors que le contrôle négatif utilisé (CD8/G $\beta\gamma$ ) est représenté

par une ligne droite. En somme, ces résultats suggèrent que l'interaction constitutive effecteur/G $\beta\gamma$  observée par co-immunoprécipitation et par la technique de BRET est le résultat d'une interaction spécifique entre les deux protéines.

Fait intéressant, l'interaction entre la sous-unité Kir3.1 et le dimère G $\beta\gamma$  peut être détectée, par la technique de BRET ou par co-immunoprécipitation, même lorsque la sous-unité Kir3.1 est exprimée seule. Puisque cette sous-unité ne possède pas le domaine d'export du RE, elle s'accumule à l'intérieur de la cellule, probablement au RE, lorsqu'elle est transfectée dans des cellules HEK293 [84] (Figure 13B). Le fait que le dimère G $\beta\gamma$  puisse quand même s'y associer laisse sous-entendre que les complexes effecteurs/G $\beta\gamma$  peuvent se former ailleurs dans la cellule qu'à la membrane plasmique.

L'extrémité C-terminale de GRK2, nommée aussi  $\beta$ ARKct possède un site de liaison du dimère G $\beta\gamma$  et peut être utilisée comme séquestreur du dimère G $\beta\gamma$ . Dans notre cas, nous avons utilisé le  $\beta$ ARKct afin de souligner, par un autre moyen, la spécificité de l'interaction Kir3.1/G $\beta\gamma$  observée. L'expression de  $\beta$ ARKct résulte en une protéine soluble (Figure 27A) capable d'inhiber l'interaction entre ACII et le dimère G $\beta\gamma$  (Alessandra Baragli et Terence E. Hébert, non publié) alors que l'interaction entre le Kir3.1 et le dimère G $\beta\gamma$  y est sensible seulement lorsque le canal se situe à la membrane plasmique suivant la co-expression de la sous-unité Kir3.4 (Figure 27D). La fusion entre le domaine transmembranaire du récepteur CD8 et le  $\beta$ ARKct (CD8- $\beta$ ARKct) permet de cibler le séquestreur aux membranes (Figure 27B). Sous sa forme membranaire, le  $\beta$ ARKct peut alors inhiber l'interaction intracellulaire entre la sous-unité Kir3.1 et le dimère G $\beta\gamma$ , en plus de son interaction à la membrane plasmique (Figure 27 C,D). Ceci laisse croire que le  $\beta$ ARKct soluble peut seulement accéder aux sous-unités G $\beta\gamma$  lorsque le complexe effecteur/protéine G a passé un certain point de contrôle dans son acheminement à l'intérieur de la cellule. Il serait intéressant de vérifier si l'effet de  $\beta$ ARKct soluble sur

l'interaction ACII/G $\beta\gamma$  pourrait être inhibé en présence d'un agent causant la rétention de l'ACII dans le RE.

## **Interaction suivant l'activation des récepteurs**

Lors de l'activation des récepteurs, les protéines de signalisation ne se dissocient pas nécessairement. Certains groupes ont montré que la sous-unité G $\alpha$  et le dimère G $\beta\gamma$  [100, 245] peuvent rester associés lors de la stimulation des récepteurs, de même que les récepteurs avec les protéines G [94]. Il est pensé que les effecteurs sont activés par une liaison directe avec les protéines G. Cependant, nous avons montré clairement que ceux-ci peuvent interagir ensemble, bien avant l'activation des voies de signalisation. Nous avons donc vérifié l'effet de la stimulation des récepteurs sur l'interaction constitutive effecteur/G $\beta\gamma$ . Suite à l'activation des récepteurs  $\beta_2$ AR par l'isoprotérénol, un agoniste non perméable aux membranes, le signal de BRET observé entre l'ACII et le dimère G $\beta\gamma$  augmente (Figure 11). L'augmentation d'un signal de BRET indique soit un recrutement de nouvelles interactions ou un changement de conformation entre les protéines interagissant déjà ensemble avant le traitement. Par la valeur du BRET50, tiré des courbes de saturation, il est possible de déterminer lequel des deux événements se produit. La valeur du BRET50 est déterminée par la quantité de molécules acceptrices d'énergie qu'il faut ajouter par rapport à la quantité de molécules donneuses d'énergie afin d'obtenir le signal de BRET équivalent à la moitié du signal obtenu à la saturation. Cette valeur représente l'affinité relative entre les deux partenaires de BRET [246]. Un changement de conformation sera représenté par une diminution ou une augmentation du BRET maximal, sans toutefois faire varier la valeur du BRET50, alors qu'une dissociation ou un recrutement de nouvelles interactions fera changer le BRET maximal en plus du BRET50. La courbe de saturation de l'interaction entre l'ACII-RLuc et la sous-unité GFP10-G $\gamma$ 2 montre qu'il y a une augmentation du signal de BRET suivant la stimulation des récepteurs, mais que le

BRET50, ne varie pas, laissant supposer que l'isoprotérénol induit un changement conformationnel du complexe effecteur/protéine G plutôt qu'un événement de recrutement de nouvelles interactions.

Comme attendu, l'effet de l'isoprotérénol sur l'interaction entre la sous-unité Kir3.1 et le dimère  $G\beta\gamma$  ne peut être observé que lorsque le canal est acheminé à la membrane par la co-expression de la sous-unité Kir3.4 (Figure 13D).

Puisqu'une interaction entre les sous-unités Kir3.1 exprimées seules et les récepteurs  $\beta_2AR$  [98] ou le dimère  $G\beta\gamma$  (Chapitre 2) peut être détectée par BRET, un agoniste liposoluble du récepteur  $\beta_2AR$  a été utilisé afin d'évaluer la fonctionnalité des complexes intracellulaires. Le cimatérol permet en effet d'augmenter le BRET entre la sous-unité Kir3.1 et le dimère  $G\beta\gamma$  et cet effet peut être partiellement bloqué par une préincubation des cellules avec le propranolol, un antagoniste des récepteurs  $\beta_2AR$  (Figure 13B). Ces résultats suggèrent que les complexes intracellulaires pourraient être fonctionnels, puisque le complexe effecteur/protéine G répond à la stimulation des récepteurs, même lorsqu'il est trappé au RE. Ceci appuie les observations que des RCPGs fonctionnels peuvent être situés ailleurs qu'à la membrane plasmique. En effet, le récepteur GPR30, ciblé exclusivement au RE, est un récepteur fonctionnel pour les oestrogènes [185] alors que de nombreux RCPGs tels que les  $\beta_1AR$  [247] et les AT1R [248] peuvent être trouvés sur membrane nucléaire.

### **Les routes de l'acheminement à la membrane du canal 3.1/3.4**

Le transport cellulaire des protéines peut être étudié avec l'aide des mutants DN des petites protéines G Sar1 et Rabs. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux protéines Sar1, Rab1, 2, 6, 8 et 11, qui contrôlent le transport antérograde des protéines, à différents niveaux distincts dans la cellule (TABLE I). Dans un article publié en 2006, nous



avons identifié que l'acheminement à la membrane des récepteurs  $\beta_2$ AR est dépendant de Sar1, Rab1, Rab6, Rab8 et Rab11, mais indépendant de Rab2 [148]. Une autre étude du laboratoire du Dr. Hébert a aussi montré que les RCPGs n'emploient pas nécessairement les mêmes itinéraires puisque l'acheminement à la membrane du dimère des récepteurs GABAB1/B2 est sous la dépendance de Rab2, en plus de Sar1 et Rab1 [99]. En utilisant les mêmes protéines mutantes, nous avons identifié que l'acheminement membranaire du canal hétérotétramérique Kir3.1/Kir3.4 est dépendant des protéines Sar1 et Rab1, contrôlant le transport entre le RE et le Golgi (Figure 17), mais indépendant de Rab2, Rab6, Rab8 et Rab 11 (Figure 19). Les DN des petites protéines G peuvent être sous deux formes distinctes, soit bloquées sous la forme liant le GTP (Sar1 H79G et Rab1 N124I) ou bloquées sous la forme liant le GDP (Sar1 T39N et Rab1 S25N). Contrairement au récepteur  $\beta_2$ AR qui est retenu au RE par les formes GTP et GDP de Sar1 et Rab1 [148], l'acheminement à la membrane du canal Kir3.1/Kir3.4 est bloquée que par la forme Sar1-GTP (H79G) et Rab1-GDP (S25N) (Figure 17), mais non par les formes Sar1-GDP (T39N) ou Rab1-GTP (N124I) (résultats non publiés). Le mutant Sar1-GDP (T39N) empêche l'initiation de la formation du domaine d'export au RE, alors que le mutant Sar1H79G permet le bourgeonnement de la membrane du RE, mais ne permet pas sa fission [249]. Pour les protéines Rab1, la forme DN Rab1-GDP (S25N) est cytosolique et ne peut pas être recrutée aux membranes, alors que sa forme GTP (N124I) est aux membranes, mais ne permet pas la fusion entre la vésicule de transport et la membrane cible [250]. Ces informations nous suggèrent que le canal Kir3.1/Kir3.4 peut voyager par des voies alternatives de Sar1 tant qu'il n'est pas retenu dans les domaines de site d'export du RE formés par le mutant Sar1-GTP ou il peut voyager par des voies complémentaires de la protéine Rab1, lorsque celle-ci est recrutée préalablement aux membranes.

## Les lieux d'interaction des complexes protéiques

En plus de permettre l'étude des voies d'acheminement des protéines, la stratégie des mutants DN des petites protéines G peut être employée afin d'étudier les lieux d'interactions des complexes de signalisation. Après avoir identifié les petites protéines G responsables du transport antérograde des protéines d'intérêts, il est possible d'utiliser les formes DN afin d'arrêter l'acheminement des protéines dans un compartiment ciblé. Ceci permet d'identifier le compartiment sous-cellulaire où l'interaction entre les différents membres des complexes de signalisation a initialement lieu. Après avoir arrêté le transport cellulaire des récepteurs  $\beta_2$ AR à différents endroits dans la cellule, par l'utilisation des DN des protéines Sar1 et Rabs, nous avons étudié les interactions entre les différentes protéines de signalisation, par la méthode de BRET. Aucun des DN employés ne permet de modifier le signal de BRET entre les récepteurs  $\beta_2$ AR-RLuc et  $\beta_2$ AR-GFP [148], suggérant que l'homodimérisation des récepteurs se fait au RE, observation aussi appuyée par d'autres études [251, 252]. Encore une fois, aucun des DN employés bloquant l'acheminement à la membrane du récepteur ne modifie le signal de BRET entre le récepteur  $\beta_2$ AR et le dimère  $G\beta\gamma$  [148] ou l'interaction entre le  $\beta_2$ AR et la sous-unité Kir3.1, en absence ou en présence de la sous-unité Kir3.4 (Figure 42). Ces résultats suggèrent que le récepteur interagit initialement avec les effecteurs, le dimère  $G\beta\gamma$  et les autres récepteurs au RE, bien avant son acheminement à la membrane.

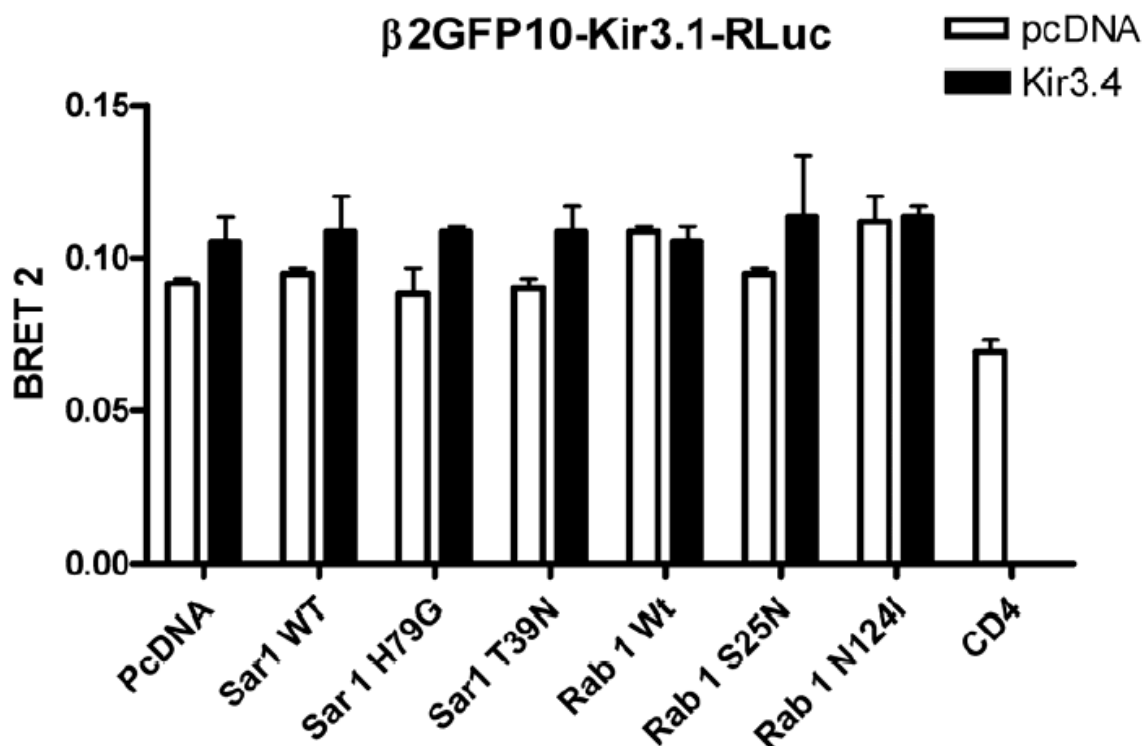


Figure 42 : L'interaction entre les récepteurs et les effecteurs est insensible aux DN des petites protéines G.

Le signal de BRET détecté entre le récepteur  $\beta_2$ AR et le Kir3.1 n'est pas modifié par la présence de Sar1 ou de Rab1, même dans le cas où le trafic intracellulaire du canal Kir3.1/Kir3.4 est bloqué (Sar1 H79G et Rab1 S25N), suggérant que le complexe effecteur/récepteur se forme dans le réticulum endoplasmique, suivant la biosynthèse des protéines.

Par la technique de BRET, nous avons montré au chapitre 3 qu'aucun des mutants DN des petites protéines G employés ne modifie le signal de BRET entre la sous-unité Kir3.1 et le dimère  $G\beta\gamma$ , en absence ou en présence de la sous-unité Kir3.4 (Figure 29). Puisque nous savons que le canal Kir3.1/Kir3.4 est retenu au RE lorsque les protéines Sar1

H79G ou Rab1 S25N sont exprimées, ces résultats suggèrent que l'interaction entre le dimère et le canal se fait initialement au RE. L'interaction entre la protéine ACII et le dimère  $G\beta\gamma$  est aussi insensible aux différentes protéines mutantes de Sar1 et des Rabs [97], supposant un mécanisme commun, pour la formation des complexes avec le dimère  $G\beta\gamma$ , pour les différents effecteurs.

La même stratégie a été utilisée afin d'identifier le lieu de formation des complexes comprenant la sous-unité  $G\alpha$ . Les résultats obtenus par cette méthode sont toutefois beaucoup plus complexes à analyser que ceux obtenus pour le dimère  $G\beta\gamma$ . En premier lieu, nous avons montré que le signal de BRET entre les récepteurs  $\beta_2AR$  et la sous-unité  $G\alpha_i$  ou  $G\alpha_s$  est réduit en présence des DN Sar1H79G (GTP) et Rab1 N124I (GTP), mais non lorsque les DN Sar1T39N(GDP) et Rab1 S25N(GDP) sont présents [148]. Par ailleurs, nous avons aussi observé une diminution d'environ 50% des sous-unités  $G\alpha$  immunoprécipitant avec le récepteur  $\beta_2AR$  en présence de Sar1H79G versus Sar1 de type sauvage [148]. De plus, la surexpression des DN bloqués sous la forme GTP provoque aussi la diminution du signal de BiFC/BRET observé entre le dimère YFP<sub>1-158</sub>- $G\beta_1$ /YFP<sub>159-238</sub>- $G\gamma_2$  et la sous-unité  $G\alpha_i$ -Rluc, mais seulement si le récepteur  $\beta_2AR$  est aussi co-exprimé [148]. De plus, l'interaction entre l'ACII et les sous-unités  $G\alpha_i$  et  $G\alpha_s$  est sensible aux DN de Rab1 bloqués sous la forme GTP et GDP, mais seulement à la forme GTP de Sar1 (H79G) [97]. D'après ces résultats, il avait été suggéré que les interactions entre la sous-unité  $G\alpha$  et les autres membres de signalisation tels que les récepteurs, les effecteurs et le dimère  $G\beta\gamma$  (si les récepteurs sont présents) se produisent initialement après la formation du site d'export du RE, mais avant la fusion finale avec l'appareil de Golgi.

Nous avons aussi étudié, par la stratégie des DN des petites protéines G, le lieu de la formation des interactions entre les canaux Kir3.1 et la sous-unité  $G\alpha_i$ . Aucun des 4 mutants Sar1 et Rab1 ne parvient à diminuer le signal de BRET entre le Kir3.1-GFP et la

sous-unité  $G\alpha$ -RLuc, en présence ou en absence du dimère  $G\beta\gamma$  et/ou de la sous-unité Kir3.4 (Figure 43), suggérant une interaction précoce au RE entre le canal et le  $G\alpha$ . Ces résultats sont surprenants si l'on considère ceux obtenus avec l'ACII, mais appuient l'idée que, si l'interaction Kir3.1/ $G\beta\gamma$  peut être modulée par la stimulation des récepteurs intracellulaires, les complexes situés au RE sont complets et fonctionnels. Par le fait même, le BRET induit par le cimatérol, entre le Kir3.1 et le dimère  $G\beta\gamma$  est insensible aux DN de Sar1 (Figure 44).

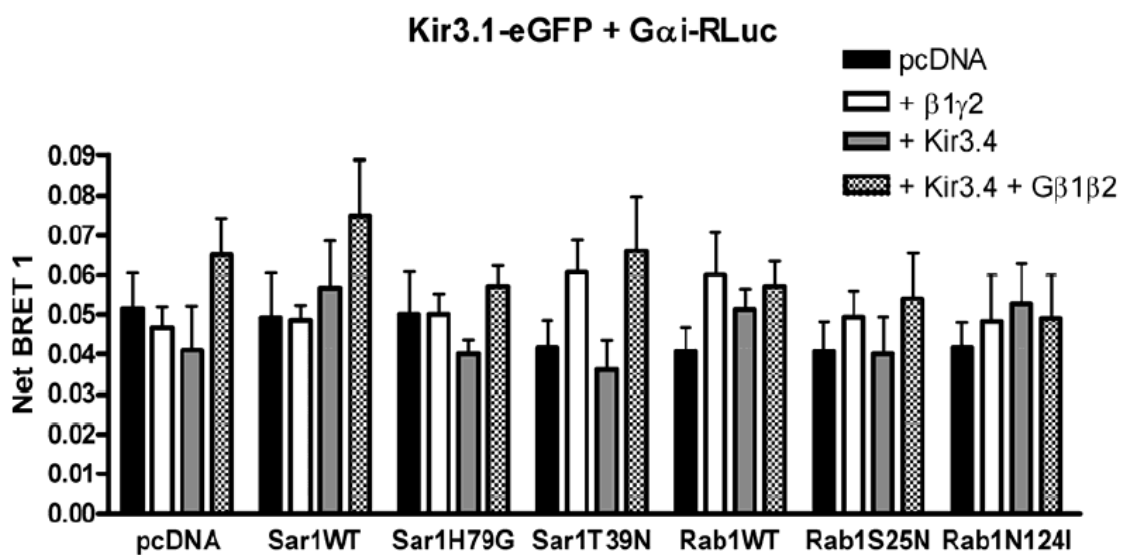


Figure 43 : L'interaction Kir3.1 et  $G\alpha$  est insensible à Sar1 et Rab1 DN.

Le signal de BRET entre la sous-unité Kir3.1 et  $G\alpha$  n'est pas modifiée par la co-expression des DN de Sar1 et Rab1, en présence ou en absence des sous-unités  $G\beta\gamma$  et Kir3.4, suggérant que l'interaction entre le Kir3.1 et le  $G\alpha$  se fait au RE.

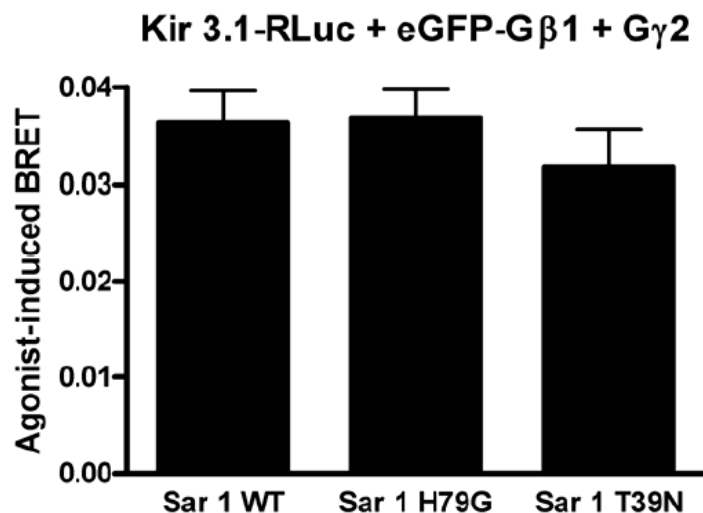


Figure 44 : *L'effet du cimatérol n'est pas inhibé par les protéines Sar1 DN.*

La stimulation des récepteurs  $\beta_2$ AR par un agoniste liposoluble permet de modifier le signal de BRET entre la sous-unité Kir3.1 et le dimère G $\beta\gamma$ . La présence des DN de Sar1 bloquant le trafic intracellulaire entre le RE et le Golgi n'affecte pas l'induction du signal de BRET par le cimatérol, suggérant que les complexes de signalisation sont préformés au RE.

Avec la réconciliation de tous ces résultats, de nouvelles hypothèses concernant le lieu initial de l'interaction entre les sous-unités G $\alpha$  et le reste des protéines de signalisation peuvent être avancées. La première hypothèse est que la sous-unité G $\alpha$  est présente avec les complexes récepteurs/G $\beta\gamma$ /effecteurs au RE, mais sous une forme immature qui réduit sa capacité à communiquer avec les autres membres de la signalisation. Le manque de communication entre la sous-unité G $\alpha$  et le récepteur pourrait aider à prévenir l'activation prématurée des complexes de signalisation avant que ceux-ci ne soient prêts à être envoyés à leur destination finale. Cette hypothèse est appuyée, en outre, sur le fait que seulement les formes Sar1GTP (H79G) et Rab1GTP (N124I) diminuent l'interaction entre la sous-unité G $\alpha$  et les récepteurs alors que les formes Sar1GDP(T39N) ou Rab1GDP (S25N) bloquent

tout autant l'acheminement à la membrane du récepteur que leurs formes GTP respectives. Est-ce le fait de compacter les récepteurs dans les sites d'exports ou les vésicules de transport par la surexpression des DN Sar1-GTP et Rab1-GTP qui restreint l'accès de la protéine G pour les récepteurs? De plus, il est surprenant de voir que dans le cas de l'interaction ACII/ $G\alpha$ , en plus de l'effet des DN sous la forme GTP, le Rab1-GDP (S25N) diminue aussi le signal de BRET, sans toutefois avoir un effet inhibiteur sur l'accumulation de cAMP suite à un traitement à la forskoline [97]. Cependant, dans le cas de l'ACII, puisque l'effet de l'expression des DN de Sar1 et des Rabs sur l'acheminement à la membrane de l'enzyme n'a pas été identifié clairement, il est plus difficile d'établir une relation directe entre l'effet des DN de Sar1 et de Rab1 et le lieu de la formation des complexes  $G\alpha$ /ACII.

Puisqu'un effet des DN de Sar1 et Rab1 est observé pour l'interaction ACII/ $G\alpha$ , mais non pour l'interaction Kir3.1/ $G\alpha$ , une deuxième hypothèse peut aussi être avancée, soit que les lieux de formation des complexes de signalisation sont différents et dépendent des membres impliqués dans ces complexes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'interaction entre la sous-unité  $G_{\alpha i}$  et le récepteur  $\beta_2$ AR et l'effet de la surexpression des effecteurs Kir3.1, Kir3.1/Kir3.4 ou de l'ACII en présence de Sar1 de type sauvage ou de sa forme DN GTP (H79G) (Figure 45). Cependant, la présence des effecteurs ne permet pas de contrer l'effet de Sar1H79G sur l'interaction récepteur/ $G\alpha$ .

Des études complémentaires devront être réalisées afin d'éclaircir le mystère du lieu initial de l'interaction entre la sous-unité  $G\alpha$  et les différents récepteurs et effecteurs. L'identification des chaperones moléculaires responsables du repliement de la sous-unité  $G\alpha$  et de l'assemblage subséquent de l'hétérotrimère pourrait s'avérer utile afin de déterminer à quel moment le dimère  $G\beta\gamma$  peut s'engager avec la sous-unité  $G\alpha$  et par conséquent former une protéine fonctionnelle pour la signalisation.

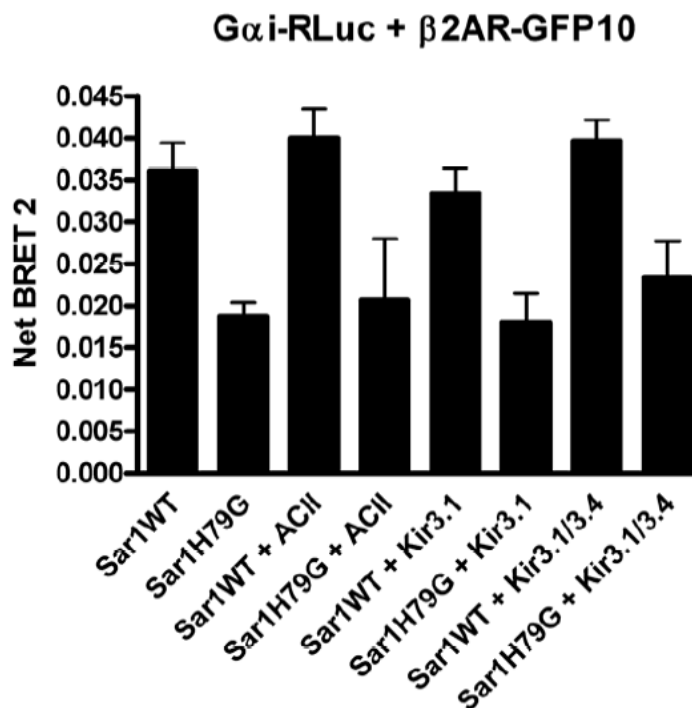


Figure 45 : *Effet de Sar1 H79G sur l'interaction entre le récepteur et le G $\alpha$ i.*

Le signal de BRET entre le récepteur  $\beta$ <sub>2</sub>AR et la sous-unité G $\alpha$ i, co-exprimés avec le dimère G $\beta$  $\gamma$  est réduit par la présence de Sar1H79G. L'ajout des effecteurs ne permet pas de contrer l'effet de Sar1H79G sur l'interaction G $\alpha$ i/ $\beta$ <sub>2</sub>AR.

### **Que deviennent les complexes une fois à la membrane plasmique?**

Nous nous sommes principalement intéressés à la formation des complexes de signalisation suivant la biosynthèse des protéines et de leur transport antérograde du RE jusqu'à la membrane plasmique. Néanmoins, beaucoup d'efforts devront être déployés afin d'identifier les mécanismes permettant de conserver la sélectivité des voies de signalisation suivant le recyclage des récepteurs internalisés. Il a été démontré que les récepteurs et les



protéines  $G\alpha$  prennent des routes différentes suivant l'internalisation du récepteur [253] et que le dimère  $G\beta\gamma$  peut transloquer au Golgi suivant l'activation des récepteurs [103]. Toutefois, les mécanismes permettant aux récepteurs recyclés de reformer les complexes de signalisation sont encore inconnus. Il serait intéressant de déterminer si les protéines recyclées peuvent interagir avec les protéines nouvelles formées ou si la formation initiale des complexes de signalisation est restrictive aux protéines en biosynthèse.

### **Spécificité des complexes de signalisation**

Mis à part la sous-unité  $G\beta 5$ , les études *in vitro* étudiant l'interaction entre le dimère  $G\beta\gamma$  les canaux Kir3, ainsi que les études de fonctionnalité par électrophysiologie ont montré très peu de sélectivité entre le canal et les différentes sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  [254-256]. Nous nous sommes donc intéressés à la question de la spécificité de l'interaction entre le dimère  $G\beta\gamma$  et la sous-unité Kir3.1, du point de vue de l'interaction intracellulaire, se produisant suivant la biosynthèse des protéines. L'utilisation de protéines de fusion GFP- $G\beta 1-5$  a révélé qu'un signal de BRET peut être détecté entre la sous-unité Kir3.1-RLuc et les sous-unités eGFP- $G\beta 1, 3$  et  $4$  et ce, en présence de  $G\gamma 2$ , mais non avec les sous-unités  $G\beta 2$  ou  $G\beta 5$  (Figure 21A). Afin de déterminer les sous-unités possédant la meilleure affinité pour le Kir3.1 nous avons fait des études de compétition et de saturation. Fait surprenant, la sous-unité  $G\beta 2$  possède la plus grande capacité à inhiber l'interaction de BRET entre le Kir3.1 et la sous-unité  $G\beta 1$ , suivit de près par la sous-unité  $G\beta 1$ . Les sous-unités  $G\beta 3$  et  $G\beta 4$  peuvent aussi inhiber l'interaction Kir3.1/ $G\beta 1$ , mais dans une moindre mesure, alors que le  $G\beta 5$  n'a aucun effet (Figure 22A). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par le groupe de Gautam qui a montré que, par double hybride, les sous-unités  $G\beta 1$  et  $G\beta 2$  se lient plus facilement à l'extrémité N-terminale de Kir3.1 que les sous-unités  $G\beta 3$  ou  $G\beta 4$  [257]. Cependant, les résultats obtenus par la détection du BRET direct entre la sous-unité  $G\beta 2$  et le Kir3.1 et ceux obtenus par l'étude de compétition sont contradictoires.

Malgré le fait que la construction eGFP-G $\beta$ 2 puisse diminuer l'activité transcriptionnelle de AP-1, induite par le PMA, aucune interaction de BRET n'a pu être détectée entre la protéine eGFP-G $\beta$ 2 et la sous-unité RLuc-G $\gamma$ 2 (résultats non publiés), même s'il est connu que ces deux sous-unités peuvent dimériser. Par conséquent, même si la protéine de fusion eGFP-G $\beta$ 2 possède une fonction normale, elle n'est pas un bon accepteur pour le BRET. Puisque les sous-unités G $\beta$ 1-4 possèdent une homologie de séquence de 78-88% et que les constructions eGFP-G $\beta$ 1-5 ont été réalisées à partir de la même stratégie de clonage [258, 259], il était attendu qu'elles possèdent des propriétés similaires pour le BRET.

Une protéine mutante de G $\beta$ 1 (G $\beta$ 1I18E) ne permettant pas sa dimérisation avec les sous-unités G $\gamma$  a été utilisée afin de déterminer si la sous-unité G $\gamma$  est nécessaire à l'interaction entre le Kir3.1 et la sous-unité G $\beta$ 1. Le mutant G $\beta$ 1I18E ne permet que de compétitionner faiblement pour l'interaction de BRET entre le canal Kir3.1-RLuc et la sous-unité GFP-G $\beta$ 1, tout en s'exprimant à des niveaux similaires à la sous-unité de type sauvage, (Figure 23) suggérant que la présence de la sous-unité G $\gamma$  est primordiale pour l'interaction Kir3.1/G $\beta$ . Cependant, puisque ce mutant n'est pas bien caractérisé, il serait possible que l'effet observé soit dépendant d'un tout autre mécanisme que celui proposé. Contrairement aux sous-unités G $\beta$ 1-4, les sous-unités G $\gamma$  montrent une plus grande diversité dans leurs séquences, ce qui laisse croire qu'elles pourraient être impliquées dans la spécificité de la signalisation. Les expériences de BRET ont en effet montré que la combinaison G $\beta$ /G $\gamma$  est importante pour la spécificité. L'expression des sous-unités G $\gamma$ 1 et G $\gamma$ 11 permet l'interaction entre le Kir3.1-RLuc et le GFP-G $\beta$ 1, mais ne permet pas l'interaction canal/G $\beta$ 3 ou G $\beta$ 4. L'incapacité de ces dimères spécifiques à interagir avec le canal ne peut pas être seulement expliquée par une impossibilité à former un dimère. Des études *in vitro* ou dans des systèmes de surexpression ont montré que la sous-unité G $\gamma$ 1 peut dimériser avec les sous-unités G $\beta$ 1 et G $\beta$ 4, mais pas avec les sous-unités G $\beta$ 3 alors que la sous-unité G $\gamma$ 11 possède la capacité de dimériser avec les trois sous-unités G $\beta$

mentionnées [260, 261]. Ces résultats indiquent alors que la sous-unité  $G\gamma$  a aussi un rôle important pour la formation des complexes canal/protéines G en plus d'un rôle pour la spécificité de ces interactions.

### **Rôles pour les différents sites de liaisons $G\beta\gamma$ ?**

Puisqu'un canal tétramérique fonctionnel possède de 8 à 12 domaines d'interaction avec les protéines G [71, 262], les complexes canaux/Kir3 ont probablement une grande flexibilité conformationnelle même s'ils interagissent ensemble avant et après leur activation. Il est physiquement impossible pour le canal de recueillir 12 protéines G au même moment, mais nous croyons que les différents sites de liaisons possèdent différentes fonctions. Il semblerait aussi que les différents sites n'aient pas tous la même affinité envers les protéines G. La séquestration du dimère  $G\beta\gamma$ , par l'expression de  $\beta$ ARKct-CD8, se solde par un changement du BRET50 observé pour l'interaction Kir3.1- $G\gamma 2$ , signifiant un changement dans l'affinité de liaison (dissociation du complexe protéine G/effecteurs) plutôt qu'un seul changement de conformation. Cependant, lorsqu'exprimées sous la forme d'une fonction logarithmique, ces expériences montrent clairement deux sites d'affinités différents pour la liaison de la sous-unité  $G\gamma 2$  sur le Kir3.1. La fonction des différents sites de liaisons n'a pas encore été déterminée, mis à part pour le domaine de liaison situé sur le segment distal de l'extrémité C-terminale qui serait un domaine de faible affinité responsable de l'activation du canal induite par un agoniste [263]. Des mutations dans ce domaine de liaison éliminent l'activation induite par un agoniste sans toutefois inhiber l'activité basale du canal dépendante du dimère  $G\beta\gamma$ . Ceci implique donc que l'activation induite par un agoniste et l'activité constitutive du canal sont sous la régulation de sites de liaison différents. La relation entre les sites de hautes et de faibles affinités, de l'activité basale versus l'activation induite ainsi que la stoechiométrie de la liaison  $G\beta\gamma$ /canal ne sont pas encore bien compris. Nous pensons que les sites de liaison impliqués dans l'activation

du canal sont différents des sites de liaisons responsables de la formation intracellulaire des complexes de signalisation et possèdent des affinités distinctes.

Tel que mentionné précédemment, mis à part la sous-unité  $G\beta 5$  qui inhibe les canaux Kir3, les études fonctionnelles ont eu peu de succès à identifier une spécificité pour les différents dimères  $G\beta\gamma$  pour l'activation de ces canaux. Cependant, en regardant les interactions se produisant au RE entre les canaux et les protéines G, une sélectivité peut être observée. Le fait que les combinaisons GFP- $G\beta 3\gamma 11$  et GFP- $G\beta 4\gamma 11$  ne soient pas capables d'interagir, par la technique de BRET, avec la sous-unité Kir3.1, mais qu'elles soient capables d'augmenter les courants du canal Kir3.1/Kir3.4 [254] souligne un rôle distinct entre les interactions précoces observées au RE et les interactions menant aux événements de signalisation. Il semblerait que les interactions dites précoces soient plus sélectives que les interactions dites tardives. Il serait intéressant de pouvoir identifier les sites de liaison impliqués dans la formation des complexes et les sites de liaison nécessaires à l'activité fonctionnelle du canal. Les sous-unités Kir3 possèdent au moins deux sites d'interaction avec des affinités différentes et l'interaction entre cette sous-unité et le dimère  $G\beta\gamma$  peut être modifiée par la stimulation des récepteurs sans changer le BRET50, donc sans le recrutement de nouvelles protéines. Ces résultats suggèrent que les interactions responsables de la signalisation pourraient aussi être exposées très tôt durant la biosynthèse des protéines, mais posséderaient des affinités beaucoup plus faibles pour le canal que les interactions responsables de la sélectivité des complexes. Puisque les canaux sont formés de quatre sous-unités, le nombre de sites possédant des affinités différentes pourrait être supérieur à deux. De plus, d'autres protéines interagissant avec le dimère  $G\beta\gamma$  possèdent aussi potentiellement plusieurs sites de liaisons, dont les oligomères de RCPGs.

## **Un rôle pour le dimère $G\beta\gamma$ dans la formation des complexes?**

Les dimères  $G\beta\gamma$  interagissent directement avec les effecteurs tels que l'ACII et les Kir3, mais aussi avec les récepteurs [264-266], tout comme la sous-unité  $G\alpha$ . Puisque les effecteurs et les récepteurs possèdent des sites d'interaction pour les protéines G, il est probable que cette interaction ne serve pas seulement à l'activation des effecteurs, mais aussi à établir un complexe spécifique récepteurs-effecteurs. Puisque nos résultats démontrent clairement que le dimère  $G\beta\gamma$  interagit au niveau du RE avec les récepteurs et les effecteurs, nous pensons que le dimère puisse agir en tant que protéine d'échafaudage ou protéine chaperonne pour la formation des complexes. Afin de tester cette hypothèse, notre laboratoire travaille présentement à abolir l'expression des différentes sous-unités  $G\beta\gamma$  endogènes présentes dans les cellules HEKs par des shRNA afin d'identifier l'effet de cette suppression sur la formation et l'acheminement à la membrane des complexes récepteurs/effecteurs.

## **Les nouveaux rôles de $G\beta\gamma$**

Malgré le fait que le dimère  $G\beta\gamma$  ait été découvert il y a près de 30 ans, l'identification récente de nombreuses protéines interagissant avec le dimère laisse penser qu'il y a encore beaucoup de travail à faire afin de bien comprendre tous les rôles du dimère, autant du point de vue physiologique que pathophysiologique. Le dimère  $G\beta\gamma$  ne possède pas de sites catalytiques et agit donc comme régulateur de la signalisation par des interactions protéines/protéines directes. Nous avons identifié une nouvelle classe de protéine interagissant avec la sous-unité  $G\beta$ , soit les protéines FosB et c-Fos, membres du complexe de transcription AP-1. Cette interaction peut être détectée par BiFC ou co-immunoprécipitation suivant la co-expression de  $G\beta$  et de Fos dans des cellules HEKs. Suivant un traitement aux amphétamines, ce qui permet d'augmenter les niveaux cellulaires

de FosB dans le cerveau, l'interaction entre la sous-unité G $\beta$ 1 et la protéine FosB peut aussi être détectée par co-immunoprécipitation dans des extraits de cerveaux de rats traités. Les résultats *in vivo* confirment que l'interaction observée n'est pas seulement la résultante d'une surexpression exogène des protéines dans les cellules et que cette interaction possède un rôle physiologique ou pathologique dans les organismes vivants. La surexpression du dimère G $\beta\gamma$  diminue l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1, sans toutefois empêcher la dimérisation des protéines Fos et Jun ou leur capacité à interagir avec l'ADN. De plus, la présence de c-Fos et de c-Jun augmente la translocation nucléaire du dimère G $\beta\gamma$ . Le mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 se fait par un recrutement des protéines HDACs, par le dimère G $\beta\gamma$ .

Ce n'est pas la première fois qu'un rôle pour le dimère G $\beta\gamma$  est observé dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, par des interactions directes avec les récepteurs aux glucocorticoïdes [2] ou avec l'AEBP1 [197], un co-répresseur de la transcription, le dimère G $\beta\gamma$  permet d'inhiber ou d'activer, respectivement, la transcription génique. Il a aussi été observé que l'interaction entre HDAC5 et le dimère G $\beta\gamma$  [1] permet de libérer le facteur de transcription MEF2, normalement séquestré par HDAC5, qui peut ainsi activer la transcription de certains gènes. D'après nos résultats et ces derniers, l'interaction G $\beta\gamma$  et HDAC5 permet autant l'activation que l'inhibition de la transcription génique, dépendant du facteur de transcription étudié. Cependant, les mécanismes dictant l'effet transcriptionnel des complexes formés entre le dimère G $\beta\gamma$  et les protéines nucléaires ne sont pas encore connus.

Nous avons proposé que le mécanisme d'inhibition de l'activité du complexe AP-1 par le dimère G $\beta\gamma$  fait partie d'une boucle de rétroinhibition, contrôlant ainsi l'activité des protéines oncogènes Fos et Jun. En effet, l'activation des RCPGs couplés aux sous-unités G $\alpha_q$  mène à l'activation du promoteur de c-Fos et l'activation subséquente du complexe

AP-1, et ce, de façon dépendante du dimère  $G\beta\gamma$  et des kinases ERK et JNK [267]. De plus, le promoteur de la sous-unité  $G\beta 1$  contient des sites de régulation reconnus par le facteur AP-1 [268]. Alors, d'après ces informations et ce que nous avons observé, l'activation du dimère  $G\beta\gamma$  couplé à la protéine  $G\alpha_q$  permet l'activation du complexe AP-1 de façon indirecte, augmente les niveaux du dimère  $G\beta\gamma$  alors que l'interaction entre le dimère  $G\beta\gamma$  et le complexe AP-1 inhibe son activité transcriptionnelle. Il serait intéressant de déterminer si ce sont les dimères  $G\beta\gamma$  libérés par l'activation du récepteur qui sont responsable de l'inhibition du complexe AP-1 ou si ce sont des dimères  $G\beta\gamma$  provenant d'une autre source intracellulaire, tels que les nouveaux dimères synthétisés. De plus, le contexte biologique dans lequel cette inhibition a lieu, est encore inconnue, ainsi que les gènes affectés par le recrutement des HDACs, par le dimère  $G\beta\gamma$  sur les promoteurs dépendant du complexe AP-1.

Le fait que la liste des effecteurs non classiques du dimère  $G\beta\gamma$ , localisés à de nombreux compartiments intracellulaires, ne cesse d'augmenter suggère que le dimère  $G\beta\gamma$  possède nombre de rôles encore inconnus. Il est maintenant clair que le dimère  $G\beta\gamma$  a un effet important sur la transcription génique.

## **La protéine G comme cible thérapeutique?**

La majorité des drogues qui visent les voies de signalisation des RCPGs agissent directement sur le récepteur, ciblant le site de liaison du ligand. Toutefois, la plupart de ces drogues ne font pas la distinction entre les différents isoformes des récepteurs, leurs sites d'expression ou les différentes voies de signalisation auxquelles un même récepteur peut être couplé. Ce manque de spécificité est grandement responsable des nombreux effets secondaires causés par les drogues présentement sur le marché. La connaissance de la spécificité des interactions entre les récepteurs, protéines G, effecteurs et molécules

régulatrices, ainsi que les composantes exactes des différentes voies de signalisation pourront permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la formation, l'acheminement membranaire ou la fonction de ces complexes. Ces stratégies pourraient permettre de bloquer spécifiquement les interactions menant à la formation d'un complexe spécifique et/ou d'en favoriser la transduction de signal, sans nécessairement cibler le récepteur, mais les protéines qui y sont associées.

Vu leur grande variété d'isoformes différents et leur interaction directe avec les récepteurs, les sous-unités  $G\alpha$ , les effecteurs et les molécules régulatrices telles que les RGS ou les GRKs, le dimère  $G\beta\gamma$  est une cible de choix pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. La séquestration du dimère  $G\beta\gamma$  par  $\beta$ ARKct s'avère efficace afin d'augmenter la fonction cardiaque des cœurs normaux ou défaillants [269, 270] en plus d'être efficace pour inhiber la formation et la croissance des tumeurs de la prostate [271]. Dans le cas des cœurs défaillants,  $\beta$ ARKct peut être délivré localement par injection d'adénovirus, où son expression est transitoire. Cette stratégie est efficace pour un traitement à court terme, tel que lors d'une chirurgie, mais n'est pas envisageable à long terme et de façon répétitive. Dû à son manque de spécificité,  $\beta$ ARKct ne peut probablement pas être utilisé autrement que par une expression locale.

Puisque le ciblage du dimère  $G\beta\gamma$  semble être une avenue prometteuse pour le traitement de plusieurs maladies, de nombreux efforts sont faits afin de développer des molécules inhibitrices ayant une plus grande spécificité d'action. Le but ultime de ces recherches étant de pouvoir cibler une voie de signalisation en particulier sans modifier les autres fonctions des protéines G. Il a été montré que certaines mutations sur la sous-unité  $G\beta 1$  altèrent spécifiquement la régulation du canal Kir3.1 sans interférer avec les autres fonctions du dimère telles que l'activation de la PLC $\beta 2$  [272]. Ceci suggère qu'il est donc



possible de cibler spécifiquement les différentes interactions entre le dimère  $G\beta\gamma$  et ses effecteurs. À partir de ces informations, le groupe de Smrcka a développé de petites molécules étant capables de cibler des fonctions différentes du dimère  $G\beta\gamma$ . Par exemple, le peptide SIRK bloque la régulation des protéines  $PLC\beta 2$  et  $PI3K\gamma$ , sans toutefois affecter la régulation de l'ACI et des canaux calciques de type N [273], tout dépendant du dimère  $G\beta\gamma$ . La petite molécule M201, développée par le même groupe, permet, quant à elle, de potentialiser l'effet de  $G\beta\gamma$  sur les protéines  $PLC\beta 3$  et  $PI3K\gamma$ , sans affecter la régulation de  $PLC\beta 2$  [273]. Ces études suggèrent qu'il est possible de développer des composés très spécifiques pour les différentes voies de signalisation afin d'inhiber ou de favoriser l'activation des effecteurs, révélant ainsi le grand potentiel de cette stratégie qui pourrait être employée dans le traitement des maladies cardiovasculaires, de certains types de cancer ou des maladies inflammatoires.

Si nous réussissons à identifier les caractéristiques différenciant les sites d'interaction responsables de la formation des complexes et ceux responsables de l'activation des canaux, nous croyons qu'il serait possible de développer des outils permettant de cibler spécifiquement la formation des complexes de signalisation, empêchant ainsi les cellules d'exprimer les voies de signalisation néfaste pour son intégrité.

## Conclusion

Nos travaux suggèrent que la signalisation par les RCPGs peut être la résultante de la formation d'un complexe stable et spécifique durant la biosynthèse des protéines plutôt que des interactions aléatoires et transitoires à la membrane plasmique suivant la stimulation d'un récepteur par son agoniste. L'assemblage précoce des complexes de signalisation, incluant le récepteur, la protéine G hétérotrimérique et les effecteurs pourrait être un mécanisme important afin de réguler la spécificité de la signalisation en permettant l'expression à la membrane plasmique de complexe prédéfini. Le dimère  $G\beta\gamma$  possède de nombreuses fonctions autres que l'activation des effecteurs membranaires. Nous avons montré un rôle de  $G\beta\gamma$  dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1, par un mécanisme impliquant une interaction directe entre la sous-unité  $G\beta$  et les protéines Fos ainsi que le recrutement des protéines HDAC par le dimère  $G\beta\gamma$ .

## Bibliographie

- [1] Spiegelberg BD, Hamm HE. *J Biol Chem* 2005;280(50):41769-41776.
- [2] Kino T, Tiulpakov A, Ichijo T, Chheng L, Kozasa T, Chrousos GP. *J Cell Biol* 2005;169(6):885-896.
- [3] Gether U, Kobilka BK. *J Biol Chem* 1998;273(29):17979-17982.
- [4] Lagerstrom MC, Schioth HB. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(4):339-357.
- [5] Hildebrandt JD, Codina J, Risinger R, Birnbaumer L. *J Biol Chem* 1984;259(4):2039-2042.
- [6] Brandt DR, Ross EM. *J Biol Chem* 1985;260(1):266-272.
- [7] Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Smigel MD, Gilman AG. *J Biol Chem* 1987;262(2):762-766.
- [8] Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. *Nature* 1987;325(6102):321-326.
- [9] Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. *J Biol Chem* 1994;269(8):6093-6100.
- [10] Zhang S, Coso OA, Collins R, Gutkind JS, Simonds WF. *J Biol Chem* 1996;271(33):20208-20212.
- [11] Philip F, Sengupta P, Scarlata S. *J Biol Chem* 2007;282(26):19203-19216.
- [12] Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. *Nature* 1997;385(6615):442-446.
- [13] Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H. *DNA Res* 2000;7(2):111-120.
- [14] Downes GB, Gautam N. *Genomics* 1999;62(3):544-552.
- [15] Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. *Nature* 1993;366(6456):654-663.
- [16] Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. *Nature* 1994;369(6482):621-628.
- [17] Robishaw JD, Berlot CH. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(2):206-209.
- [18] Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. *Science* 1991;252(5007):802-808.
- [19] Smrcka AV. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(14):2191-2214.
- [20] Schwindinger WF, Robishaw JD. *Oncogene* 2001;20(13):1653-1660.

- [21] Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. *Nature* 1996;379(6563):369-374.
- [22] Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR. *Cell* 1995;83(6):1047-1058.
- [23] Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. *Nature* 1996;379(6563):311-319.
- [24] Spring DJ, Neer EJ. *J Biol Chem* 1994;269(36):22882-22886.
- [25] Watson AJ, Katz A, Simon MI. *J. Biol. Chem.* 1994;269(35):22150-22156.
- [26] Jones PG, Lombardi SJ, Cockett MI. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1998;1402(3):288-291.
- [27] Liang JJ, Cockett M, Khawaja XZ. *J Neurochem* 1998;71(1):345-355.
- [28] Snow BE, Krumins AM, Brothers GM, Lee SF, Wall MA, Chung S, Mangion J, Arya S, Gilman AG, Siderovski DP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(22):13307-13312.
- [29] Zhou JY, Toth PT, Miller RJ. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(2):460-466.
- [30] Ueda N, Iniguez-Lluhi JA, Lee E, Smrcka AV, Robishaw JD, Gilman AG. *J Biol Chem* 1994;269(6):4388-4395.
- [31] Balcueva EA, Wang Q, Hughes H, Kunsch C, Yu Z, Robishaw JD. *Exp Cell Res* 2000;257(2):310-319.
- [32] Ong OC, Yamane HK, Phan KB, Fong HK, Bok D, Lee RH, Fung BK. *J Biol Chem* 1995;270(15):8495-8500.
- [33] Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR. *J Biol Chem* 1995;270(2):503-506.
- [34] Peng L, Mirshahi T, Zhang H, Hirsch JP, Logothetis DE. *J Biol Chem* 2003;278(50):50203-50211.
- [35] Heithier H, Frohlich M, Dees C, Baumann M, Haring M, Gierschik P, Schiltz E, Vaz WL, Hekman M, Helmreich EJ. *Eur J Biochem* 1992;204(3):1169-1181.
- [36] Phillips WJ, Wong SC, Cerione RA. *J Biol Chem* 1992;267(24):17040-17046.
- [37] Kisselev O, Ermolaeva M, Gautam N. *J Biol Chem* 1995;270(43):25356-25358.
- [38] Corey S, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. *J Biol Chem* 1998;273(9):5271-5278.
- [39] Silverman SK, Lester HA, Dougherty DA. *J Biol Chem* 1996;271(48):30524-30528.

- [40] Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. *Curr Opin Neurobiol* 1995;5(3):268-277.
- [41] Dascal N. *Cell Signal* 1997;9(8):551-573.
- [42] Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. *Science* 1998;280(5360):69-77.
- [43] Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. *Biophys J* 1994;66(4):1061-1067.
- [44] Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. *Nature* 1987;325(7000):156-159.
- [45] Vandenberg CA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(8):2560-2564.
- [46] Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. *Nature* 1994;372(6504):366-369.
- [47] Flynn GE, Johnson JP, Jr., Zagotta WN. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(9):643-651.
- [48] Bunemann M, Brandts B, zu Heringdorf DM, van Koppen CJ, Jakobs KH, Pott L. *J Physiol* 1995;489 ( Pt 3):701-707.
- [49] Grudt TJ, Williams JT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(23):11429-11432.
- [50] Hille B. *Neuron* 1992;9(2):187-195.
- [51] Lacey MG, Mercuri NB, North RA. *J Physiol* 1988;401:437-453.
- [52] North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(15):5487-5491.
- [53] Oh U, Ho YK, Kim D. *J Membr Biol* 1995;147(3):241-253.
- [54] Saugstad JA, Segerson TP, Westbrook GL. *J Neurosci* 1996;16(19):5979-5985.
- [55] van Koppen C, Meyer zu Heringdorf M, Laser KT, Zhang C, Jakobs KH, Bunemann M, Pott L. *J Biol Chem* 1996;271(4):2082-2087.
- [56] Hartzell HC. *Prog Biophys Mol Biol* 1988;52(3):165-247.
- [57] Szabo G, Otero AS. *Annu Rev Physiol* 1990;52:293-305.
- [58] Nicoll RA, Malenka RC, Kauer JA. *Physiol Rev* 1990;70(2):513-565.
- [59] Rainnie DG, Grunze HC, McCarley RW, Greene RW. *Science* 1994;263(5147):689-692.
- [60] Corey S, Clapham DE. *J Biol Chem* 1998;273(42):27499-27504.
- [61] Chan KW, Sui JL, Vivaudou M, Logothetis DE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(24):14193-14198.
- [62] Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE. *Nature* 1995;374(6518):135-141.

- [63] Velimirovic BM, Gordon EA, Lim NF, Navarro B, Clapham DE. *FEBS Lett* 1996;379(1):31-37.
- [64] Reuveny E, Slesinger PA, Inglese J, Morales JM, Iniguez-Lluhi JA, Lefkowitz RJ, Bourne HR, Jan YN, Jan LY. *Nature* 1994;370(6485):143-146.
- [65] Rishal I, Keren-Raifman T, Yakubovich D, Ivanina T, Dessauer CW, Slepak VZ, Dascal N. *J Biol Chem* 2003;278(6):3840-3845.
- [66] Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY. *Neuron* 1995;15(5):1133-1143.
- [67] Corey S, Clapham DE. *J Biol Chem* 2001;276(14):11409-11413.
- [68] Ivanova-Nikolova TT, Nikolov EN, Hansen C, Robishaw JD. *J Gen Physiol* 1998;112(2):199-210.
- [69] Nikolov EN, Ivanova-Nikolova TT. *Biophys J* 2004;87(5):3122-3136.
- [70] Ivanina T, Varon D, Peleg S, Rishal I, Porozov Y, Dessauer CW, Keren-Raifman T, Dascal N. *J Biol Chem* 2004;279(17):17260-17268.
- [71] Clancy SM, Fowler CE, Finley M, Suen KF, Arrabit C, Berton F, Kosaza T, Casey PJ, Slesinger PA. *Mol Cell Neurosci* 2005;28(2):375-389.
- [72] Brown SG, Thomas A, Dekker LV, Tinker A, Leaney JL. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289(3):C543-556.
- [73] Mao J, Wang X, Chen F, Wang R, Rojas A, Shi Y, Piao H, Jiang C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(4):1087-1092.
- [74] Cho H, Lee D, Lee SH, Ho WK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(12):4643-4648.
- [75] Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. *Sci STKE* 2001;2001(111):RE19.
- [76] Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. *Nature* 1998;391(6669):803-806.
- [77] Lopes CM, Remon JI, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, Logothetis DE. *Channels (Austin)* 2007;1(2):124-134.
- [78] Rusinova R, Shen YM, Dolios G, Padovan J, Yang H, Kirchberger M, Wang R, Logothetis DE. *Pflugers Arch* 2009.
- [79] Inomata N, Ishihara T, Akaike N. *Am J Physiol* 1989;257(4 Pt 1):C646-650.
- [80] Sodickson DL, Bean BP. *J Neurosci* 1996;16(20):6374-6385.
- [81] Breitwieser GE, Szabo G. *J Gen Physiol* 1988;91(4):469-493.

- [82] Doupnik CA, Davidson N, Lester HA, Kofuji P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(19):10461-10466.
- [83] Saitoh O, Kubo Y, Miyatani Y, Asano T, Nakata H. *Nature* 1997;390(6659):525-529.
- [84] Ma D, Zerangue N, Raab-Graham K, Fried SR, Jan YN, Jan LY. *Neuron* 2002;33(5):715-729.
- [85] Kennedy ME, Nemecek J, Corey S, Wickman K, Clapham DE. *J Biol Chem* 1999;274(4):2571-2582.
- [86] Mirshahi T, Logothetis DE. *J Biol Chem* 2004;279(12):11890-11897.
- [87] Jans DA. *Biochim Biophys Acta* 1992;1113(3-4):271-276.
- [88] Kuhn H. *Nature* 1980;283(5747):587-589.
- [89] Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN, Jr. *Annu Rev Physiol* 2002;64:153-187.
- [90] Bhandawat V, Reiser J, Yau KW. *Science* 2005;308(5730):1931-1934.
- [91] Benians A, Leaney JL, Milligan G, Tinker A. *J Biol Chem* 2003;278(12):10851-10858.
- [92] Benians A, Nobles M, Hosny S, Tinker A. *J Biol Chem* 2005;280(14):13383-13394.
- [93] Macrez-Lepretre N, Kalkbrenner F, Morel JL, Schultz G, Mironneau J. *J Biol Chem* 1997;272(15):10095-10102.
- [94] Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE, Bouvier M. *Nat Methods* 2005;2(3):177-184.
- [95] Nobles M, Benians A, Tinker A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(51):18706-18711.
- [96] Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M, Pineyro G. *J Biol Chem* 2008;283(22):15078-15088.
- [97] Dupre DJ, Baragli A, Rebois RV, Ethier N, Hebert TE. *Cell Signal* 2007;19(3):481-489.
- [98] Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH. *J Biol Chem* 2002;277(48):46010-46019.
- [99] David M, Richer M, Mamarbachi AM, Villeneuve LR, Dupre DJ, Hebert TE. *Cell Signal* 2006;18(12):2172-2181.
- [100] Bunemann M, Frank M, Lohse MJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(26):16077-16082.

- [101] Sternweis PC, Northup JK, Smigel MD, Gilman AG. *J Biol Chem* 1981;256(22):11517-11526.
- [102] Northup JK, Smigel MD, Sternweis PC, Gilman AG. *J Biol Chem* 1983;258(18):11369-11376.
- [103] Akgoz M, Kalyanaraman V, Gautam N. *J Biol Chem* 2004;279(49):51541-51544.
- [104] Calvert PD, Strissel KJ, Schiesser WE, Pugh EN, Jr., Arshavsky VY. *Trends Cell Biol* 2006;16(11):560-568.
- [105] Sokolov M, Lyubarsky AL, Strissel KJ, Savchenko AB, Govardovskii VI, Pugh EN, Jr., Arshavsky VY. *Neuron* 2002;34(1):95-106.
- [106] Orci L, Stammes M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE. *Cell* 1997;90(2):335-349.
- [107] Schekman R, Orci L. *Science* 1996;271(5255):1526-1533.
- [108] Schmid SL. *Annu Rev Biochem* 1997;66:511-548.
- [109] Rothman JE, Wieland FT. *Science* 1996;272(5259):227-234.
- [110] Nakano A, Brada D, Schekman R. *J Cell Biol* 1988;107(3):851-863.
- [111] Barlowe C, Schekman R. *Nature* 1993;365(6444):347-349.
- [112] Nishikawa S, Nakano A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(17):8179-8183.
- [113] Rossanese OW, Soderholm J, Bevis BJ, Sears IB, O'Connor J, Williamson EK, Glick BS. *J Cell Biol* 1999;145(1):69-81.
- [114] Sato M, Sato K, Nakano A. *J Cell Biol* 1996;134(2):279-293.
- [115] Huang M, Weissman JT, Beraud-Dufour S, Luan P, Wang C, Chen W, Aridor M, Wilson IA, Balch WE. *J Cell Biol* 2001;155(6):937-948.
- [116] Bi X, Corpina RA, Goldberg J. *Nature* 2002;419(6904):271-277.
- [117] Kuehn MJ, Herrmann JM, Schekman R. *Nature* 1998;391(6663):187-190.
- [118] Lederkremer GZ, Cheng Y, Petre BM, Vogan E, Springer S, Schekman R, Walz T, Kirchhausen T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(19):10704-10709.
- [119] Ma D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY. *Science* 2001;291(5502):316-319.
- [120] Zerial M, McBride H. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(2):107-117.
- [121] Plutner H, Cox AD, Pind S, Khosravi-Far R, Bourne JR, Schwaninger R, Der CJ, Balch WE. *J Cell Biol* 1991;115(1):31-43.



- [122] Matteoli M, Takei K, Cameron R, Hurlbut P, Johnston PA, Sudhof TC, Jahn R, De Camilli P. *J Cell Biol* 1991;115(3):625-633.
- [123] Martinez O, Antony C, Pehau-Arnaudet G, Berger EG, Salamero J, Goud B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(5):1828-1833.
- [124] Huber LA, Pimplikar S, Parton RG, Virta H, Zerial M, Simons K. *J Cell Biol* 1993;123(1):35-45.
- [125] Lledo PM, Vernier P, Vincent JD, Mason WT, Zorec R. *Nature* 1993;364(6437):540-544.
- [126] Su YC, Kao LS, Chu YY, Liang Y, Tsai MH, Chern Y. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200(3):1257-1263.
- [127] Lutcke A, Jansson S, Parton RG, Chavrier P, Valencia A, Huber LA, Lehtonen E, Zerial M. *J Cell Biol* 1993;121(3):553-564.
- [128] Seabra MC, Mules EH, Hume AN. *Trends Mol Med* 2002;8(1):23-30.
- [129] Hammer JA, 3rd, Wu XS. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(1):69-75.
- [130] Bridges TM, Lindsley CW. *ACS Chem Biol* 2008;3(9):530-541.
- [131] Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. *FEBS Lett* 2002;520(1-3):97-101.
- [132] Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M. *J Biol Chem* 1996;271(27):16384-16392.
- [133] Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M. *J Biol Chem* 2000;275(18):13727-13736.
- [134] Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Bhalla S, Walker P, Bouvier M. *J Biol Chem* 2001;276(6):4416-4423.
- [135] Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B. *Nature* 1997;386(6622):239-246.
- [136] White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. *Nature* 1998;396(6712):679-682.
- [137] Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. *Neuron* 2000;27(1):97-106.
- [138] Humphries P, Kenna P, Farrar GJ. *Science* 1992;256(5058):804-808.
- [139] Oksche A, Rosenthal W. *J Mol Med* 1998;76(5):326-337.
- [140] Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH, Bolbolan S, Bick DP, Sherins RR, Duck LW, Musgrove LC, Sellers JC, Neill JD. *Nat Genet* 1998;18(1):14-15.

- [141] Schulein R, Lorenz D, Oksche A, Wiesner B, Hermosilla R, Ebert J, Rosenthal W. *FEBS Lett* 1998;441(2):170-176.
- [142] Gabilondo AM, Hegler J, Krasel C, Boivin-Jahns V, Hein L, Lohse MJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(23):12285-12290.
- [143] Bermak JC, Li M, Bullock C, Zhou QY. *Nat Cell Biol* 2001;3(5):492-498.
- [144] Leclerc PC, Auger-Messier M, Lanctot PM, Escher E, Leduc R, Guillemette G. *Endocrinology* 2002;143(12):4702-4710.
- [145] Dupre DJ, Robitaille M, Richer M, Ethier N, Mamarbachi AM, Hebert TE. *J Biol Chem* 2007;282(18):13703-13715.
- [146] Satoh A, Tokunaga F, Kawamura S, Ozaki K. *J Cell Sci* 1997;110 ( Pt 23):2943-2953.
- [147] Wu G, Zhao G, He Y. *J Biol Chem* 2003;278(47):47062-47069.
- [148] Dupre DJ, Robitaille M, Ethier N, Villeneuve LR, Mamarbachi AM, Hebert TE. *J Biol Chem* 2006;281(45):34561-34573.
- [149] Mende U, Schmidt CJ, Yi F, Spring DJ, Neer EJ. *J Biol Chem* 1995;270(26):15892-15898.
- [150] Clapham DE, Neer EJ. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:167-203.
- [151] Leroux MR, Hartl FU. *Curr Biol* 2000;10(7):R260-264.
- [152] Hynes GM, Willison KR. *J Biol Chem* 2000;275(25):18985-18994.
- [153] Farr GW, Scharl EC, Schumacher RJ, Sondak S, Horwich AL. *Cell* 1997;89(6):927-937.
- [154] Siegers K, Bolter B, Schwarz JP, Bottcher UM, Guha S, Hartl FU. *Embo J* 2003;22(19):5230-5240.
- [155] Valpuesta JM, Martin-Benito J, Gomez-Puertas P, Carrascosa JL, Willison KR. *FEBS Lett* 2002;529(1):11-16.
- [156] Wells CA, Dingus J, Hildebrandt JD. *J Biol Chem* 2006;281(29):20221-20232.
- [157] Blaauw M, Knol JC, Kortholt A, Roelofs J, Ruchira, Postma M, Visser AJ, van Haastert PJ. *Embo J* 2003;22(19):5047-5057.
- [158] Bauer PH, Muller S, Puzicha M, Pippig S, Obermaier B, Helmreich EJ, Lohse MJ. *Nature* 1992;358(6381):73-76.
- [159] Lee RH, Ting TD, Lieberman BS, Tobias DE, Lolley RN, Ho YK. *J Biol Chem* 1992;267(35):25104-25112.

- [160] McLaughlin JN, Thulin CD, Hart SJ, Resing KA, Ahn NG, Willardson BM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(12):7962-7967.
- [161] Knol JC, Engel R, Blaauw M, Visser AJ, van Haastert PJ. *Mol Cell Biol* 2005;25(18):8393-8400.
- [162] Lukov GL, Hu T, McLaughlin JN, Hamm HE, Willardson BM. *Embo J* 2005;24(11):1965-1975.
- [163] Lukov GL, Baker CM, Ludtke PJ, Hu T, Carter MD, Hackett RA, Thulin CD, Willardson BM. *J Biol Chem* 2006;281(31):22261-22274.
- [164] Natochin M, Campbell TN, Barren B, Miller LC, Hameed S, Artemyev NO, Braun JE. *J Biol Chem* 2005;280(34):30236-30241.
- [165] Le-Niculescu H, Niesman I, Fischer T, DeVries L, Farquhar MG. *J Biol Chem* 2005;280(23):22012-22020.
- [166] Thibault C, Sganga MW, Miles MF. *J Biol Chem* 1997;272(19):12253-12256.
- [167] Takida S, Wedegaertner PB. *J Biol Chem* 2003;278(19):17284-17290.
- [168] Takida S, Wedegaertner PB. *FEBS Lett* 2004;567(2-3):209-213.
- [169] Betty M, Harnish SW, Rhodes KJ, Cockett MI. *Neuroscience* 1998;85(2):475-486.
- [170] Gautam N, Northup J, Tamir H, Simon MI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(20):7973-7977.
- [171] Peng YW, Robishaw JD, Levine MA, Yau KW. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(22):10882-10886.
- [172] Schmidt CJ, Thomas TC, Levine MA, Neer EJ. *J Biol Chem* 1992;267(20):13807-13810.
- [173] Kleuss C, Scherubl H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B. *Science* 1993;259(5096):832-834.
- [174] Wang Q, Jolly JP, Surmeier JD, Mullah BM, Lidow MS, Bergson CM, Robishaw JD. *J Biol Chem* 2001;276(42):39386-39393.
- [175] Schwindinger WF, Betz KS, Giger KE, Sabol A, Bronson SK, Robishaw JD. *J Biol Chem* 2003;278(8):6575-6579.
- [176] Blumer JB, Cismowski MJ, Sato M, Lanier SM. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(9):470-476.
- [177] Sato M, Blumer JB, Simon V, Lanier SM. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:151-187.

- [178] Sachdev P, Menon S, Kastner DB, Chuang JZ, Yeh TY, Conde C, Caceres A, Sung CH, Sakmar TP. *Embo J* 2007;26(11):2621-2632.
- [179] Cuello F, Schulze RA, Heemeyer F, Meyer HE, Lutz S, Jakobs KH, Niroomand F, Wieland T. *J Biol Chem* 2003;278(9):7220-7226.
- [180] Hippe HJ, Luedde M, Lutz S, Koehler H, Eschenhagen T, Frey N, Katus HA, Wieland T, Niroomand F. *Circ Res* 2007;100(8):1191-1199.
- [181] Zagar Y, Chaumaz G, Lieberherr M. *J Biol Chem* 2004;279(4):2403-2413.
- [182] Towers S, Princivalle A, Billinton A, Edmunds M, Bettler B, Urban L, Castro-Lopes J, Bowery NG. *Eur J Neurosci* 2000;12(9):3201-3210.
- [183] Fritschy JM, Sidler C, Parpan F, Gassmann M, Kaupmann K, Bettler B, Benke D. *J Comp Neurol* 2004;477(3):235-252.
- [184] Ritter B, Ochojski M, Kuhn T, Schwarzacher SW, Zhang W. *Cell Tissue Res* 2005;319(2):181-189.
- [185] Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. *Science* 2005;307(5715):1625-1630.
- [186] Jamora C, Yamanouye N, Van Lint J, Laudenslager J, Vandenheede JR, Faulkner DJ, Malhotra V. *Cell* 1999;98(1):59-68.
- [187] Diaz Anel AM, Malhotra V. *J Cell Biol* 2005;169(1):83-91.
- [188] Diaz Anel AM. *Biochem J* 2007;406(1):157-165.
- [189] Nurnberg B, Ahnert-Hilger G. *FEBS Lett* 1996;389(1):61-65.
- [190] Akgoz M, Kalyanaraman V, Gautam N. *Cell Signal* 2006;18(10):1758-1768.
- [191] Saini DK, Kalyanaraman V, Chisari M, Gautam N. *J Biol Chem* 2007;282(33):24099-24108.
- [192] Boivin B, Vaniotis G, Allen BG, Hebert TE. *J Recept Signal Transduct Res* 2008;28(1-2):15-28.
- [193] Zhang JH, Barr VA, Mo Y, Rojkova AM, Liu S, Simonds WF. *J Biol Chem* 2001;276(13):10284-10289.
- [194] Drenan RM, Doupnik CA, Boyle MP, Muglia LJ, Huettner JE, Linder ME, Blumer KJ. *J Cell Biol* 2005;169(4):623-633.
- [195] Smotryst JE, Linder ME. *Annu Rev Biochem* 2004;73:559-587.
- [196] Rojkova AM, Woodard GE, Huang TC, Combs CA, Zhang JH, Simonds WF. *J Biol Chem* 2003;278(14):12507-12512.

- [197] Park JG, Muise A, He GP, Kim SW, Ro HS. *Embo J* 1999;18(14):4004-4012.
- [198] Kino T, Kozasa T, Chrousos GP. *Eur J Clin Invest* 2005;35(8):508-513.
- [199] Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. *Science* 1988;240(4860):1759-1764.
- [200] Bannister AJ, Kouzarides T. *Embo J* 1995;14(19):4758-4762.
- [201] Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T. *Oncogene* 1995;11(12):2509-2514.
- [202] Greenberg ME, Ziff EB. *Nature* 1984;311(5985):433-438.
- [203] Zerial M, Toschi L, Ryseck RP, Schuermann M, Muller R, Bravo R. *Embo J* 1989;8(3):805-813.
- [204] Cohen DR, Curran T. *Mol Cell Biol* 1988;8(5):2063-2069.
- [205] Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato M, Iba H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(9):3619-3623.
- [206] Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JI. *Neuron* 1989;3(3):359-365.
- [207] Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE. *J Neurosci* 1993;13(12):5126-5138.
- [208] Imaki T, Shibasaki T, Hotta M, Demura H. *Brain Res* 1993;616(1-2):114-125.
- [209] Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. *Neuroscience* 1995;64(2):477-505.
- [210] Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. *Cell* 1992;71(4):577-586.
- [211] Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF. *Nature* 1992;360(6406):741-745.
- [212] Brown JR, Ye H, Bronson RT, Dikkes P, Greenberg ME. *Cell* 1996;86(2):297-309.
- [213] Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(9):2848-2852.
- [214] Ryder K, Lau LF, Nathans D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(5):1487-1491.
- [215] Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. *Embo J* 1999;18(2):420-432.
- [216] Passegue E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner EF. *Nat Genet* 2002;30(2):158-166.
- [217] Hirai SI, Ryseck RP, Mechta F, Bravo R, Yaniv M. *Embo J* 1989;8(5):1433-1439.
- [218] Franklin CC, McCulloch AV, Kraft AS. *Biochem J* 1995;305 ( Pt 3):967-974.

- [219] Ryder K, Lanahan A, Perez-Albuerne E, Nathans D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(5):1500-1503.
- [220] Deng T, Karin M. *Nature* 1994;371(6493):171-175.
- [221] Skinner M, Qu S, Moore C, Wisdom R. *Mol Cell Biol* 1997;17(5):2372-2380.
- [222] Gruda MC, Kovary K, Metz R, Bravo R. *Oncogene* 1994;9(9):2537-2547.
- [223] Hurd TW, Culbert AA, Webster KJ, Tavare JM. *Biochem J* 2002;368(Pt 2):573-580.
- [224] Rosenberger SF, Finch JS, Gupta A, Bowden GT. *J Biol Chem* 1999;274(2):1124-1130.
- [225] Hai T, Curran T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(9):3720-3724.
- [226] Smeal T, Angel P, Meek J, Karin M. *Genes Dev* 1989;3(12B):2091-2100.
- [227] Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. *Cell* 1988;55(5):917-924.
- [228] Ryseck RP, Bravo R. *Oncogene* 1991;6(4):533-542.
- [229] Morgan JI, Curran T. *Trends Neurosci* 1989;12(11):459-462.
- [230] Benbrook DM, Jones NC. *Oncogene* 1990;5(3):295-302.
- [231] van Dam H, Castellazzi M. *Oncogene* 2001;20(19):2453-2464.
- [232] Abedi MR, Caponigro G, Kamb A. *Nucleic Acids Res* 1998;26(2):623-630.
- [233] Topell S, Hennecke J, Glockshuber R. *FEBS Lett* 1999;457(2):283-289.
- [234] Hu CD, Kerppola TK. *Nat Biotechnol* 2003;21(5):539-545.
- [235] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. *Mol Cell* 2002;9(4):789-798.
- [236] MacDonald ML, Lamerdin J, Owens S, Keon BH, Bilter GK, Shang Z, Huang Z, Yu H, Dias J, Minami T, Michnick SW, Westwick JK. *Nat Chem Biol* 2006;2(6):329-337.
- [237] Hynes TR, Tang L, Mervine SM, Sabo JL, Yost EA, Devreotes PN, Berlot CH. *J Biol Chem* 2004;279(29):30279-30286.
- [238] Wu P, Brand L. *Anal Biochem* 1994;218(1):1-13.
- [239] Stefan E, Aquin S, Berger N, Landry CR, Nyfeler B, Bouvier M, Michnick SW. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(43):16916-16921.
- [240] Remy I, Michnick SW. *Nat Methods* 2006;3(12):977-979.

- [241] Rebois RV, Robitaille M, Petrin D, Zylbergold P, Trieu P, Hebert TE. *Methods* 2008;45(3):214-218.
- [242] Edwards SW, Tan CM, Limbird LE. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(8):304-308.
- [243] Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW. *Science* 2001;293(5527):98-101.
- [244] Nikolov EN, Ivanova-Nikolova TT. *J Biol Chem* 2004;279(22):23630-23636.
- [245] Frank M, Thumer L, Lohse MJ, Bunemann M. *J Biol Chem* 2005;280(26):24584-24590.
- [246] Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M. *J Biol Chem* 2002;277(47):44925-44931.
- [247] Boivin B, Lavoie C, Vaniotis G, Baragli A, Villeneuve LR, Ethier N, Trieu P, Allen BG, Hebert TE. *Cardiovasc Res* 2006;71(1):69-78.
- [248] Lee DK, Lanca AJ, Cheng R, Nguyen T, Ji XD, Gobeil F, Jr., Chemtob S, George SR, O'Dowd BF. *J Biol Chem* 2004;279(9):7901-7908.
- [249] Altan-Bonnet N, Sougrat R, Lippincott-Schwartz J. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(4):364-372.
- [250] Pfeiffer S. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 4):627-630.
- [251] Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S, Bouvier M. *J Biol Chem* 2004;279(32):33390-33397.
- [252] Herrick-Davis K, Weaver BA, Grinde E, Mazurkiewicz JE. *J Biol Chem* 2006;281(37):27109-27116.
- [253] Allen JA, Yu JZ, Donati RJ, Rasenick MM. *Mol Pharmacol* 2005;67(5):1493-1504.
- [254] Lei Q, Jones MB, Talley EM, Schrier AD, McIntire WE, Garrison JC, Bayliss DA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(17):9771-9776.
- [255] Krapivinsky G, Krapivinsky L, Wickman K, Clapham DE. *J Biol Chem* 1995;270(49):29059-29062.
- [256] Wickman KD, Iniguez-Lluhl JA, Davenport PA, Taussig R, Krapivinsky GB, Linder ME, Gilman AG, Clapham DE. *Nature* 1994;368(6468):255-257.
- [257] Yan K, Gautam N. *J Biol Chem* 1996;271(30):17597-17600.
- [258] Arnot MI, Stotz SC, Jarvis SE, Zamponi GW. *J Physiol* 2000;527 Pt 2:203-212.
- [259] Feng ZP, Arnot MI, Doering CJ, Zamponi GW. *J Biol Chem* 2001;276(48):45051-45058.

- [260] Dingus J, Wells CA, Campbell L, Cleator JH, Robinson K, Hildebrandt JD. *Biochemistry* 2005;44(35):11882-11890.
- [261] Poon LS, Chan AS, Wong YH. *Cell Signal* 2009;21(5):737-744.
- [262] Huang CL, Jan YN, Jan LY. *FEBS Lett* 1997;405(3):291-298.
- [263] He C, Zhang H, Mirshahi T, Logothetis DE. *J Biol Chem* 1999;274(18):12517-12524.
- [264] Wu G, Benovic JL, Hildebrandt JD, Lanier SM. *J Biol Chem* 1998;273(13):7197-7200.
- [265] Wu G, Bogatkevich GS, Mukhin YV, Benovic JL, Hildebrandt JD, Lanier SM. *J Biol Chem* 2000;275(12):9026-9034.
- [266] Mahon MJ, Bonacci TM, Divieti P, Smrcka AV. *Mol Endocrinol* 2006;20(1):136-146.
- [267] Sun Y, Yamauchi J, Kaziro Y, Itoh H. *J Biochem* 1999;125(3):515-521.
- [268] Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Wang XB, Hembree CM, Goodman NL, Uhl GR. *DNA Seq* 2002;13(1):39-45.
- [269] Maurice JP, Hata JA, Shah AS, White DC, McDonald PH, Dolber PC, Wilson KH, Lefkowitz RJ, Glower DD, Koch WJ. *J Clin Invest* 1999;104(1):21-29.
- [270] White DC, Hata JA, Shah AS, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(10):5428-5433.
- [271] Bookout AL, Finney AE, Guo R, Peppel K, Koch WJ, Daaka Y. *J Biol Chem* 2003;278(39):37569-37573.
- [272] Mirshahi T, Mittal V, Zhang H, Linder ME, Logothetis DE. *J Biol Chem* 2002;277(39):36345-36350.
- [273] Bonacci TM, Mathews JL, Yuan C, Lehmann DM, Malik S, Wu D, Font JL, Bidlack JM, Smrcka AV. *Science* 2006;312(5772):443-446.





## Annexe

### Liste des publications

- 1) Rebois, V.R\*., Gales, C\*., **Robitaille, M\*.**, Dupré, D., Baragli, A., Trieu, P., Ethier, N., Bouvier, M., and Hébert, T.E. (2006) Heterotrimeric G proteins and their effectors form stable complexes in vivo. *Journal of Cell Science* 119:2807-2818.

\* Co-auteurs de l'article

- 2) Dupré, D.J., **Robitaille, M.**, Ethier, N., Villeneuve, L.-R., Mamarbachi, A.M. and Hébert, T.E. (2006) Seven Transmembrane Receptor Core Signalling Complexes are Assembled Prior to Plasma Membrane Trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 281:34561-34573.
- 3) Dupré, D.J., **Robitaille, M.**, Éthier, N., Mamarbachi, A.M. and Hébert, T.E. (2007) Dopamine receptor interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for G $\gamma$  subunits prior to assembly with G $\beta$ . *J. Biol. Chem* 282:13703-13715.
- 4) Rebois, R.V., **Robitaille, M.**, Pétrin, D., Zylbergold, P., Trieu, P. and Hébert, T.E. (2008) Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. *Methods* 45: 214-218.
- 5) Dupré, D.J\*., **Robitaille, M\*.**, Rebois, R.V. and Hébert, T.E. (2008) The role of G $\beta\gamma$  subunits in the organization, assembly and function of GPCR signalling complexes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49:31-56

\* Co-auteurs de l'article

- 6) **Robitaille, M.**, Ramakrishnan, N., Baragli, A. and Hébert T.E. (2009) Intracellular trafficking and assembly of specific Kir3 channel/G protein complexes. *Cell Signal.* 21: 488-501.
- 7) Zhang, X., Wang, G., Dupré, D.J., Feng, Y., **Robitaille, M.**, Lazartigues, E., Feng, YH., Hébert, T.E., Wu, G. (2009) Rab1 GTPase and dimerisation in the cell surface expression of angiotensin II type 2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 330: 109-117.

- 8) Duvernay, M.T., Dong, C., Zhang, X., **Robitaille, M.**, Hébert, T.E., Wu, G. (2009) A single conserved leucine residue on the first intracellular loop regulates ER export of G-Protein-Coupled Receptors. *Traffic*, *In press*.
- 9) **Robitaille, M.**, Dupré, D.J. and Hébert, T.E. (2009) L'implication des chaperonnes moléculaires dans l'assemblage et le fonctionnement des protéines G hétérotrimériques. *Médecine/Science*. 25 :821-825.
- 10) **Robitaille, M.\***, Héroux, I.\*, Baragli, A. and Hébert, T.E. (2009) Novel tools for use in Bioluminescence Resonance Energy Transfer assays. *Methods Mol. Biol.* 2009, 574 :215-34  
\*Co-auteurs de l'article
- 11) **Robitaille, M.**, Wang, Y., Goupil, E., Laporte, S.A., Bernard, D.J. and Hébert, T.E. (2009) G $\beta\gamma$  as a negative regulator of AP-1 mediated transcription. Soumis à *Embo Journal*,