

Université de Montréal

**Identification de nouveaux partenaires protéiques des récepteurs couplés
aux protéines G contrôlant leur transport du reticulum endoplasmique à
la membrane plasmique**

par

Etienne Sauvageau

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Ph.D.

En Biochimie

Juillet 2011

© Etienne Sauvageau, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

**Identification de nouveaux partenaires protéiques des récepteurs couplés
aux protéines G contrôlant leur transport du reticulum endoplasmique à
la membrane plasmique**

Présenté par :

Etienne Sauvageau

a été évaluée par un jury composé de

Luis Rokeach, président-rapporteur

Michel Bouvier, directeur de thèse

Louis Gendron, examinateur externe

Gregory Emery, membre du jury

Guy Lemay, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) forment la plus grande et la plus diversifiée des familles de protéines localisées à la surface cellulaire et responsables de la transmission de signaux à l'intérieur des cellules. D'intenses recherches effectuées au cours des trente dernières années ont mené à l'identification de dizaines de protéines interagissant avec les RCPGs et contrôlant la signalisation, la désensibilisation, l'internalisation et la dégradation de ces importantes cibles pharmacologiques. Contrairement aux processus régulant l'activité des récepteurs à partir de la membrane plasmique, les mécanismes moléculaires contrôlant la biosynthèse des RCPGs dans le reticulum endoplasmique (RE) et leur transport jusqu'à la surface cellulaire sont très peu caractérisés. Une meilleure compréhension de ces processus nécessite l'identification de la machinerie protéique responsable de la maturation des RCPGs.

Un crible protéomique basé sur le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET), qui permet la mesure d'interactions protéiques dans les cellules vivantes, a mené à l'identification de plusieurs nouvelles protéines localisées dans la voie de sécrétion et interagissant potentiellement avec les RCPGs. Ces protéines étant localisées dans les compartiments cellulaires (reticulum endoplasmique et appareil de Golgi) responsables de la synthèse, du repliement adéquat et du transport à la membrane plasmique des récepteurs, il est très probable qu'elles soient impliquées dans le contrôle de l'expression des RCPGs à la surface cellulaire.

La caractérisation de l'homologue humain de cornichon 4 (CNIH4), un nouvel interacteur des RCPGs identifié dans le crible, a démontré que cette protéine localisée dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion (RE et ERGIC) interagit de façon sélective avec les RCPGs. De plus, la suppression de l'expression endogène de cette protéine préalablement non-caractérisée, diminue le transport à la membrane plasmique d'un récepteur, indiquant que CNIH4 influence positivement l'export des RCPGs du RE. Ceci est supporté par l'observation que la surexpression de CNIH4 à de faibles niveaux favorise la maturation d'un récepteur mutant normalement retenu dans le RE. Nous avons également pu démontrer que CNIH4 est associée à la protéine Sec23, une des composantes de l'enveloppe des vésicules COPII qui sont responsables du transport des protéines du RE

vers le Golgi, suggérant que CNIH4 pourrait favoriser le recrutement des récepteurs dans ces vésicules.

La surexpression de CNIH4 à de très hauts niveaux provoque également la rétention intracellulaire des récepteurs. Cet effet dominant négatif pourrait être causé par la titration d'un autre facteur d'export des RCPGs. Une deuxième étude a permis de révéler que la protéine transmembranaire 9 (TMEM9), un nouvel interacteur des RCPGs également identifié dans le crible, interagit sélectivement avec les récepteurs et avec CNIH4. La surexpression de cette protéine aux fonctions précédemment inconnues, rétablit le transport normal d'un récepteur en présence de CNIH4 surexprimée. De plus, la co-expression de TMEM9 potentialise la capacité de CNIH4 à augmenter la maturation d'un récepteur mutant normalement retenu dans le RE, suggérant que ces deux protéines forment un complexe régulant la maturation des RCPGs.

Au cours de cette thèse, de nouvelles protéines interagissant avec les RCPGs et contrôlant leur expression à la membrane plasmique ont donc été identifiées, permettant une meilleure compréhension des mécanismes régulant le transport des récepteurs du RE à la surface cellulaire.

Mots-clés : Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET), crible protéomique, homologue humain de cornichon 4 (CNIH4), protéine transmembranaire 9 (TMEM9), reticulum endoplasmique, voie de sécrétion, export du RE, vésicules COPII, contrôle de qualité du RE, récepteur de chimiokine CCR5, maladies conformationnelles.

Abstract

G protein coupled receptors (GPCR) form the largest and most diversified family of cell-surface receptors responsible for signal transduction inside the cells. Extensive research over the last thirty years have led to the identification of multiple proteins interacting with GPCRs and controlling the signalisation, desensitization, internalization and degradation of these important pharmaceutical targets. In contrast to the processes regulating GPCR activity at the plasma membrane, the molecular mechanisms controlling GPCR biogenesis in the endoplasmic reticulum (ER) and their transport to the cell-surface are poorly characterized. The identification of the proteins regulating GPCR maturation is essential in order to understand how receptors are expressed at the plasma membrane.

A proteomic screen based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET), which allows for the detection of protein-protein interaction in living cells, led to the identification of several potential novel GPCR interactors localized in the secretory pathway. Since the cellular compartments where these proteins are localized are responsible for the synthesis, proper folding and transport to the plasma membrane of the receptors, it is highly probable that they are involve in regulating GPCR cell-surface expression.

The characterization of the human cornichon homolog 4 (CNIH4), a novel GPCR interactor identified in the screen, showed that this protein localized in the early secretory pathway (ER and ERGIC), selectively interacts with GPCRs. Knockdown of the endogenous expression of this previously uncharacterized protein led to a decrease in the cell-surface expression of a receptor indicating that CNIH4 has a positive function in the ER export of GPCR. Supporting this, over-expression of CNIH4 at low levels increased the maturation of a mutant receptor normally retained in the ER. Moreover, CNIH4 interacts with Sec23, a component of the inner coat of COPII vesicles which transport proteins from the ER to the Golgi apparatus, suggesting that CNIH4 could recruit GPCRs in these vesicles.

CNIH4 over-expression at very high levels also resulted in the intracellular trapping of the receptors. This dominant negative effet could be caused by the titration of another component of the GPCR export process. Another study showed that the transmembrane

protein 9 (TMEM9), a novel GPCR interactor also identified in the screen, selectively interacts with GPCRs and CNIH4. Over-expression of this protein of previously unknown function restored normal receptor trafficking in presence of over-expressed CNIH4. Moreover, co-expression of TMEM9 potentialized CNIH4 ability to increase the maturation of a mutant receptor normally retained in the ER, suggesting that these proteins form a complex regulating GPCR maturation.

During this thesis, novel GPCR interacting proteins controlling receptor expression at the plasma membrane were identified, allowing for a better understanding of the mechanisms controlling receptor trafficking from the ER to the cell-surface.

Keywords: G protein coupled receptor (GPCR), bioluminescence resonance energy transfer (BRET), proteomic screen, human cornichon homolog 4 (CNIH4), transmembrane protein 9 (TMEM9), endoplasmic reticulum, secretory pathway, ER export, COPII vesicles, ER quality control, chemokine receptor CCR5, conformational diseases.

Table des matières

| | |
|--|------------|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | iii |
| Table des matières..... | v |
| Liste des tableaux..... | ix |
| Liste des figures..... | x |
| Abréviations..... | xi |
| Remerciements..... | xiv |
| Introduction..... | 1 |
| 1. Les récepteurs couplés aux protéines G..... | 2 |
| 1.1 Description générale des RCPGs..... | 2 |
| 1.2 Différentes classes de RCPGs..... | 5 |
| 1.3 Structure et activation des RCPGs..... | 6 |
| 1.4 Protéines G hétérotrimériques..... | 10 |
| 1.5 Désensibilisation des signaux induits par les RCPGs..... | 12 |
| 1.6 Modifications post-traductionnelles des RCPGs..... | 15 |
| 1.6.1 Phosphorylation..... | 15 |
| 1.6.2 Palmitoylation..... | 15 |
| 1.6.3 Ubiquitination..... | 16 |
| 1.6.4 N-glycosylation..... | 17 |
| 1.7 Maladies associées aux RCPGs..... | 17 |
| 2. Mécanismes généraux de biogénèse et de transport de protéines transmembranaires à la membrane plasmique..... | 21 |
| 2.1 Synthèse des protéines transmembranaires..... | 21 |
| 2.1.1 Ciblage des protéines transmembranaires vers la membrane du RE.. | 21 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.1.2 | Intégration des protéines transmembranaires dans la membrane du RE | 25 |
| 2.2 | Repliement protéique dans le reticulum endoplasmique..... | 30 |
| 2.2.1 | Repliement protéique in vitro..... | 30 |
| 2.2.2 | Chaperones moléculaires..... | 31 |
| 2.2.3 | Chaperones Hsp du reticulum endoplasmique..... | 32 |
| 2.2.4 | Chaperones lectines..... | 35 |
| 2.2.5 | Formation de ponts disulfures..... | 38 |
| 2.2.6 | Isomérisation peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> | 39 |
| 2.3 | Dégradation protéique associée au reticulum endoplasmique (ERAD).... | 40 |
| 2.4 | Système de réponse à l'accumulation de protéines mal repliées (UPR)... | 43 |
| 2.5 | Transport RE-Golgi..... | 44 |
| 2.5.1 | Structure et formation des vésicules COPII..... | 44 |
| 2.5.2 | Mécanismes de reconnaissances des cargos..... | 46 |
| 2.5.3 | Compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC)..... | 47 |
| 2.6 | Appareil de Golgi..... | 49 |
| 3. | Chaperones et protéines d'export spécifiques des RCPGs..... | 52 |
| 3.1 | Chaperones et facteurs d'export connus des RCPGs..... | 52 |
| 3.2 | Famille de protéines cornichons..... | 57 |
| 3.2.1 | Cornichons chez la drosophile..... | 57 |
| 3.2.2 | Cornichons chez la levure..... | 58 |
| 3.2.3 | Cornichons chez les mammifères..... | 60 |
| 3.3 | Protéine transmembranaire 9..... | 61 |
| 3.4 | Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence..... | 62 |
| | Objectifs de la thèse..... | 65 |
| | Résultats..... | 67 |

| | |
|---|----------------|
| Article 1..... | 67 |
| CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and control their export from the endoplasmic reticulum..... | 67 |
| Figure 1..... | 97 |
| Figure 2..... | 98 |
| Figure 3..... | 99 |
| Figure 4..... | 100 |
| Figure 5..... | 101 |
| Figure 6..... | 102 |
| Figure 7..... | 103 |
| Figure 8..... | 104 |
| Figure supplémentaire..... | 105 |
| Article 2..... | 106 |
| TMEM9 and CNIH4 form a complex regulating GPCRs export from the endoplasmic reticulum..... | 106 |
| Figure 1..... | 130 |
| Figure 2..... | 131 |
| Figure 3..... | 132 |
| Figure 4..... | 133 |
| Figure 5..... | 134 |
| Figure 6..... | 135 |
| Figure 7..... | 136 |
| Figure 8..... | 137 |
| Discussion..... | 138 |
| BRET comme méthode de criblage d'interactions protéines-protéines..... | 139 |
| Choix des partenaires BRET pour le crible..... | 141 |
| Analyse du crible..... | 142 |

| | |
|---|------------|
| Sélection de CNIH4 comme première protéine à caractériser..... | 145 |
| Interaction entre CNIH4 et différents RCPGs ou autres protéines..... | 146 |
| Localisation de l'interaction RCPG-CNIH4..... | 149 |
| Analyse de la fonction de CNIH4 dans le transport des RCPGs..... | 151 |
| Interaction entre CNIH4 et les vésicules COPII..... | 156 |
| Identification de TMEM9 comme nouvel interacteur des RCPGs et de CNIH4... | 160 |
| Interaction TMEM9-CNIH4 et TMEM9-RCPGs..... | 162 |
| Analyse de la fonction possible de TMEM9 dans le transport des RCPGs..... | 163 |
| Mécanismes d'actions concertés de CNIH4 et TMEM9..... | 169 |
| Perspectives..... | 172 |
| Approches thérapeutiques..... | 173 |
| Conclusion..... | 175 |
| Bibliographie de l'introduction et la discussion..... | 177 |
| Annexe..... | 204 |
| Article 3 | |
| Role of N-glycosylation on the maturation and trafficking of V2 vasopressin receptor mutants | |
| Article 4 | |
| Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer | |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Maladies causées par des mutations présentes chez différents RCPGs provoquant un gain de fonctions ou une perte de fonction de ces récepteurs. | 2 |
| Tableau II : Récepteurs pour lesquels des mutations provoquent leur rétention intracellulaire et causent des maladies humaines. | 18 |
| Tableau III : Facteurs de repliements localisés dans le reticulum endoplasmique des cellules de mammifères | 34 |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Représentation générale du mécanisme de signalisation par les RCPGs | 4 |
| Figure 2. Structure tridimensionnelle du récepteur β 2AR. | 7 |
| Figure 3. Désensibilisation et endocytose des récepteurs. | 13 |
| Figure 4. Représentation schématique du cycle de recrutement des complexes RNC à la membrane du RE et leur transfert au translocon | 23 |
| Figure 5. Représentation schématique du complexe de translocation | 26 |
| Figure 6. Représentation schématique de deux modèles différents d'intégration de protéines polytopiques | 29 |
| Figure 7. Représentation schématique du transfert du complexe glucidique initial | 36 |
| Figure 8. Représentation schématique des différents types de vésicules de transport | 45 |
| Figure 9. Représentation schématique du BRET | 63 |
| Figure 10. Localisation des fluorophores pour le BRET entre CCR5 et les deux formes d'épissages de CNIH4. | 144 |
| Figure 11. Courbe de compétition du BRET entre le V2R et CNIH4 | 147 |
| Figure 12. Courbes de titration de l'homodimère β 2AR en présence de CNIH4 | 153 |
| Figure 13. Courbes de titration de BRET de l'interaction V2R-Calnexin en présence de CNIH4 | 154 |
| Figure 14. Mécanisme possible expliquant la rétention des RCPGs par la surexpression de CNIH4. | 155 |
| Figure 15. Séquence nécessaire pour l'interaction d'Erv14p avec COPII et séquence correspondant chez CNIH4. | 156 |
| Figure 16. Interaction de différentes formes d'épissages de CNIH4 avec Sec23 | 157 |
| Figure 17. Rôle de CNIH4 comme récepteur-cargo pour le recrutement des RCPGs dans les vésicules COPII | 158 |
| Figure 18. Expression endogène de l'ARNm de TMEM9 dans les cellules HEK 293. | 165 |
| Figure 19. Représentation schématique de l'essai de complémentation protéique | 168 |
| Figure 20. Combinaison BRET-PCA pour la détection de l'interaction entre trois partenaires | 169 |
| Figure 21. Courbes de titration de BRET entre TMEM9 et β 2AR ou β 2AR-A7 | 171 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------|---|
| aa : | Acide aminé |
| ACII : | Adénylate cyclase de type II |
| AG : | Appareil de golgi |
| AMPc : | Adenosine mono-phosphate cyclique |
| AQP1 : | Aquaporine de type 1 |
| AQP4 : | Aquaporine de type 4 |
| ATP : | Adenosine triphosphate |
| ARNm : | Acide ribonucléique messenger |
| ATP : | Adenosine tri-phosphate |
| β 2AR : | Récepteur β 2-adrénergique |
| BRET : | Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence |
| CCR5 : | Récepteur de chémokine de type 5 |
| CRLR : | Récepteur semblable au récepteur de la calcitonine |
| CFP : | Protéine fluorescente cyan |
| <i>Cni</i> : | Protéine cornichon de la drosophile |
| <i>Cnir</i> : | homologue de <i>Cni</i> chez la drosophile |
| CNIH1 : | Homoloque humain de cornichon 1 |
| CNIH2 : | Homoloque humain de cornichon 2 |
| CNIH3 : | Homoloque humain de cornichon 3 |
| CNIH4 : | Homoloque humain de cornichon 4 |
| coIP : | co-immunoprécipitation |
| DAG : | Diacylglycérol |
| EGF : | Facteur de croissance épidermique |
| EGFR : | Récepteur du facteur de croissance épidermique |
| ERAD : | Voie de dégradation associée au RE |
| ERES : | Sites de sortie du RE |

| | |
|------------------------|--|
| ERGIC : | Compartiment intermédiaire RE-golgi |
| Erv14p : | Homologue de cornichon chez la levure |
| FRET : | Transfert d'énergie de résonance de fluorescence |
| GABA _B R1 : | Récepteur métabotropique de GABA de type 1 |
| GABA _B R2 : | Récepteur métabotropique de GABA de type 2 |
| GDP : | Guanosine di-phosphate |
| GEF : | Facteur d'échange de nucléotide guanylé |
| GFP : | Protéine fluorescente verte |
| GnRH : | Récepteur du relâchement de la gonadotropine |
| <i>grk</i> : | <i>gurken</i> |
| GRK : | Kinases des RCPGs |
| GTP : | Guanosine tri-phosphate |
| HSP : | Protéines de choc thermique |
| NDI : | Diabète insipide néphrogénique |
| ORF : | Open-reading frames ou phases ouvertes de lecture |
| OST : | Complexe oligosaccharyltransférase |
| PAFR : | Récepteur du facteur d'activation des plaquettes |
| PCA : | Essai de complémentation de protéines |
| PDI : | Protéine disulfide isomérase |
| PKA : | Protéine kinase A |
| PKC : | Protéine kinase C |
| PLC : | Phospholipase C |
| R7TM : | Récepteur à sept domaines transmembranaires |
| RAMP : | Protéines de modification de l'activité des récepteurs |
| RCPG : | Récepteurs couplés aux protéines G |
| RE : | Reticulum endoplasmique |
| RGS : | Régulateur de la signalisation par les protéines G |
| Rluc : | Luciférase de <i>renilla</i> |

| | |
|---------|--|
| RNC : | Complexe ribosome-chaîne protéique en croissance |
| SR : | Récepteur de la particule de reconnaissance du signal |
| SRP : | Particule de reconnaissance du signal |
| TGN: | Réseau trans-golgi |
| TM : | Domaine transmembranaire |
| TMEM9 : | Protéine transmembranaire 9 |
| TRAM : | Protéine membranaire associée au translocon |
| TRAP : | Complexe protéique associé à la translocation |
| UPR : | Système de réponse de l'accumulation de protéines mal repliées |
| V2R : | Récepteur 2 de la vasopressin |
| VIH : | virus de l'immunodéficience humaine |
| VSVG : | Vesicular stomatitis virus G protein |

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de thèse, Michel Bouvier. Les étudiants de ton laboratoire ont tous le même souvenir de leur première rencontre avec toi, c'est-à-dire la passion incroyablement contagieuse qui t'anime quand tu discutes de science. Merci pour ce bel équilibre entre enthousiasme pour les résultats qui te sont présentés et critiques constructives. Merci aussi pour ta patience et surtout pour la liberté d'expression, un bien si précieux en recherche, que tu laisses à tes étudiants.

J'aimerais aussi remercier les piliers du laboratoire. Monique, bien sur, sans qui le labo ne pourrait fonctionner. Hélène, Mireille et André pour avoir toujours répondu à mes questions et requêtes. Votre aide fut précieuse.

Merci également aux nombreuses personnes que j'ai cotoyées au cours de ces années et qui ont contribué à l'esprit de collaboration et de camaraderie fantastique qui règne au sein du laboratoire de Michel.

Je voudrais aussi remercier mes parents, Odile et Jean-Paul, pour beaucoup trop de choses qu'il n'est possible de nommer ici. Vous êtes les meilleurs modèles qu'un futur père puisse avoir. À ma grande sœur, Julie, à mon grand frère, Alain, et aux autres membres de notre belle famille.

Enfin, un gros merci à toi ma compagne, mon amour, Marieke. D'abord, pour ce savant mélange de coups de pied au derrière et de tapes sur l'épaule qui m'ont soutenu pendant l'écriture de ma thèse, mais surtout pour donner encore plus de saveurs à la vie et faire de moi une meilleure personne. Et bien sur à toi, petit enfant qui arrive très bientôt. Bien que tu sois encore dans le ventre de ta mère, l'amour que j'éprouve déjà pour toi m'a aidé constamment pendant la réalisation de cette œuvre.

Introduction

Toutes les cellules, qu'elles soient individuelles ou qu'elles fassent parties d'un organisme multicellulaire, doivent être en mesure de ressentir les changements dans leur environnement et de fournir une réponse appropriée. Par exemple, durant le développement, les cellules de l'embryon échangent des signaux afin de déterminer quel rôle et quelle position chaque cellule va adopter, quelle cellule va vivre, mourir ou se diviser. Cette communication cellulaire se poursuit tout au long de l'existence d'un organisme. Les cellules communiquent entre elles en produisant des molécules qui sont reconnues par des protéines récepteurs dans les cellules cibles. Ces récepteurs reconnaissent et répondent de façon spécifique aux molécules de signalisation afin de transmettre l'information contenue dans ces molécules en réponses cellulaires telles que la croissance, la différenciation, la contraction ou la migration. Ces molécules peuvent être des protéines, des peptides, des acides aminés, des nucléotides, des stéroïdes, des acides gras et bien d'autres. Elles peuvent être divisées en deux classes générales. Il y a d'abord les molécules hydrophobes, comme les hormones stéroïdiennes, qui peuvent traverser la membrane plasmique et lier des récepteurs situés à l'intérieur de la cellule. La majorité des molécules de signalisations sont cependant trop grandes et trop hydrophiles pour passer à travers une membrane lipidique et doivent donc se lier à des récepteurs transmembranaires situés dans la membrane plasmique des cellules cibles. Il existe quatre principales classes de récepteurs membranaires. Les canaux ioniques, les récepteurs activant la voie JAK/STAT, les récepteurs enzymes tels que les récepteurs à activité tyrosine kinase et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Cette thèse porte sur les mécanismes permettant l'expression de cette dernière classe de récepteurs à la membrane plasmique, le lieu de leurs fonctions physiologiques. Les principales caractéristiques structurales et fonctionnelles de cette importante famille de protéines seront d'abord décrites. Ensuite, les processus généraux de synthèse des protéines transmembranaires dans le reticulum endoplasmique et leur transport jusqu'à la surface seront détaillés, ainsi que les évidences liant ces mécanismes aux RCPGs. Enfin, les protéines participant de façon spécifique à l'acheminement des RCPGs à la membrane plasmique seront présentées

1. Les récepteurs couplés aux protéines G

1.1 Description générale des RCPGs

Les RCPGs, ou récepteurs à sept domaines transmembranaires (R7TM), constituent la plus grande et la plus diversifiée des superfamilles de récepteurs localisés à la surface des cellules de mammifères [1]. Approximativement 800 gènes codent pour des RCPGs fonctionnels, représentant plus de 1 % du génome humain [2]. Si on tient compte de l'épissage alternatif, il est estimé que de 1000 à 2000 récepteurs distincts pourraient être exprimés dans les cellules humaines. Cette remarquable diversité évolutive a permis de générer différents RCPGs capables de détecter une incroyable variété de signaux extracellulaires incluant les photons, des molécules odorantes, des molécules du goût, des ions, des nucléotides, des amines, des peptides et autres. Une vaste quantité de phénomènes physiologiques sont donc contrôlés par les RCPGs, incluant la neurotransmission, l'homéostasie, la circulation sanguine, le métabolisme intermédiaire, la croissance, la différenciation et la prolifération de plusieurs types cellulaires. Étant donné la diversité des fonctions contrôlées par les RCPGs, il n'est pas surprenant de constater que des centaines de mutations provoquant l'inactivation ou l'activation constitutive des RCPGs ont déjà été identifiées comme étant responsable de plus de 30 maladies humaines (Tableau I) [3]. En 2008, il était estimé qu'environ 30 % des drogues prescrites ciblent des RCPGs, un chiffre encore plus impressionnant si on tient compte que seulement un faible pourcentage du répertoire total des RCPGs est ciblé par ces médicaments [4]. Les RCPGs sont donc l'objet d'intenses recherches afin d'élucider les mécanismes de régulation de cette importante classe de cibles pharmacologiques.

Tableau I : Maladies causées par des mutations présentes chez différents RCPGs provoquant un gain de fonctions ou une perte de fonction de ces récepteurs.

| Récepteur | Maladies provoquées par un gain de fonction | Référence |
|-----------|--|-----------|
| Rhodopsin | <i>Congenital stationary night blindness</i> | [5] |
| TSHR | Hyperthyroïdie, Carcinome de la thyroïde | [6] |
| CASR | Hypoparathyroïdie dominante ou sporadique | [7] |

| | | |
|------------------|--|------|
| PTHR1 | <i>Jansens's metaphyseal chondrodysplasia</i> | [8] |
| LHR | Puberté précoce mâle, Tumeur des cellules de Leydig | [9] |
| KSHV-GPCR | Sarcome de Kaposi | [10] |
| SMOH | <i>Sporadic basal-cell carcinoma</i> | [11] |
| MC2R | Syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH | [12] |
| FSHR | Syndrome d'hyperstimulation ovarienne | [13] |
| Récepteur | Maladies provoquées par une perte de fonction | |
| OA1 | Albinisme oculaire | [14] |
| P2RY12 | <i>Bleeding disorder</i> | [15] |
| TBAX2R | <i>Bleeding disorder</i> | [16] |
| PTHR | Chondrodysplasie de type Bromstrand | [17] |
| LGR8 | Cryptorchidie | [18] |
| V2R | Diabète néphrogénique insipide | [19] |
| FSHR | Dysplasie ovarienne, <i>amenorrhea</i> | [20] |
| CASR | Hyperparathyroïdie | [21] |
| GNRHR | Hypogonadisme hypogonadotrope | [22] |
| GPR54 | Hypogonadisme hypogonadotrope | [23] |
| TRHR | Hypothyroïdie centrale isolée | [24] |
| TSHR | Hypothyroïdie, Hypoplasie thyroïdienne | [25] |
| ETBR | Maladie d'Hirschsprung | [26] |
| GHRHR | Nanisme | [27] |
| MC4R | Obésité précoce morbide | [28] |
| FPR | Parodontite juvénile | [29] |
| GPR56 | Polymicrogyrie bilatérale fronto-pariétale | [30] |
| LHR | Pseudohermaphrodisme | [31] |
| AT2R | Retard mental lié au chromosome x | [32] |
| Rhodopsin | Rétinite pigmentaire | [33] |
| MC1R | Sensibilité de la peau aux rayons UV | [34] |
| MC2R | Syndrome de résistance à l'ACTH | [35] |
| MASS1 | Syndrome d'Usher | [36] |
| FZD4 | Vitréorétinopathie exsudative | [37] |

Le clonage du récepteur des catécholamines β 2-adrénérique suivi de plusieurs autres récepteurs dans les années 80, a révélé que malgré la diversité des ligands reconnus par les RCPGs, ceux-ci sont constitués d'une organisation générale similaire [38, 39]. Ils possèdent tous un domaine N-terminal extracellulaire suivi de sept domaines transmembranaires (TM) reliés entre eux par 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires, et se terminent par une queue C-terminale cytoplasmique (Figure 1). Une autre caractéristique commune des RCPGs est de servir de facteur d'échange de nucléotide guanylé (GEF) pour les protéines G hétérotrimériques. La liaison d'un ligand à un récepteur permet donc l'activation des protéines G hétérotrimériques qui vont à leur tour contrôler l'activité de différents effecteurs (adénylate cyclase, canaux ioniques, phospholipase C...) et ainsi influencer la production de seconds messagers dans la cellule (Figure 1). On a longtemps pensé que l'activation des différentes protéines G par les récepteurs était responsable de tous les processus biologiques contrôlés par les RCPGs, mais de nombreux travaux récents démontrent que les récepteurs interagissent avec plusieurs autres protéines qui induisent des signaux intracellulaires en coopération ou de façon indépendante des protéines G.

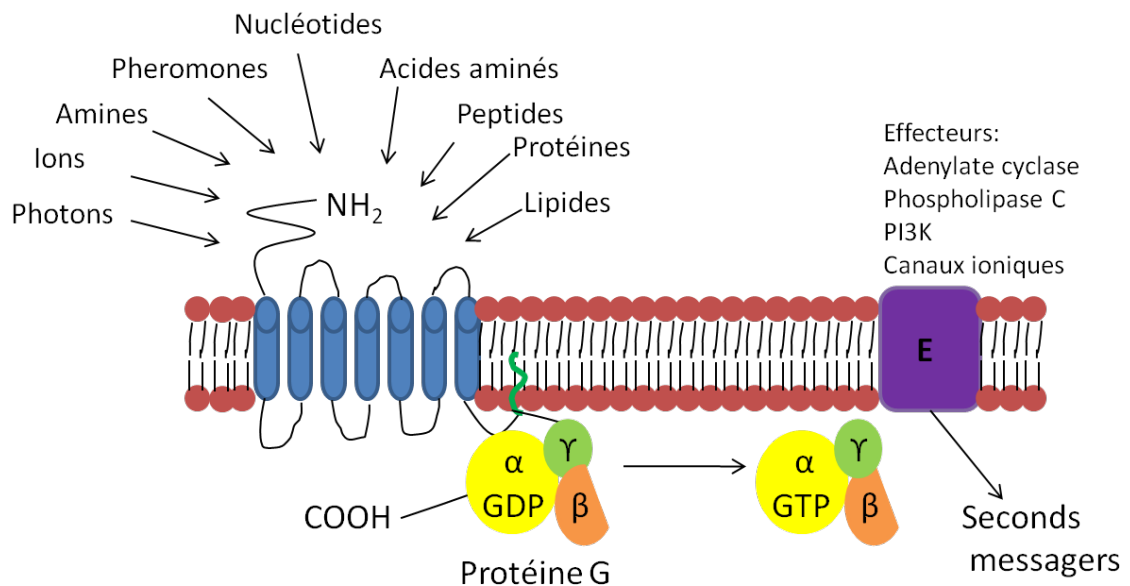


Figure 1. Représentation générale du mécanisme de signalisation par les RCPGs. Modifié de [1]

1.2 Différentes classes de RCPGs

Bien que leur organisation structurale soit similaire, les RCPGs peuvent être classés en différentes familles selon leurs propriétés structurales, leur homologie de séquence et la nature des ligands qui leur sont associés.

La famille A (1), ou famille de récepteurs similaires à la rhodopsine, regroupe la majorité (environ 90 %) des RCPGs. Les récepteurs de cette famille sont caractérisés par la présence d'un motif E/DRY dans l'interface entre la 2^e boucle intracellulaire et le TM3 qui interagit avec un résidu glutamate du TM6 et forme un verrou ionique qui maintient le récepteur dans un état inactif [40]. On retrouve également la séquence conservée NPXXY située à la fin du TM7 et qui participe à plusieurs changements conformationnels importants associés à l'activation des récepteurs [41]. Ils sont également caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs ponts disulfure dans les boucles extracellulaires qui contribuent probablement à stabiliser la structure des récepteurs [41], ainsi que d'un ou plusieurs sites de palmylation situés dans la queue C-Terminale qui influencent l'activité et le transport des RCPGs. Les récepteurs de la famille A sont également divisés en sous-groupes selon leur propriétés de liaison au ligand. Le sous-groupe 1a comprend les récepteurs de petites molécules telles que les catécholamines qui se lient au récepteur dans une poche de liaison située à l'intérieur des domaines transmembranaires. Le sous-groupe 1b est formé de récepteurs de petits peptides qui lient les boucles extracellulaires et la région N-terminale des récepteurs. Les récepteurs du groupe 1c possèdent un large domaine extracellulaire qui reconnaît les hormones glycoprotéiques.

La famille B (2) est formée des récepteurs de type secretine qui comprend environ 15 membres. Ils possèdent un large domaine extracellulaire, contenant plusieurs ponts disulfure conservés, qui est impliqué dans la liaison de grands peptides qui partagent une homologie de séquence très élevée et qui agissent généralement de manière paracrine [42]. On retrouve entre autres dans cette famille le récepteur semblable au récepteur de la calcitonin (CRLR), le récepteur de l'hormone parathyroïde et le récepteur du glucagon.

Les récepteurs de la famille C (3), dont on dénombre une vingtaine de membres, sont caractérisés par leur large domaine N-terminal, appelé « Venus Fly Trap », car il est formé de deux lobes distincts séparés par une cavité dans laquelle vient se lier le ligand

provoquant ainsi la fermeture des lobes autour du ligand. Cette famille comprend les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) et du GABA (GABA_BR), les deux principaux neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs du système nerveux central, ainsi qu'un récepteur sensible au calcium (CaSR) et certains récepteurs du goût.

Les récepteurs d'adhésion forment une nouvelle famille très particulière de récepteurs caractérisés par un domaine N-terminal de longueur variable (200 à 2800 acides aminés) qui contiennent des motifs riches en cystéine, des motifs similaires à EGF et des motifs riches en glycosylation et résidus proline (similaire à mucine) qui participent probablement à l'adhésion cellulaire.

La dernière famille comprend les récepteurs de type frizzled, le récepteur smoothed et certains récepteurs du goût. Les récepteurs frizzled sont caractérisés par un domaine de liaison riche en cystéine impliqué dans la liaison des protéines sécrétées Wnt [43].

1.3 Structure et activation des RCPGs

Jusqu'à très récemment, diverses méthodes biochimiques et biophysiques ont été employées pour prédire l'organisation tridimensionnelle des domaines transmembranaires ainsi que l'importance de certains résidus dans la liaison de ligands, le maintien de la structure du récepteur et l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques. Après la résolution du cristal de la rhodopsine lors de l'année 2000 [44], sept années se sont écoulées avant l'apparition d'un nouveau cristal pour le récepteur β 2AR [45]. La difficulté de cristalliser les RCPGs s'expliquent par leur abondance naturelle faible, la grande flexibilité de leur structure et leur instabilité dans les détergents. Le développement de différentes techniques permettant de stabiliser la structure des RCPGs au cours des dernières années a provoqué l'éclosion de structures cristallines de différents RCPGs de la famille A en complexe ou non avec un antagoniste, un agoniste ou un peptide dérivé de la protéine $G\alpha$ [46-52]. Ces structures ont confirmé plusieurs des prédictions obtenues biochimiquement et permettent d'augmenter la compréhension des mécanismes par lesquels la structure de ces protéines dirige leurs propriétés fonctionnelles. La Figure 2 représente la structure du récepteur β 2-adrénergique en liaison avec l'agoniste inverse carazolol et donc dans sa forme inactive, sur laquelle on peut observer l'orientation des sept

domaines transmembranaires, ainsi que d'une hélice alpha (hélice 8) située immédiatement après le TM7.

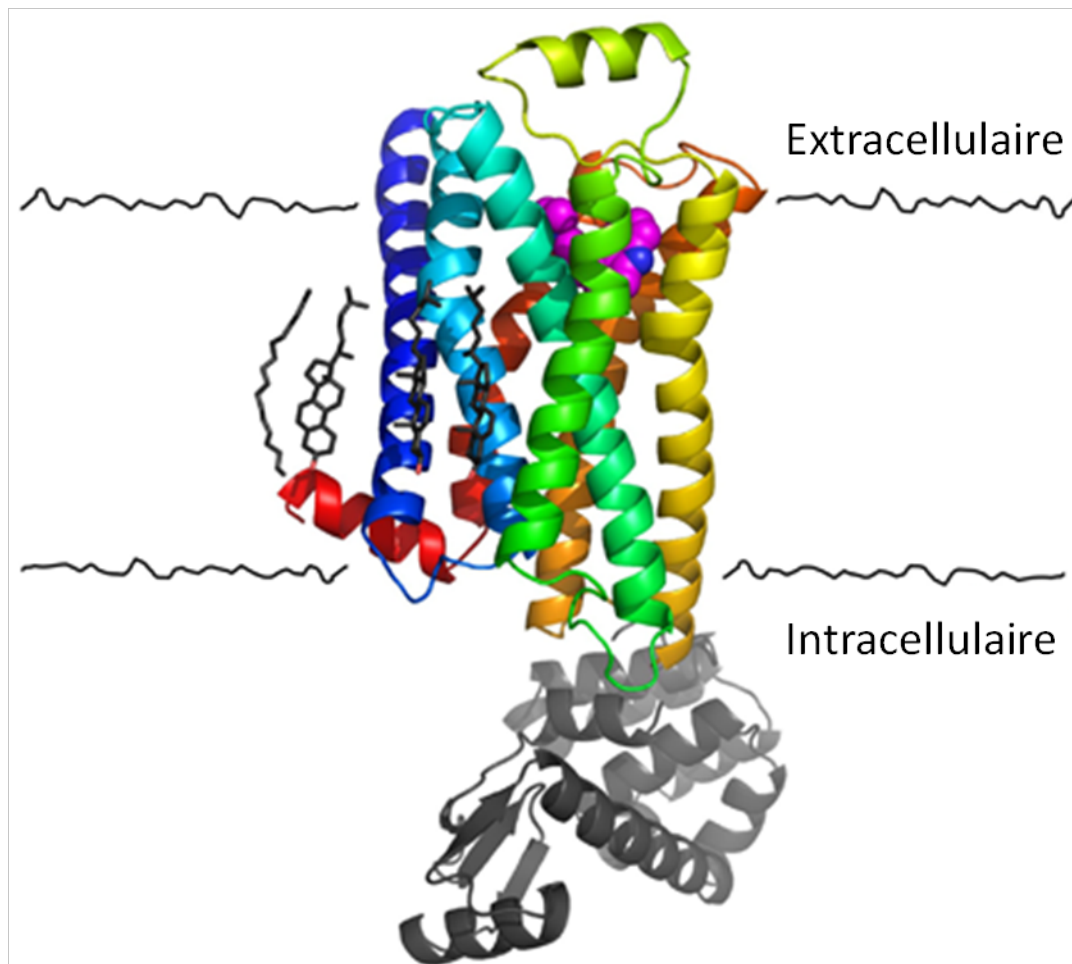


Figure 2. Structure tridimensionnelle du récepteur β 2AR. Le récepteur est coloré selon les couleurs de l'arc-en-ciel de bleu (TM1) à rouge (TM7 et hélice 8). La présence du palmitate et de molécules de cholestérol sont indiqués en noir. L'anticorps liant la 3^e boucle intracellulaire et stabilisant la structure du récepteur est représenté en gris. L'agoniste inverse carazolol est en mauve.

La superposition des structures à l'état inactif du récepteur de la lumière (rhodopsine) et des récepteurs β 1AR, β 2AR et du récepteur de l'adénosine A_{2A} révèle la présence de plusieurs similarités ainsi que quelques différences notables [41]. Dans le cas de la rhodopsine, la 2^e boucle extracellulaire (e2) forme un feuillet β qui recouvre la poche de liaison du ligand lié de façon covalente au récepteur et l'isole du solvant. La région N-terminale présente également une conformation structurée. Par contre, la boucle e2 des récepteurs β 2AR et le

β 1AR qui lient des ligands diffusibles, possède une courte hélice α stabilisée par des ponts disulfures qui laisse la poche de liaison exposée au solvant. De plus, le domaine N-terminal de ces récepteurs est désordonné. Ensuite, les ligands pour la rhodopsine (11-*cis* retinal), le β 2AR (carazolol, timolol) et le β 1AR (cyanopindolol) forment des liaisons polaires et hydrophobes avec des résidus des TM3, 5, 6 et 7. En contraste, le ligand du récepteur de l'adénosine A_{2A} , l'antagoniste ZM241385, se lie de façon perpendiculaire au plan de la membrane et interagit principalement avec les TM6 et 7 démontrant que les RCPGs peuvent supporter différents modes de liaison. Une autre différence est observée au niveau du verrou ionique formé entre le motif E/DRY du TM3 et un résidu glutamate du TM6 qui stabilise les récepteurs dans une conformation inactive. Ce verrou est observé dans le cristal de la rhodopsine mais est absent dans les structures du β 2AR, β 1AR et A_{2A} . Ce phénomène pourrait être expliqué par une interaction plus faible du verrou ionique chez ces récepteurs qui serait brisée lors de la formation du cristal et concorderait avec l'observation que ces récepteurs possèdent une activité constitutive plus élevée que la rhodopsine [53]. Ces structures révèlent également que le résidu proline du motif conservé NPXXY provoque une déformation de la structure α -hélicale du TM7 et le résidu tyrosine fait face à une poche délimitée par les TM2, 3, 6 et 7 qui contient également un réseau de molécules d'eau. Enfin, le β 1AR et le récepteur A_{2A} possède une hélice α dans la 2^e boucle intracellulaire qui sert de plateforme pour la formation d'un pont hydrogène avec le motif E/DRY. L'absence de cette hélice chez le β 2AR pourrait expliquer l'activité constitutive élevée de ce récepteur.

Examinons maintenant les changements conformationnels observés lorsqu'un récepteur est sous sa forme active et les mécanismes par lesquels ces changements peuvent mener à l'activation des protéines G hétérotrimériques. Le cristal de l'opsine, la forme photoactivée de la rhodopsine, révèle que la portion cytoplasmique du TM6 se déplace vers l'extérieur et se rapproche du TM5. Ce mouvement, qui brise le verrou ionique, est stabilisé par la formation de nouvelles interactions entre les TM3 et 5 et les TM6 et 5. De plus, le résidu tyrosine du motif NPXXY s'insère dans l'espace préalablement occupé par le TM6 et stabilise la conformation active. Ces changements conformationnels ont pour effet de créer une cavité dans laquelle la protéine G peut se lier. Le cristal de l'opsine liée avec un peptide dérivé de la queue C-Terminale de la protéine G transducine démontre que les résidus hydrophobes de l'hélice formée par ce peptide interagissent avec une surface hydrophobe

formée par les extrémités cytoplasmiques des TM3, 5, 6 et stabilisée par l'hélice 8 [51]. Récemment, la structure cristalline du récepteur A2A en complexe avec un agoniste révèle des changements conformationnels des TM3, 5 et 6 similaires à ceux de l'opsine [46]. La structure de l'opsine avec le peptide C-terminal de la protéine G transducine a permis d'établir un modèle moléculaire qui révèle deux modes de liaisons de l'hélice α de la protéine G au récepteur [54]. Ces deux modes correspondent au complexe récepteurs actifs/protéines G-GDP et au complexe récepteur actif/protéine G sans nucléotide. Lors du passage d'un état à l'autre, l'hélice subirait une inclinaison de 42° et une rotation de 90° et ce mouvement pourrait être transmis au site de liaison des nucléotides provoquant le relâchement du GDP. Ce modèle permettrait d'expliquer le mécanisme de l'activité GEF des récepteurs sur les protéines G hétérotrimériques.

Les RCPGs possèdent également une structure quaternaire, c'est-à-dire qu'ils s'assemblent entre eux pour former des homodimères, des hétérodimères et probablement des structures oligomériques. Bien que longtemps controversé, l'accumulation d'évidences en faveur de ce concept le rend maintenant universellement accepté. Les conséquences fonctionnelles de l'oligomérisation sont nombreuses et pour le besoin de cette thèse, seulement son rôle potentiel dans le transport des RCPGs du reticulum endoplasmique (RE) à la membrane plasmique sera décrit. Dans certains cas, l'hétérodimérisation est absolument nécessaire pour la sortie des récepteurs du RE. Par exemple, le récepteur GABA_BR1 possède dans sa queue C-terminale un site RXR qui retient le récepteur dans le RE lorsqu'il est exprimé seul. La co-expression du récepteur GABA_BR2 qui dimérise avec GABA_BR1 et masque le motif de rétention, permet l'adressage à la membrane plasmique de l'hétérodimère [55]. La dimérisation des récepteurs de la famille A semble également être importante pour leur transport à la surface. Plusieurs études démontrent que les récepteurs forment des dimères rapidement après leur synthèse dans le RE [56, 57]. De plus, la mutation de résidus potentiellement impliqués dans la dimérisation du β 2AR provoque la rétention du récepteur dans le RE [58, 59]. Ensuite, plusieurs récepteurs de la famille A sont retenus dans le RE lorsqu'ils sont exprimés dans des systèmes hétérologues [60]. Il est possible que ces récepteurs nécessitent l'expression d'un autre RCPG pour leur transport. Par exemple, le récepteur α_{1D} AR est retenu dans le RE lorsqu'il est exprimé seul, mais transporté à la membrane plasmique lorsque co-exprimé avec le récepteur α_{1B} AR [61]. De plus, le récepteur α_{1D} AR est présent à la membrane plasmique des cellules de muscles lisses

DDT1 qui expriment les deux types de récepteurs de façon endogène, mais ils sont retenus à l'intérieur des cellules de muscles lisses de l'aorte de rat qui n'expriment pas le $\alpha_{1B}AR$ [62]. Des résultats similaires ont également été observés pour certains récepteurs olfactifs [63]. La dimérisation des récepteurs pourrait être nécessaire pour masquer un motif de rétention comme dans le cas du récepteur $GABA_B R1$ ou au contraire d'exposer un motif d'export du RE. Elle pourrait aussi être nécessaire pour stabiliser la structure du récepteur et échapper au contrôle de qualité du RE (voir section 2).

Comme nous le verrons plus loin, des mutations ponctuelles localisées dans différents domaines des RCPGs provoquent leur rétention intracellulaire, généralement causée par un défaut de repliement des récepteurs dans le reticulum endoplasmique. Le développement de l'étude cristallographique de la structure des récepteurs devrait permettre de mieux comprendre de quelle façon ces résidus contribuent à la stabilisation des RCPGs.

1.4 Protéines G hétérotrimériques

Les protéines G hétérotrimériques servent de lien entre le récepteur lié à un stimulus provenant de l'extérieur de la cellule et les effecteurs enzymatiques ou les canaux ioniques qui propagent l'information à l'intérieur de la cellule. Les protéines G sont formées de 3 sous-unités : la sous-unité α qui lie les nucléotides GDP et GTP, et les sous-unités β et γ qui forme un hétérodimère stable qui interagit avec la sous-unité α dans son état inactif (lié au GDP). Selon le modèle classique, la liaison du ligand au récepteur favorise le recrutement de l'hétérotrimère inactif lié au GDP. La formation du complexe récepteur-protéine G provoque le relâchement du GDP pour former un complexe de haute affinité récepteur-protéine G. La liaison d'une molécule de GTP sur la sous-unité α déstabilise ensuite ce complexe et provoque la dissociation de la protéine G du récepteur ainsi que la dissociation de la sous-unité α de l'hétérodimère $\beta\gamma$ qui sont ensuite libres d'activer ou inhiber leurs effecteurs respectifs. La sous-unité α possède une activité GTPase intrinsèque qui met fin au signal et permet la réassociation avec l'hétérodimère $\beta\gamma$. Des travaux récents démontrent cependant un pré-couplage des protéines G aux récepteurs en absence de ligand et suggèrent un changement conformationnel plutôt qu'une dissociation des sous-unités de l'hétérotrimère suite à l'activation du récepteur [64, 65].

Chez l'homme, il existe environ 20 sous-unités α différentes qui sont divisées en quatre familles selon leur homologie de séquence [66]. La famille Gs comprend la sous-unité $G_{\alpha s}$ et G_{α} olfactif qui activent l'adénylate cyclase qui convertit l'ATP en AMPc, un second messenger responsable, entre autres, de l'activation de la protéine kinase A (PKA). Ils peuvent aussi activer les canaux calciques de type L. La famille Gi comprend les sous-unités $G_{\alpha i_{1, 2, 3}}$, $G_{\alpha o_{1, 2}}$, les transducin $G_{\alpha t_{1, 2}}$, la gustducin $G_{\alpha g}$ et la sous-unité $G_{\alpha z}$. La plupart des Gi inhibent l'activité de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc et $G_{\alpha o}$ peut inhiber les canaux calciques de type N [67]. La famille Gq qui comprend $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha_{11, 14, 15, 16}}$. $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha_{11}}$, active la phospholipase C β qui clive le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) pour générer de l'inositol tri-phosphate (IP3), qui provoque le relâchement de réserves de calcium intracellulaire, et du diacylglycérol (DAG) qui recrute à la membrane et active certaines protéines kinase C (PKC) [68]. Enfin, la famille G_{12} est formée de $G_{\alpha_{12}}$ et $G_{\alpha_{13}}$ dont les effecteurs principaux sont des RhoGEFs qui régulent l'activité de petites GTPases impliquées dans l'assemblage du cytosquelette [69].

Il existe également 6 sous-unités β et 12 sous-unités γ dont plusieurs peuvent s'assembler pour former un hétérodimère stable *in vitro* suggérant une diversité potentielle des dimères $\beta\gamma$ dans les cellules [1]. Les dimères $\beta\gamma$ modulent également l'activité de plusieurs effecteurs tels que certaines adénylate cyclase [70], certaines isoformes de PLC [71], certains canaux potassiques [72] et calciques [73], la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) [74], Rap1a [75] et certaines protéines kinase couplées aux RCPGs (GRK) qui phosphorylent et désensibilisent les récepteurs mais pourraient aussi avoir d'autres substrats dans la cellule [76]. Les différentes combinaisons de sous-unité $\alpha\beta\gamma$ peuvent donc créer une grande variété de voies de signalisation induites par les RCPGs. Les mécanismes qui contrôlent la sélectivité de formation des hétérotrimères *in vivo* ainsi que le couplage d'une ou de plusieurs protéines G spécifiques à un récepteur en particulier demeurent à déterminer.

Il est également possible que les protéines G influencent le transport antérograde (RE vers la membrane plasmique) des RCPGs. Il a été mentionné au début de cette section que plusieurs évidences suggèrent que les récepteurs sont pré-couplés aux protéines G. De plus, une étude suggère que le dimère $\beta\gamma$ s'associe de façon précoce au récepteur dans le RE et que la sous-unité G_{α} est ensuite ajoutée au complexe lors du transport entre le RE et

l'appareil de Golgi (AG) [77]. Il est possible que l'interaction directe entre la protéine G et les RCPGs influence leur transport à la membrane plasmique en stabilisant une conformation du récepteur compatible avec son export. Plusieurs études démontrent également que l'activation de la protéine kinase D (PKD) et de la phospholipase C β 3 par les protéines G influence l'organisation de l'appareil de Golgi et le transport des protéines du réseau trans-Golgien (TGN) à la membrane plasmique [78, 79]. De plus, l'activation des protéines G à la membrane plasmique par certains RCPGs provoque la translocation de l'hétérodimère $\beta\gamma$ vers l'appareil de Golgi (AG), ce qui induit la fragmentation de ce dernier et influence la sécrétion des protéines [80].

1.5 Désensibilisation des signaux induits par les RCPGs

Il existe plusieurs mécanismes d'atténuation des signaux induits par les RCPGs. Les seconds messagers AMPc, IP3 et DAG sont neutralisés par les enzymes phosphodiesterases de l'AMPc (PDE), phosphatidylinositol phosphatases et diacylglycerol kinase. Certaines PDE sont recrutées au récepteur suite à son activation accélérant ainsi la dégradation de l'AMPc à la membrane [81]. Ensuite, la sous-unité G α possède une activité GTPasique intrinsèque qui mène à l'hydrolyse du GTP et à l'inactivation de la protéine G. Cette activité GTPasique peut être accélérée par les effecteurs de la protéine G, tels que la phospholipase C- β [82] ou par une famille de protéines nommée régulateurs de la signalisation par les protéines G (RGS) qui interagissent avec la sous-unité α et stabilise l'état de transition menant à l'hydrolyse du GTP [83, 84]. Le récepteur est lui-même la cible de différents processus qui entraînent le découplage du récepteur de la protéine G, c'est-à-dire la perte de sa capacité à activer la protéine G. Ces processus sont aussi nommés désensibilisation homologue ou hétérologue selon qu'ils nécessitent la présence d'un ligand sur le récepteur (homologue) ou non (hétérologue). Suite à leur activation, la majorité des récepteurs sont internalisés et peuvent ensuite être recyclés à la membrane plasmique ou dégradés par les lysosomes (Figure 3).

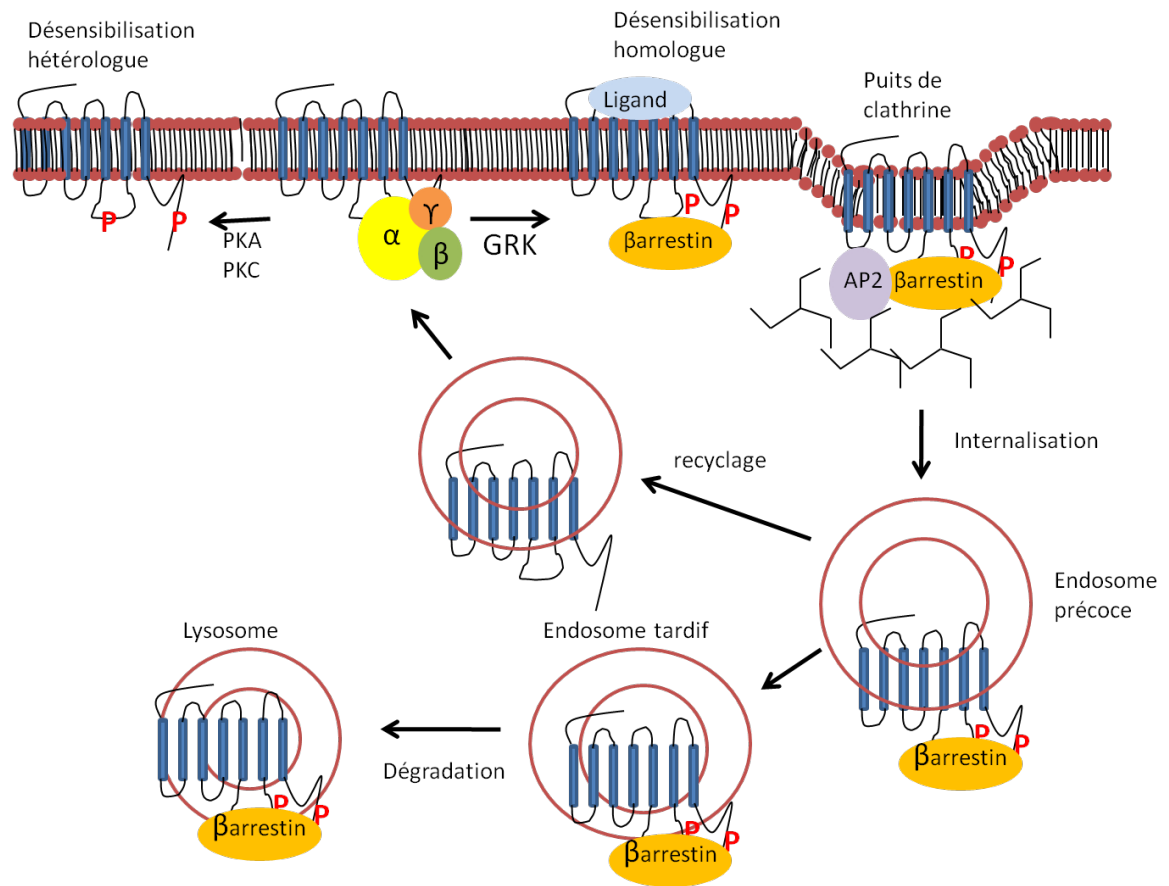


Figure 3. Désensibilisation et endocytose des récepteurs. Modifié de [1]

Les RCPGs possèdent plusieurs sites de phosphorylation dans leur queue C-terminale et dans la 3^e boucle intracellulaire. Certains de ces sites peuvent être phosphorylés par des kinases activées par les seconds messagers (PKA et PKC) ce qui diminue la capacité du récepteur à activer la protéine G [85]. Ce mécanisme de désensibilisation ne requiert pas la présence d'un ligand sur le récepteur et est appelé désensibilisation hétérologue car les récepteurs peuvent être inactivés par des voies de signalisation induite par d'autres protéines. La désensibilisation homologue est initiée par la famille des kinases de récepteurs couplés aux protéines G (GRK), qui phosphorylent des résidus serines et thréonines de la queue C-terminale et de la 3^e boucle intracellulaire de récepteurs activés par un ligand [76]. La phosphorylation augmente l'affinité du récepteur pour une famille de protéines nommées arrestin et c'est le recrutement de ces protéines qui provoque le découplage des protéines G [86, 87]. Les arrestins 1 et 4 sont exprimés spécifiquement dans la rétine et contrôle l'activité de la rhodopsin alors que les arrestins 2

(β arrestin1) et 3 (β arrestin2) sont exprimés de façon ubiquitaire. β arrestin1 et 2 jouent également un rôle important dans l'endocytose (internalisation) de plusieurs RCPGs. Les β arrestin1 et 2 contiennent dans leur queue C-terminale des motifs d'interaction avec la clathrine et la sous-unité β 2-adaptine du complexe AP-2 leur permettant de recruter les récepteurs dans les puits de clathrine pour l'endocytose [88, 89]. Les récepteurs peuvent être divisés en deux groupes selon leur interaction avec les β arrestins. Les récepteurs de classe A interagissent préférentiellement avec β arrestin2 et le complexe β arrestin2-récepteur se dissocie rapidement après l'internalisation. Cette classe comprend, entre autres, les récepteurs β 2 et α_{1B} adrénergiques, μ opiacé, endothelin A et dopamine D1A. Les récepteurs de classe B lient la β arrestin1 et la β arrestin 2 avec la même affinité et forment un complexe stable qui ne se dissocie pas après l'internalisation. Les récepteurs de l'angiotensin AT1_A, de la neurokinin NK-1, V2 de la vasopressin (V2R) appartiennent à cette classe de récepteurs [90, 91]. Une fois internalisé, les récepteurs peuvent emprunter une voie de recyclage rapide vers la membrane plasmique ou être dirigés vers le lysosome où ils sont dégradés. La stabilité de l'interaction β arrestin-récepteur semble être un facteur déterminant pour diriger les récepteurs vers une voie ou l'autre. Les récepteurs qui ont une interaction transitoire sont déphosphorylés et rapidement recyclés à la membrane plasmique alors que les récepteurs ayant une interaction stable sont recyclés lentement et davantage dégradés [92]. D'autres protéines interagissant avec les RCPGs tel que NHERF1 et GASP peuvent également diriger les récepteurs vers le recyclage ou la dégradation [93, 94] par les lysosomes.

Les protéines décrites jusqu'à maintenant représentent les mieux caractérisées des protéines qui contrôlent les fonctions des RCPGs. Au cours des dernières années, des dizaines de protéines interagissant avec les récepteurs et modulant leur pharmacologie, leur désensibilisation, l'activation de voie de signalisations indépendantes des protéines G et la localisation cellulaire des RCPGs ont été identifiées. De toute évidence, il nous reste encore beaucoup de choses à découvrir sur les mécanismes précis de régulation des RCPGs. De plus, ces derniers sont l'objet de plusieurs modifications post-traductionnelles qui affectent leurs fonctions. Je vais maintenant décrire brièvement les modifications post-traductionnelles que subissent les récepteurs en insistant particulièrement sur leurs rôles dans le transport et la dégradation des RCPGs.

1.6 Modifications post-traductionnelles des RCPGs

1.6.1 Phosphorylation

Les rôles bien caractérisés de la phosphorylation des récepteurs dans les processus de désensibilisation et internalisation ont été décrits dans la section précédente. Il est également possible que la phosphorylation des RCPGs influence leur transport antérograde en favorisant ou en inhibant l'interaction avec des protéines impliquées dans leur maturation ou leur export. Pour l'instant, peu de recherches ont été effectuées à ce sujet, mais une étude récente démontre qu'un site de phosphorylation situé dans la queue C-terminale du récepteur GPR15 est nécessaire pour l'interaction avec la protéine 14-3-3 et le transport du récepteur à la membrane plasmique [95]. Étant donné l'importance de cette région dans l'interaction avec de nombreuses protéines et la présence de plusieurs sites de phosphorylation dans ce domaine, il ne serait pas surprenant que cette modification joue un rôle important dans le contrôle du transport antérograde de nombreux RCPGs.

1.6.2 Palmitoylation

La palmitoylation est la formation d'un lien thioester entre un acide gras, généralement le palmitate, et le groupement thiol d'un résidu cystéine d'une protéine [96]. Comme la phosphorylation, cette réaction est réversible et sujette à une régulation. Ce n'est que très récemment qu'une famille de protéines transmembranaires comprenant 23 membres chez l'homme a été identifiée comme étant responsable de la palmitoylation de plusieurs protéines dans la cellule [97, 98]. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un motif DHHC essentiel à leur activité palmitoyltransferase et sont principalement localisées dans l'appareil de Golgi, le RE et la membrane plasmique. La palmitoylation des RCPGs a été détectée pour la première fois sur les résidus Cys322 et 323 de la rhodopsine qui sont situés dans la région proximale de la queue C-terminale [99]. Un site de palmitoylation a ensuite été identifié dans une région analogue du β 2AR [100]. Les structures cristallines de ces récepteurs révèlent que leurs sites de palmitoylation sont situés immédiatement après l'hélice 8 qui est orientée parallèlement à la membrane (Figure 2) [44, 45]. La présence d'un résidu palmitate ancré dans la membrane peut donc influencer l'orientation de cette région importante pour le couplage aux protéines G et contrôler l'activité des récepteurs. Des sites de palmitoylation dans la queue C-terminale ont été

identifiés pour plusieurs récepteurs et la présence de cystéines conservées dans cette région suggère que la majorité des RCPGs sont palmytilés. La mutation des sites de palmytilation provoque des effets différents selon le récepteur. Elle peut influencer le couplage aux protéines G, la phosphorylation, l'internalisation, la dégradation et le transport des récepteurs du RE à la membrane plasmique [96]. Certaines études suggèrent que les récepteurs sont d'abord palmytilés pendant leur transport entre le RE et l'AG ou peu après leur entrée dans l'appareil de Golgi [101]. De plus, la mutation des résidus palmytilés de plusieurs RCPGs provoque une diminution du nombre de récepteurs atteignant la membrane plasmique suggérant que cette modification est importante pour le transport antérograde et/ou la stabilité des récepteurs [101-106]. Cependant, la mutation du ou des sites de palmytilation de certains récepteurs n'affectent pas leur expression à la surface et les mécanismes par lesquels cette modification contrôle le transport de certains RCPGs ne sont pas connus.

1.6.3 Ubiquitination

L'ubiquitin est un polypeptide de 76 acides aminés qui peut être attaché aux résidus lysines des protéines par l'action combinée de 3 enzymes de conjugaison de l'ubiquitin (E1, E2 et E3). E1 et E2 forment des intermédiaires thiolester avec l'ubiquitin et c'est E3, aussi appelé ubiquitin ligase, qui transfère l'ubiquitin sur le substrat. L'ubiquitin contient également des résidus lysines pouvant être ubiquitinés pour former des chaînes polyubiquitinées. Les chaînes d'ubiquitine peuvent être enlevées par des protéases spécifiques pour l'ubiquitin (USP) ou par des enzymes de déubiquitination (DUB). L'ubiquitination de certains RCPGs, notamment le β 2AR, semblent favoriser leur dégradation par les lysosomes suite à leur activation par un agoniste [107, 108]. L'ubiquitination joue également un rôle important dans le contrôle de qualité des protéines synthétisées dans le RE car elle sert de marqueur pour cibler les protéines mal repliées vers la dégradation par le protéasome. Ce processus sera décrit plus en détail dans le prochain chapitre où nous discuterons des processus de synthèses protéiques dans le RE et du transport des protéines jusqu'à la membrane plasmique.

1.6.4 N-Glycosylation

La N-glycosylation est une modification co-traductionnelle affectant les protéines membranaires ou sécrétées et qui consiste en la formation de chaînes polysaccharidiques hétérogènes sur un ou plusieurs résidus asparagines. Cette modification joue un rôle très important dans la maturation, la dégradation et le transport des protéines du RE à la membrane plasmique et sera décrite de façon détaillée plus loin. La grande majorité des RCPGs sont glycosylés dans leur domaine N-terminal et également dans les boucles extracellulaires. L'importance de la N-glycosylation pour l'expression à la surface des RCPGs a été démontrée pour le récepteur 5-HT_{2A} [109], 5-HT_{3A} [110], 5-HT_{5A} [111], PAR1 [112], le GLP-1R [113], la rhodopsin[114], le récepteur de la relaxin[115] et bien d'autres. La glycosylation peut également influencer la liaison du ligand à certains RCPGs ainsi que leur signalisation et leur internalisation [112, 116-118]. Le β 2AR est un excellent exemple de récepteurs possédant de multiples sites de glycosylation qui influencent différemment les fonctions du récepteur. Il a été proposé que les sites Asn6 et Asn 15 situés dans la région N-terminale favorisent le transport à la surface du récepteur [119], alors que le résidu Asn187, situé dans la 2^e boucle extracellulaire, serait nécessaire pour diriger le récepteur vers la dégradation par les lysosomes lors d'une exposition prolongée à un agoniste [120]. Enfin, puisque la nature des sucres est constamment modifiée pendant le transport des glycoprotéines dans la voie de sécrétion, le profil de glycosylation est régulièrement employé pour suivre l'état de maturation des protéines transmembranaires ou sécrétées.

Il est important de noter que la majorité des protéines impliquées dans la régulation des RCPGs subissent également plusieurs modifications post-traductionnelles qui affectent leur capacité à influencer les fonctions des récepteurs, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire à l'étude des mécanismes de régulation des RCPGs.

1.7 Maladies associées aux RCPGs

La rétinite pigmentaire, qui cause différents troubles visuels, est la première maladie qui fut associée à des mutations dans un RCPG, la rhodopsine [33, 121]. Depuis, plus d'une centaine de mutations dans la rhodopsine ont été identifiées comme étant à l'origine de cette maladie qui affecte environ 1.5 millions de personnes dans le monde. Certaines de ces

mutations affectent le couplage du récepteur à la protéine G, mais la majorité d'entre elles provoquent la rétention du récepteur dans le RE, probablement causée par un mauvais repliement de la chaîne polypeptidique [122]. Plusieurs de ces mutations sont retrouvées à l'intérieur des domaines transmembranaires, mais certaines sont présentes dans les boucles intracellulaires et les régions N- et C-terminales [122]. Cela suggère que le repliement adéquat des RCPGs nécessite la formation d'interaction entre plusieurs résidus situés dans les différentes régions des récepteurs et que la mutation d'un seul de ces résidus est suffisante pour déstabiliser la structure des récepteurs et provoquer leur rétention par le contrôle de qualité du RE. Peu après cette découverte, des mutations dans le récepteur V2 de la vasopressin (V2R) furent identifiées comme cause du diabète insipide néphrogénique (NDI), une maladie caractérisée par un grave problème de réabsorption d'eau au niveau des reins [19]. À l'instar de la rhodopsin, plus de 180 mutations distribuées dans les différentes régions du V2R sont associées au NDI et la plupart de ces mutants sont retenus à l'intérieur de la cellule [123]. Des mutations qui interrompent le transport des récepteurs à la membrane plasmique et sont à l'origine de diverses maladies ont depuis été identifiées pour plusieurs RCPGs (Tableau II) démontrant l'importance de ce phénomène qui est également observé chez d'autres protéines transmembranaires telles que le régulateur de conductance transmembranaire (CFTR) associé à la fibrose kystique [124].

Tableau II: Récepteurs pour lesquels des mutations provoquent leur rétention intracellulaire et causent des maladies humaines.

| Récepteur | Maladie | Référence |
|--------------|---|-----------|
| V2R | Diabète insipide néphrogénique | [19] |
| Endothelin B | Hirschprung's disease | [131] |
| CaR | Hypercalcémie hypocalciurique familiale | [129] |
| GnRH | <i>Hypogonatropic hypogonatism</i> | [125] |
| TSHR | Hypothyroïdisme congénital | [127] |
| MC4R | Obésité morbide précoce | [130] |
| FSHR | <i>Ovarian dysgenesis</i> | [128] |
| LHR | Pseudohermaphrodisme mâle, infertilité | [126] |
| Rhodopsin | Rétinite pigmentaire | [33] |
| MC1R | Vulnérabilité au cancer de la peau | [132] |

Des travaux initialement effectués sur le V2R ont permis la découverte d'une approche thérapeutique potentielle pour ces maladies causées par la rétention d'un RCPG. En effet, des ligands lipophiliques du V2R peuvent rétablir l'expression à la membrane plasmique de récepteurs mutants où ils sont fonctionnels [133]. Ces ligands, aussi appelés chaperones pharmacologiques, peuvent également diminuer les symptômes du diabète insipide néphrogénique chez des patients, démontrant ainsi leur potentiel thérapeutique [134]. Les chaperones pharmacologiques agiraient en liant le récepteur mutant dans le RE et en stabilisant une conformation du récepteur lui permettant d'échapper au contrôle de qualité du RE et d'être transporté à la membrane plasmique [135]. L'efficacité des chaperones pharmacologiques sur la sauvegarde de récepteurs mutants a depuis été démontrée pour plusieurs autres RCPGs [59, 129, 130, 136-138]. Les chaperones pharmacologiques peuvent également augmenter l'expression à la membrane plasmique de récepteurs de type sauvage dont le processus de maturation est peu efficace [139]. Les mécanismes précis par lesquels les chaperones pharmacologiques rétablissent le transport des récepteurs mutants ne sont pas connus et pourraient varier selon le mutant. En effet, certains mutants sont rattrapés très efficacement alors que d'autres ne le sont que très peu ou pas du tout. Ces derniers nécessiteront le développement de différentes approches afin de rétablir leur expression à la membrane plasmique. De plus, différents ligands n'ont pas tous la même efficacité pour le sauvetage de récepteurs mutants. Une meilleure compréhension des mécanismes de contrôle de qualité du repliement des protéines et des mécanismes de transport antérograde des récepteurs pourraient donc permettre le développement de chaperones pharmacologiques plus efficaces et de nouvelles techniques pour rétablir le transport à la membrane plasmique de récepteurs mutants.

Une meilleure connaissance de ces processus pourrait aussi ouvrir la voie à la découverte de composés bloquant la maturation et le transport des RCPGs jusqu'à la membrane plasmique. Ceci est particulièrement pertinent étant donné que plusieurs maladies, notamment certains cancers, sont causées par une surexpression des récepteurs ou par des mutations qui provoquent leur activation de façon constitutive [3, 140]. Par exemple, le récepteur CXCR4 est surexprimé dans de nombreux tissus tumoraux [141]. De plus, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) nécessite la présence de co-récepteurs à la surface des cellules pour l'infection. Le récepteur CCR5 est un de ces récepteurs et une mutation naturelle provoquant la rétention intracellulaire du CCR5 donne une résistance

quasi complète aux individus homozygotes vis-à-vis de l'infection [142, 143]. Ceci suggère que la régulation négative du transport des récepteurs est également d'intérêt thérapeutique.

Comparativement aux mécanismes d'activation, de signalisation, de désensibilisation et d'internalisation des RCPGs décrits brièvement dans ce chapitre et qui ont fait l'objet d'études approfondies au cours des trente dernières années, les processus contrôlant la maturation et le transport des récepteurs du RE jusqu'à la membrane plasmique sont peu connus. Dans la prochaine section, je vais décrire les mécanismes généraux de la voie de sécrétion en indiquant au fur et à mesure les évidences liant les RCPGs à ces mécanismes.

2. Mécanismes généraux de biosynthèse et de transport des protéines transmembranaires à la membrane plasmique

2.1 Synthèse des protéines transmembranaires

Les RCPGs, comme toutes les protéines sécrétées et les protéines transmembranaires, sont synthétisés par des ribosomes attachés à la face cytoplasmique du reticulum endoplasmique (RE) [144, 145] puis transportés à travers la voie de sécrétion jusqu'à la membrane plasmique. Dans ce chapitre, je vais décrire les différentes étapes de la voie de sécrétion en insistant davantage sur le repliement et l'export des protéines du RE, car ces étapes sont plus pertinentes pour les études décrites dans cette thèse. Environ le tiers des protéines produites dans la cellule sont synthétisées dans le reticulum endoplasmique. Le RE est une organelle membranaire réticulaire contigüe à la membrane nucléaire qui serait issue de l'invagination de la membrane plasmique. En conséquence, l'intérieur du RE, appelé lumière du RE, possède une composition chimique similaire à l'environnement extracellulaire. Isolé du cytoplasme, la lumière du RE fournit un environnement propice au repliement de protéines destinées au milieu extracellulaire, notamment en permettant la formation de ponts disulfures et la glycosylation, deux modifications qui stabilisent la structure des protéines. Le RE contient également diverses protéines et enzymes qui s'assurent que les polypeptides synthétisés dans le RE sont adéquatement repliés. Dans le cas contraire, ces protéines ne seront pas transportées dans la voie de sécrétion, mais seront immédiatement dégradées. Ces processus sont connus sous le nom de contrôle de qualité du RE.

2.1.1 Ciblage des protéines transmembranaires vers la membrane du RE

Comme l'intégration des protéines transmembranaires dans la membrane du RE se fait de façon co-traductionnelle, la cellule doit distinguer très rapidement après le début de la synthèse entre une protéine synthétisée dans le cytoplasme et une protéine destinée à la voie de sécrétion. Les peptides signaux sont des séquences généralement situées dans le domaine N-terminal d'une protéine qui permettent de diriger les protéines nouvellement synthétisées ou en cours de synthèse vers la membrane plasmique chez les bactéries ou la membrane du reticulum endoplasmique dans les cellules eucaryotes [146]. Ces séquences

de 15 à 50 acides aminés sont caractérisées par un cœur hydrophobe de 6 à 15 acides aminés qui est essentiel pour le ciblage des protéines vers la voie de sécrétion. La plupart des peptides signaux possèdent également un domaine polaire précédent le cœur hydrophobe. Elles peuvent être clivées après leur insertion dans la membrane du reticulum endoplasmique par un enzyme nommé signal peptidase ou faire partie intégrale de la protéine et permettre l'ancrage de cette dernière à la membrane bilipidique.

Dans les cellules de mammifères, les protéines sont transportées à travers (protéines sécrétées) ou intégrées (protéines transmembranaires) à la membrane du reticulum endoplasmique de façon co-traductionnelle. Les peptides signaux de ces protéines sont reconnus dès leur sortie du ribosome par la particule de reconnaissance du signal (SRP) (Figure 4). Ce complexe ribonucléoprotéique interagit directement avec le peptide signal [147] et avec les protéines ribosomales L23a et L35 situées au site de sortie du polypeptide [148]. La liaison du SRP provoque un arrêt temporaire de la traduction chez les eucaryotes [149] et le recrutement du complexe SRP-RNC (ribosome/chaîne polypeptidique en croissance) par le récepteur du SRP (SR), une protéine hétérodimérique située dans la membrane du reticulum endoplasmique [150]. Le SRP et son récepteur sont des GTPases possédant une affinité intrinsèque très faible envers le GTP [151]. L'affinité du GTP envers le SRP augmente significativement lorsque ce dernier est lié au peptide signal et au ribosome [152] permettant la formation d'un complexe SRP-SR qui requiert la présence de GTP sur chacune des protéines [152] [153]. La liaison du SR au SRP provoque le relâchement du peptide signal [154] et son transfert au complexe de translocation (translocon) [155], ce qui permet la reprise de la traduction et le transfert de la protéine dans le RE. L'hydrolyse du GTP est nécessaire pour ce processus et mène également à la dissociation du complexe SR-SRP [156, 157] libérant le SRP afin d'initier un nouveau cycle de recrutement de ribosome.

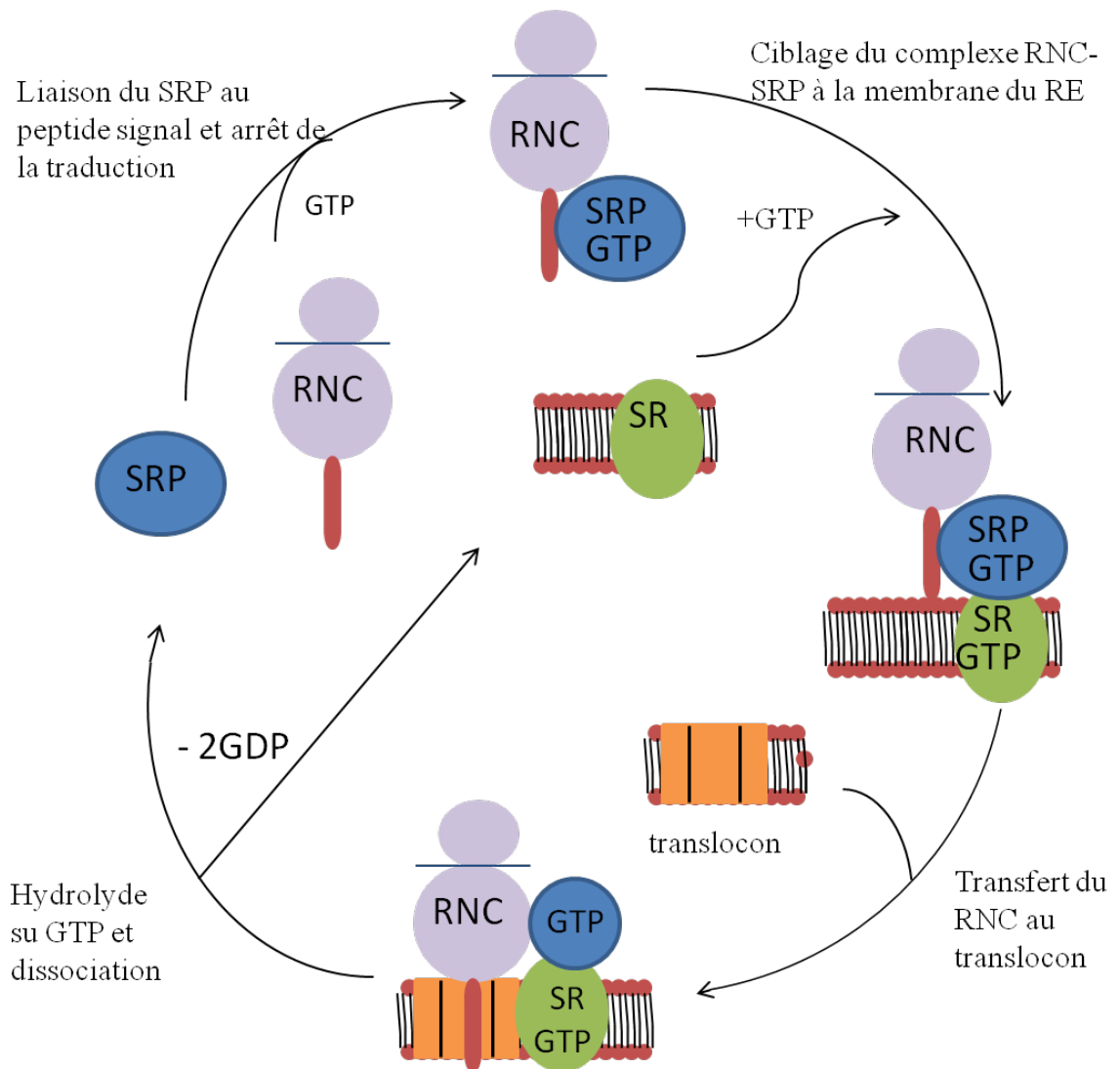


Figure 4. Représentation schématique du cycle de recrutement des complexes RNC à la membrane du RE et leur transfert au translocon. Adapté de [158].

En plus de diriger les protéines de la voie de sécrétion vers le RE, les peptides signaux influencent également la topologie des protéines transmembranaires. En effet, le peptide signal peut être orienté dans deux directions à l'intérieur du translocon ce qui va déterminer si le domaine N-terminal de la protéine est transporté dans le lumen du réticulum endoplasmique (orientation de type I) ou demeure dans le cytoplasme (orientation de type II). La présence de résidus chargés et un cœur hydrophobe court

favorise l'orientation de type II alors que l'absence de charge et une longue région hydrophobe favorise l'orientation de type I [159-161].

Tous les récepteurs couplés aux protéines G possèdent un domaine N-terminal extracellulaire. Chez la majorité des RCPGs, le premier domaine transmembranaire agit probablement comme peptide signal non-clivable bien que les autres TM en possèdent aussi la capacité [162]. Le domaine N-terminal de ces récepteurs est donc transporté dans la lumière du RE après leur traduction dans le cytoplasme. Un certain nombre de RCPGs (5 à 10%) présentent un peptide signal clivable supplémentaire en amont du domaine N-terminal [163, 164]. Comme la liaison du peptide signal au SRP arrête la traduction et que celle-ci ne reprend qu'après le transfert du peptide signal au translocon, cela signifie que la translocation à travers la membrane du RE du domaine N-terminal de ces récepteurs s'effectue au fur et à mesure de leur synthèse. La présence du peptide signal clivable pourrait s'expliquer par l'impossibilité de transporter le domaine N-terminal complètement synthétisé de ces récepteurs dans le RE. Une étude démontrant que la présence du peptide signal est nécessaire pour la translocation à travers la membrane du RE du domaine N-terminal du récepteur B de l'endothélin (ET_{BR}) semble valider cette hypothèse [165]. Des résultats similaires ont été observés pour le récepteur des cannabinoïdes 1 [166]. L'absence du peptide signal clivable du ET_{BR} provoque également la rétention du récepteur dans le reticulum endoplasmique et une perte de liaison du ligand. Les domaines N-terminaux des récepteurs possédant un peptide signal clivable sont en général plus long (moyenne de 200 acides aminés) que ceux des récepteurs n'en possédant pas (moyenne de 40 acides aminés) et sont également enrichis en acides aminés chargés positivement [163]. Ces facteurs pourraient expliquer en partie pourquoi leur domaine N-terminal ne puisse être transporté après leur synthèse. La présence d'une structure globulaire stable dans le domaine N-terminal empêcherait également une translocation post-traductionnelle. Une analyse informatique révèle que la vaste majorité des récepteurs de la famille 2 (B) et 3 (C) ainsi que des récepteurs aux hormones glycoprotéiques (famille 1C) possède un peptide signal [165]. Le domaine N-terminal de ces récepteurs possède une structure globulaire qui contribue à la liaison de leur ligand. Les récepteurs des familles 1A et 1B, dont le domaine N-terminal ne contribue pas à la liaison du ligand, possèdent très rarement un peptide signal. Ceci suggère que la présence du peptide signal est nécessaire chez les récepteurs qui possèdent une structure repliée stable dans leur domaine N-terminal. Le peptide signal

clivable pourrait également favoriser l'expression de certains récepteurs. En effet, la délétion du peptide signal du récepteur CRF-R1 (corticotropin-releasing factor receptor 1) provoque une diminution de l'expression totale du récepteur d'environ 90% sans affecter la fonctionnalité, le transport vers la membrane plasmique, la dégradation et le niveau d'ARN messenger du récepteur [167]. De plus, le peptide signal clivable du récepteur du peptide 1 similaire au glucagon (GLP-1R) est absolument nécessaire pour la synthèse de ce récepteur, indiquant que les TMs du GLP-1R ne peuvent pas servir de peptide signal non-clivable [113]. Enfin, l'ajout d'un peptide signal clivable à des récepteurs qui en sont normalement dépourvus favorise également leur expression [168-170]. Le peptide signal clivable pourrait favoriser le ciblage du récepteur vers la membrane du RE et/ou favoriser la translocation et l'intégration du récepteur dans la membrane en modifiant l'activité du complexe de translocation comme nous le verrons dans la prochaine section.

À l'exception de leur composition généralement hydrophobe, les peptides signaux possèdent peu d'homologie de séquence. Ils pourraient donc représenter des cibles intéressantes pour le développement de drogues bloquant l'expression spécifiques de certaines protéines. La découverte récente d'un composé bloquant de façon spécifique la translocation dans le RE et l'expression de la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (VCAM1) démontre le potentiel de ce concept [171].

2.1.2 Intégration des protéines transmembranaires dans la membrane du reticulum endoplasmique

L'interaction entre le complexe SRP-SR et le peptide signal recrute les ribosomes traduisant les protéines transmembranaires à la membrane du reticulum endoplasmique. Ils sont ensuite transférés au complexe de translocation (translocon) qui interagit avec le peptide signal et le ribosome. Le translocon est un complexe protéique qui coordonne l'orientation et l'intégration des domaines transmembranaires à l'intérieur de la membrane bilipidique du RE tout en dirigeant les domaines solubles des protéines transmembranaires vers le compartiment luminal ou cytoplasmique approprié. Il forme un canal aqueux qui possède la particularité de pouvoir s'ouvrir dans deux directions soit perpendiculairement à la membrane pour transporter un polypeptide dans la lumière du RE ou à l'intérieur même de la membrane afin de permettre aux domaines transmembranaires de diffuser dans la phase lipidique (Figure 5) [172]. Le translocon est constitué de l'hétérotrimère Sec61 $\alpha\beta\gamma$ et

de la protéine TRAM (translocon-associated membrane protein) [173]. Comme l'activité de translocation des protéines sécrétées et d'intégration des protéines transmembranaires peut être reconstituée dans des protéoliposomes contenant exclusivement ces 4 protéines [174, 175], ils sont considérés comme formant le noyau du translocon du RE dans les cellules de mammifères [173]. TRAM peut être essentiel à la translocation de certaines protéines ou seulement avoir un effet stimulateur dans d'autres cas [174, 176]. Les caractéristiques de la séquence signal (longueur, charges et hydrophobicité) influenceraient la dépendance de TRAM pour la translocation [176].

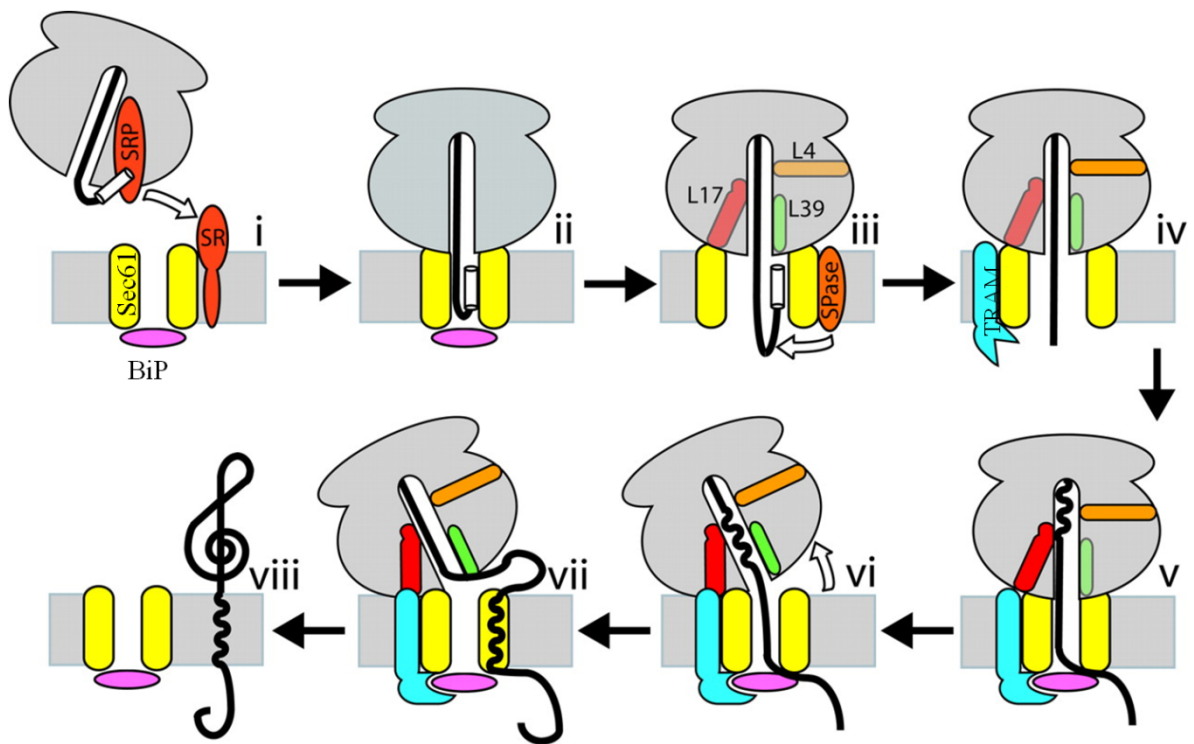


Figure 5. Représentation schématique du complexe de translocation. Par souci de simplicité seulement les composantes essentielles du complexe et quelques protéines associées sont représentées. Adapté de [177].

Plusieurs protéines se retrouvent associées de façon permanente ou transitoire au complexe translocon et pourraient ainsi influencer l'efficacité de translocation. Le récepteur de la particule de reconnaissance du signal (SR) a déjà été mentionné. Le complexe protéique associé à la translocation (TRAP), formé de quatre sous-unités transmembranaires ($\alpha\beta\delta\gamma$), augmente l'efficacité de translocation de certaines protéines

[178, 179]. Comme nous le verrons plus loin, TRAP pourrait également être impliqué dans le contrôle de qualité du repliement des protéines lors de la translocation. On retrouve également le complexe signal peptidase (SPase) qui clive les peptides signaux et le complexe oligosaccharyltransférase qui catalyse la glycosylation de la chaîne polypeptidique en croissance [180, 181]. La protéine calnexin, une chaperone impliquée dans le repliement des protéines en formation, interagit avec la chaîne polypeptidique en croissance [182] et le translocon [183]. Une autre chaperone, la protéine BiP (Hsp70), contrôlerait également l'ouverture du canal du translocon [184, 185] et est importante pour la translocation (Figure 5) [186]. La présence de nombreuses chaperones à proximité du translocon indique que les processus de translocation et de repliement des protéines transmembranaires sont intimement liés.

L'analyse par microscopie cryo-électronique du complexe Sec61-ribosome révèle que le tunnel de sortie du polypeptide du ribosome est aligné avec le pore du complexe Sec61 [187-190]. Bien que ces études démontrent la présence d'une ouverture de 12 à 17 Å entre la base du ribosome et le translocon, des expériences d'atténuation de fluorescence révèle que la liaison du ribosome au complexe Sec61 forme une jonction étanche qui isole la chaîne polypeptidique en croissance du cytoplasme [191]. Au repos, le canal du translocon est fermé du côté luminal par une hélice alpha [192]. Chez les eucaryotes, la protéine BiP contribuerait également à conserver l'étanchéité du canal du côté luminal en absence de translocation et au début de la translocation [185]. La liaison du peptide signal permet l'ouverture du côté luminal du pore formant ainsi un canal aqueux continu à partir du site de sortie du ribosome jusqu'à la lumière du reticulum endoplasmique [191, 193] permettant le transfert du polypeptide dans le RE.

Des expériences de photocrosslinking ont révélées que la chaîne protéique en croissance réagit majoritairement avec la sous-unité Sec61 α ce qui a mené à l'hypothèse que les 10 α -hélices transmembranaires de cette protéine, qui sont particulièrement hydrophiles, forment les parois du canal [194, 195]. Cette hypothèse est supportée par la structure cristalline de l'homologue du translocon chez l'archaebactérie *Methanococcus jannaschii* [192]. La sous-unité α est organisée en un domaine N-terminal (hélices 1 à 5) et un domaine C-terminal (hélices 6 à 10) qui sont reliés ensemble par une boucle entre les hélices 5 et 6 à l'arrière du complexe pour former une structure en forme de moule [192].

Les sous-unités β et γ se retrouvent en périphérie du complexe. La portion frontale du complexe qui est formée des hélices 2b et 3 et des hélices 7 et 8 peut s'ouvrir pour permettre la diffusion du peptide signal ou des domaines transmembranaires d'une protéine dans la phase lipidique de la membrane du RE. Ceci est supporté par une étude qui démontre que le cœur hydrophobe d'une séquence signal forme une hélice qui s'intercale entre les hélices 2b et 7 de la sous-unité α et est également en contact avec des phospholipides [196]. De plus, les domaines transmembranaires d'une protéine en cours de synthèse interagissent initialement avec la sous unité Sec61 α et la protéine TRAM [197], qui est également localisée dans cette région du complexe [198]. Puis, le domaine transmembranaire s'éloigne de Sec61 α mais reste associé à TRAM pour une plus longue durée [197]. TRAM pourrait donc servir de chaperone stabilisant les domaines transmembranaires avant qu'ils ne soient relâchés dans la membrane lipidique [172]. La longueur, l'hydrophobicité et la localisation des résidus chargés à l'intérieur du segment transmembranaire déterminent l'efficacité de leur intégration dans la membrane [199, 200].

La plupart des études décrites jusqu'à présent ont été effectuées sur des chaînes polypeptidiques contenant un ou deux segments transmembranaires. Qu'en est-il de l'intégration de protéines possédant plusieurs domaines transmembranaires (TM)? Le modèle co-translationnel suggère que le premier domaine transmembranaire agit comme peptide signal pour diriger le complexe ribosome/chaîne croissante vers le translocon et provoquer l'ouverture du canal pour permettre la translocation dans le RE. Le deuxième TM agit comme signal d'arrêt de la translocation en provoquant un changement conformationnel du translocon pour refermer le canal du côté luminal, un processus impliquant également la protéine BiP [184] tout en relâchant la jonction ribosome-translocon afin de diriger la chaîne polypeptidique vers le cytoplasme [201]. La synthèse d'un troisième domaine transmembranaire refermerait la jonction ribosome-translocon et provoquerait l'ouverture du canal du côté luminal et ainsi de suite permettant ainsi d'intégrer successivement les TMs dans la membrane du RE et de former l'alternance des domaines cytoplasmiques et luminaux [202]. L'analyse topologique du canal aquaporin 4 (AQ4), une protéine possédant 6 TMs, a confirmée la présence de signaux alternatif (TM1, 3, 5) et de signaux d'arrêt (TM2, 4, 6) et que chaque domaine transmembranaire agit de façon indépendante pour établir la topologie de la protéine, un TM à la fois (Figure 6A) [203]. De plus, des expériences de photo-crosslinking révèlent qu'après leur sortie du

ribosome, chaque TM de l'AQ4 lie d'abord un site particulier à l'intérieur de Sec61 α et demeure à cet endroit jusqu'à la synthèse d'un nouveau domaine transmembranaire puis se déplace à travers le translocon [204]. Ces résultats sont en accord avec le modèle proposé précédemment. Par contre, l'intégration de l'aquaporin 1, une protéine hautement homologue à l'AQ4, est effectuée par un mécanisme différent. La présence des résidus hydrophiles Asn49 et Lys51 dans le TM2 de l'AQ1 l'empêche d'agir comme signal d'arrêt et d'être intégré dans la membrane du RE ce qui mène à un intermédiaire de repliement contenant 4 domaines transmembranaires alors que le TM2 est situé dans la lumière du RE et le TM4 dans le cytoplasme (Figure 6B) [205, 206]. Le TM3 subit ensuite une rotation de 180° et les TM2 et 4 sont intégrés dans la membrane du RE pour former une protéine contenant 6 TMs comme l'AQ4 [207].

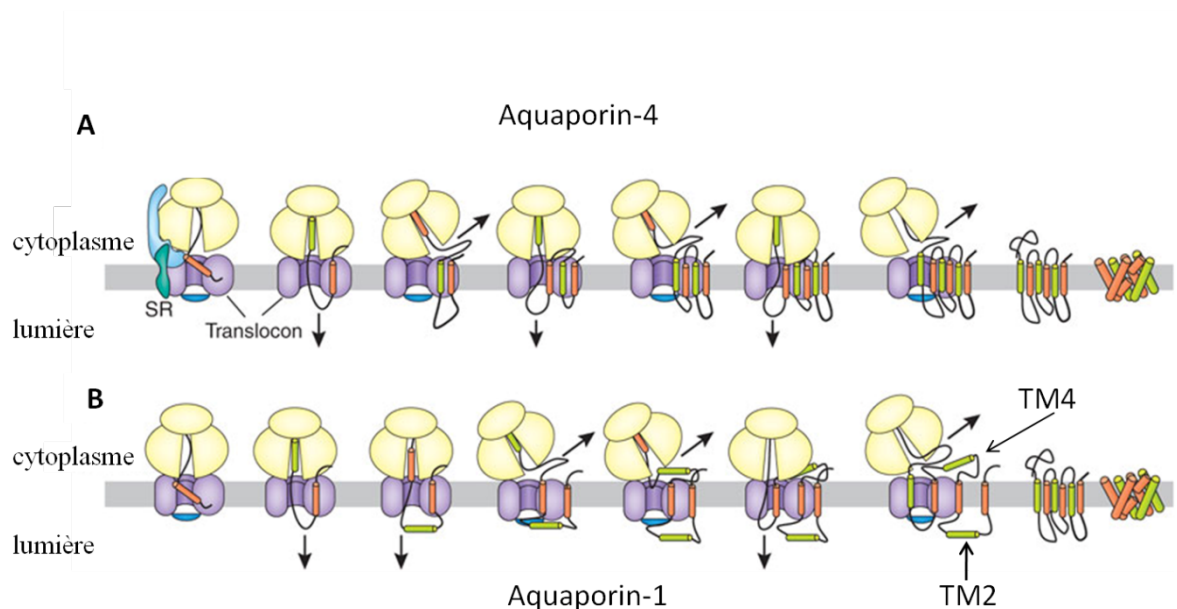


Figure 6. Représentation schématique de deux modèles différents d'intégration de protéines polytopiques tels qu'observés pour l'aquaporin-4 (A) et l'aquaporin-1 (B). Adapté de [202].

Ce type de réarrangement post-traductionnelle des domaines transmembranaires est également observé pour d'autres protéines contenant des résidus hydrophiles dans leur TM [208, 209]. Ceci démontre qu'il existe une flexibilité dans les mécanismes d'intégration et de repliement des protéines polytopiques afin de potentiellement permettre une plus grande variabilité des résidus composant les domaines transmembranaires. Certains TMs de

protéines polytopiques ne sont pas intégrés dans la membrane lorsqu'ils sont exprimés seuls. Ces TMs nécessitent la formation d'interaction avec d'autres TMs de la protéine afin de permettre leur intégration dans la bicouche lipidique. Les mécanismes permettant la réorientation et l'intégration de domaines transmembranaires de façon post-traductionnelle sont inconnus. Il est possible que ce processus s'effectue spontanément après le relâchement de la protéine dans la membrane du RE. En effet, certaines boucles peptidiques et même de larges domaines peptidiques de protéines ancrées à la membrane peuvent traverser la bicouche lipidique sans assistance [210, 211]. Il est également possible que des protéines du translocon ou associées au translocon permettent de réduire la barrière énergétique associée au mouvement de boucles peptidiques et de TM à l'intérieur et à travers la membrane. Cette hypothèse est supportée par des expériences de crosslinking qui révèlent que plusieurs domaines transmembranaires demeurent associés aux protéines du translocon de façon prolongée avant d'être relâchés en groupes dans la membrane [212-215]. Ensuite, le profil de cross-linking varie selon le TM. Par exemple, les domaines transmembranaires possédant des résidus chargés semblent interagir davantage avec la protéine TRAM [200]. Enfin, bien que le pore formé par un hétérotrimère Sec61 $\alpha\beta\gamma$ ne peut contenir plus d'un TM ni permettre la rotation d'un TM ou le repliement d'un domaine peptidique, plusieurs études suggèrent que les hétérotrimères Sec61 $\alpha\beta\gamma$ peuvent s'associer en structures oligomériques qui forment une grande région centrale similaire à un pore [187, 189, 216]. Ces résultats, combinés au fait que le translocon peut activement retenir et relâcher des TM dans un processus dépendant de l'ATP [217, 218], suggèrent que le translocon et les protéines qui lui sont associées sont des chaperones qui contribuent au repliement adéquat des protéines polytopiques.

2.2 Repliement protéique dans le reticulum endoplasmique

2.2.1 Repliement protéique in vitro

Simultanément à la translocation et l'intégration dans la membrane lipidique, la chaîne protéique en croissance subit plusieurs modifications (coupure du peptide signal, formations de ponts disulfures, N-glycosylation) et doit être repliée adéquatement [177]. Le repliement protéique peut se définir comme étant la conversion rapide et efficace de l'information contenue dans une séquence linéaire d'acides aminés en une ou quelques structures natives pour chaque polypeptides exprimés dans la cellule [219]. Des *études in*

in vitro effectuées au début des années 1960 ont révélées que certaines protéines dénaturées en solution peuvent se replier adéquatement et atteindre leur structure native [220-222] en l'absence d'autres facteurs protéiques. Ceci suggère que seule l'information contenue dans la séquence d'acides aminés est requise afin d'obtenir la structure native de la protéine, cette dernière étant celle où l'énergie libre de Gibbs du système est la plus faible [223]. Comme l'exposition de régions hydrophobes de la chaîne polypeptidique au milieu aqueux contribue à augmenter l'énergie du système, la protéine se replie de façon à former un cœur hydrophobe contenant en majorité les chaînes latérales de résidus non-polaires alors que les chaînes latérales de résidus chargés et polaires seront exposées au solvant [224]. Cet effet hydrophobe a longtemps été considéré comme étant le principal facteur contribuant à la stabilisation de la structure native. Des études plus récentes démontrent que la formation de ponts hydrogènes intramoléculaires contribuent également de façon importante au processus de repliement [225]. Bien que certaines protéines puissent se replier spontanément en solution, le processus de repliement à l'intérieur de la cellule est assisté par une classe de protéines nommées chaperones moléculaires.

2.2.2 Chaperones moléculaires

Une grande proportion de protéines à l'intérieur de la cellule nécessite l'assistance de chaperones moléculaires afin d'atteindre leur conformation native de façon efficace et rapide [226]. Dans un contexte cellulaire, les chaînes polypeptidiques risquent d'atteindre une conformation non-fonctionnelle qui, dans certains cas, mène à de l'agrégation et à la formation de complexes cytotoxiques comme les fibres amyloïdes. La majorité (environ 90%) des protéines cellulaires possèdent au-dessus de 100 acides aminés ce qui augmente la probabilité qu'elles forment des structures non-natives compactes en milieu aqueux [227]. En effet, le repliement d'une protéine passe par plusieurs structures intermédiaires qui peuvent être des étapes vers la structure native ou des conformations non-natives stables (conformations biochimiquement non-fonctionnelles). De plus, la probabilité de former des structures mal repliées stables augmente avec des structures topologiques complexes stabilisées par des interactions à longue distance ou lorsque les protéines possèdent plusieurs domaines qui n'interagissent pas dans la structure finale mais qui pourraient interagir pendant le repliement [228, 229]. Les chaînes polypeptidiques partiellement repliées ou mal repliées exposent des résidus hydrophobes et des régions non-

structurées du squelette peptidique ce qui les rend plus susceptibles à l'agrégation [230]. La densité élevée de macromolécules dans les compartiments intracellulaires favorise également l'agrégation des protéines partiellement repliées [231]. Enfin, le processus de traduction peut également augmenter les risques de repliement inapproprié car une chaîne polypeptidique incomplète ne peut se replier dans sa structure native. Comme le processus de traduction est relativement lent (15 à 75 secondes pour une protéine de 300 acides aminés), la chaîne polypeptidique en croissance demeure dans un état partiellement replié pendant une longue période de temps ce qui pourrait mener à la formation d'interactions non-natives. Pour ces raisons, les cellules possèdent des outils comme les chaperones moléculaires afin de favoriser un repliement protéique efficace. Une chaperone moléculaire est une protéine qui interagit avec une autre protéine dans sa structure non-native, la stabilise et l'aide à atteindre sa conformation native, mais qui ne fait pas partie de la structure fonctionnelle finale [230]. Les chaperones ne contiennent pas d'information stérique dirigeant le repliement. Elles augmentent le rendement du repliement en liant les résidus hydrophobes exposés par les structures non-natives empêchant ainsi la formation d'interactions intra ou inter-moléculaires non-natives [226]. En plus de favoriser le repliement de protéines lors de la traduction, les chaperones contribuent au repliement de protéines dénaturées par des stress cellulaires, à l'assemblage d'oligomères, au transport intracellulaire et à la dégradation protéolytique [232]. La plus importante classe de chaperones moléculaires est formée des protéines de la famille Hsp (Protéines de choc thermiques) qui sont conservées dans l'évolution et qui sont classées selon leur poids moléculaires (Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 et Hsp100) [219]. Ces protéines sont exprimées de façon constitutive, mais leur expression peut être augmentée en situation de stress cellulaire. Diverses chaperones moléculaires sont distribuées dans les différents compartiments cellulaires dont le reticulum endoplasmique, le site de synthèse des récepteurs couplés aux protéines G [233, 234].

2.2.3 Chaperones Hsp du reticulum endoplasmique

Le repliement des protéines synthétisées dans le reticulum endoplasmique débute pendant la traduction et se poursuit de façon post-traductionnelle. Certaines protéines solubles peuvent se replier très facilement alors que d'autres comme la thyroglobuline [235] ou le récepteur LDL [236], une protéine transmembranaire, nécessitent l'assistance de

plusieurs chaperones et enzymes de repliements pour atteindre leur structure native dans un processus pouvant prendre plusieurs heures [237]. La lumière du reticulum endoplasmique contient une concentration très élevée de protéines (>100 mg/ml) qui assistent au repliement et qui catalysent certaines modifications covalentes telles que la glycosylation et la formation de ponts disulfures. Le Tableau III contient les différentes chaperones et enzymes de repliement retrouvées dans le RE. La protéine BiP (GRP78) est une des chaperones les plus abondantes du reticulum endoplasmique [238] et joue un rôle primordial dans les différentes fonctions du RE comme la translocation [239], le repliement et l'oligomérisation [240], le contrôle de l'homeostasie calcique [241] et la dégradation de protéines mal repliées [242]. Le récepteur du polypeptide intestinal vasoactif (VPAC1), le récepteur de la thyrotropin (TSHR), le récepteur de l'hormone lutéinisante ainsi que le récepteur delta-opiacé interagissent avec BiP suggérant que cette dernière joue un rôle dans le repliement des récepteurs couplés aux protéines G [243-246]. Nous avons vu précédemment que cette protéine interagit avec le translocon et contrôle l'ouverture du canal pendant la translocation. Étant donné sa localisation BiP peut interagir immédiatement avec la chaîne polypeptidique en croissance et influencer leur repliement. BiP appartient à la famille des Hsp70. Ces protéines possèdent un domaine de liaison au substrat (SBD), qui permet de lier des domaines hydrophobes d'un polypeptide, ainsi qu'un domaine ATPase lui permettant d'alterner entre un état de haute affinité (lié à l'ADP) et un état de basse affinité (lié à l'ATP) pour le substrat. Un polypeptide non-replié peut donc entreprendre des cycles de liaison et de relâchement avec BiP contrôlés par l'échange de nucléotides (ATP pour ADP) et l'hydrolyse de l'ATP, jusqu'à ce qu'il soit replié de façon à ne plus avoir de domaine de liaison à BiP [247]. Les fonctions de BiP sont contrôlées par des co-chaperones de la famille Hsp40 qui interagissent avec et stimulent l'activité ATPasique des chaperones de la famille Hsp70, ce qui favorise la liaison au substrat [248, 249]. Certaines Hsp40 peuvent également lier directement le substrat et l'acheminer aux Hsp70 [250]. Il pourrait y avoir jusqu'à 10 différentes Hsp40 dans le RE dont 7 ont été caractérisées jusqu'à maintenant (ERj1-7) [251]. Certaines sont membranaires (ERj 1, 2, 4, 7) alors que d'autres sont solubles (ERj 3, 5, 6) et elles influencent les différentes fonctions de BiP dans le RE. Ce dernier contient également deux facteurs d'échange nucléotidiques nommés Sil1 (BAP) et Grp170 qui contrôlent l'activité de BiP [252, 253].

Tableau III : Facteurs de repliements localisés dans le reticulum endoplasmique des cellules de mammifères

| Famille | Protéines | Fonctions |
|-------------------|------------------|--|
| Hsp90 | Grp94 | Repliement et ERAD |
| Hsp70 | BiP | Translocation, repliement, ERAD, UPR |
| Hsp110 | BAP | Facteur d'échange nucléotidique de BiP |
| | GRP170 | Facteur d'échange nucléotidique de BiP |
| HSP40 | ERj1 | Inconnus |
| | ERj2 | Inconnus |
| | ERj3 | Cochaperone de BiP |
| | ERj4 | ERAD |
| | ERj5 | Disulfide reductase potentielle impliquée dans le ERAD |
| | ERj6 | Protection contre le stress du RE |
| | ERj7 | Inconnus |
| Cyp | Cyclophilin B | Peptidyl-prolyl isomerase (PPI) |
| FKBP | FKBP2 | PPI potentielle |
| | FKBP7 | PPI associée à BiP |
| | FKBP9 | PPI |
| | FKBP10 | PPI |
| | FKBP11 | PPI pancréatique |
| | FKBP14 | PPI potentielle |
| PDI | PDI | Formation, isomerisation et réduction de ponts disulfures |
| | ERp57 | Oxydo-reductase associée à calnexin |
| | ERp72 | Oxidoreductase potentielle |
| | P5 | Oxidoreductase potentielle associée à BiP |
| | ERp46 | Protection contre le stress du RE |
| | ERp18 | Oxidoreductase potentielle |
| | ERp29 | Chaperone moléculaire prévenant l'oligomérisation prématurée |
| | ERp27 | Liaison de peptides |
| | ERp44 | Rétention thiol-dépendante dans le RE |
| Sulfhydryl | Ero1 α | Contrôle des conditions redox du RE |

| | | |
|-----------------|---------------|---|
| oxydase | Ero1 β | |
| Famille | Calnexin | Chaperone lectine transmembranaire |
| calnexin | Calreticuline | Chaperone lectine soluble |
| | Calmegin | Homologue de la calreticuline exprimé dans les testicules |
| UGGT | | Reglucosylation de protéines non entièrement repliées |

Le reticulum endoplasmique contient également une chaperone de la famille Hsp90 nommée GRP94 qui contribue à la maturation des chaînes lourdes de l'immunoglobuline et des récepteurs toll-like [254, 255]. GRP94 interagit également avec le récepteur de l'hormone luteinisante [244] et pourrait participer à la maturation des GPCRs. GRP94 interagit potentiellement avec des intermédiaires de repliement plus avancés que BiP car il lie certains substrats après qu'ils aient été relâchés de BiP [255]. De plus, le nombre de protéines qui requiert l'assistance de GRP94 pour leur maturation est plus faible que BiP [256]. Cette selectivité peut même être observée à l'intérieur d'une famille de protéine. Par exemple, l'expression à la surface des β 1 intégrines ne dépend pas de la présence de GRP94 contrairement à la majorité des intégrines [257]. En plus d'un domaine ATPase nécessaire pour sa fonction de chaperone [258], GRP94 contient un ou plusieurs sites de liaison de calcium qui contrôlent son abilité à lier des peptides [259]. Comme BiP, GRP94 serait également impliqué dans l'homéostasie du calcium et la dégradation de protéines mal repliées [256]. D'autres chaperones du RE telle que la calreticuline, qui appartient à la famille des chaperones lectines, peuvent également lier le calcium suggérant que la concentration calcique du RE peut affecter le repliement protéique. Cette hypothèse est supportée par des expériences de déplétion des réserves de calcium du RE qui provoquent un mauvais repliement de la thyroglobuline [260] et de la protéine reliée au récepteur LDL [261].

2.2.4 Chaperones Lectines

La majorité des protéines de la voie de sécrétion qui sont synthétisées dans le RE, dont les récepteurs couplés aux protéines G, sont glycosylées sur un ou plusieurs résidus asparagines. Ces modifications hydrophiles vont affecter le repliement, la stabilité, le transport intracellulaire, la dégradation et la sécrétion des glycoprotéines [262]. De plus, la présence de ces groupements carbohydrates crée un site de liaison pour des protéines

nommées lectines, dont certaines chaperones du reticulum endoplasmique. Le repliement de plusieurs glycoprotéines dans le RE est contrôlé par un cycle de déglycosylation et reglycosylation impliquant des chaperones, glucosidases et glucosyltransferases. Un complexe de glucides préassemblé (complexe glucidique initial) constitué de 3 glucoses, 9 mannoses et 2 N-acetyl glucosamine ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) (Figure 7) est d'abord transféré à partir d'un donneur pyrophosphate lipidique situé dans la membrane du RE sur les chaînes polypeptidiques en croissance par le complexe oligosaccharyl transferase (OST). Ce complexe transmembranaire composé d'environ 8 sous-unités et dont le site actif se situe dans la lumière du reticulum endoplasmique modifie la chaîne latérale de résidus asparagine situés dans la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr . L'OST interagit avec le translocon et le transfert du complexe glucidique initial se fait de façon co-traductionnelle quand la séquence consensus a émergée du translocon de 12 à 14 résidus dans la lumière du RE [263].

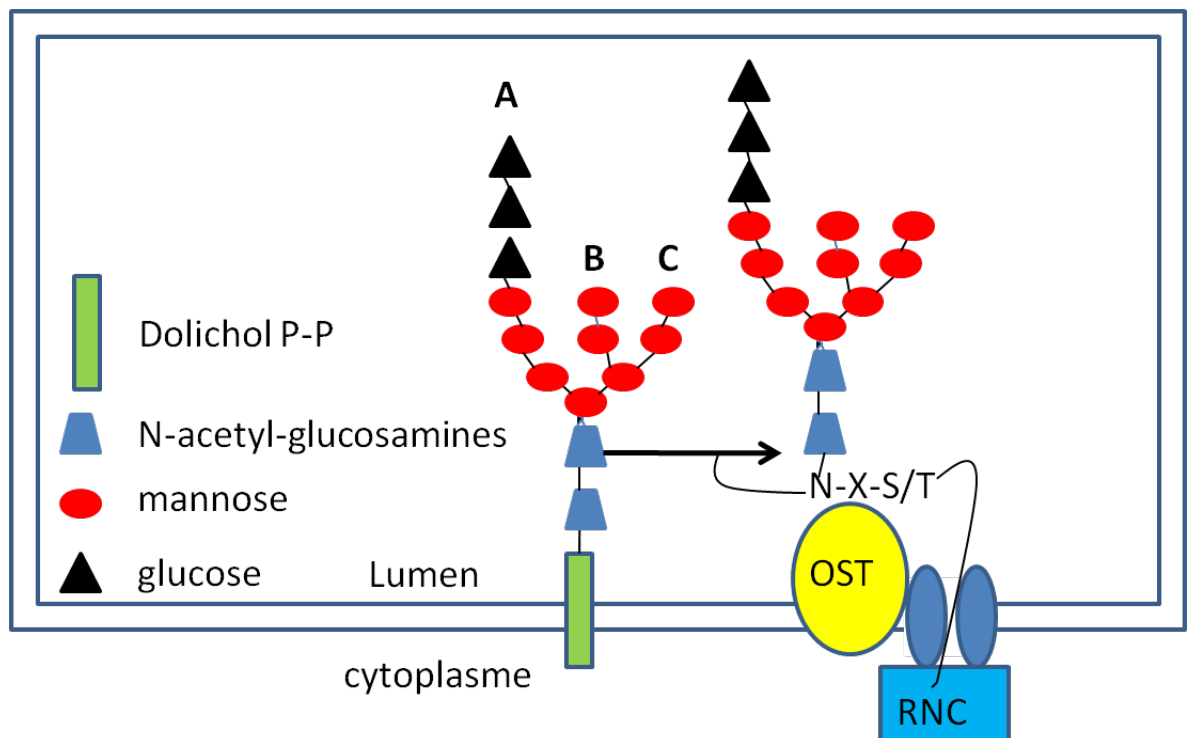


Figure 7. Représentation schématique du transfert du complexe glucidique initial.

Le complexe glucidique initial est ensuite modifié par l'enlèvement de certains sucres qui le composent et l'ajout d'autres sucres catalysé par différents enzymes situés dans le RE. Le premier glucose est rapidement enlevé par l'action de la glucosidase I pour former un carbohydre diglucosylé ($\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) qui supporte le recrutement d'une lectine transmembranaire du RE nommée malectine [264]. Le rôle de cette protéine récemment découverte demeure inconnu mais son interaction avec l'aquaporin 2 suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la maturation des protéines transmembranaires [265]. Le deuxième glucose est enlevé par la glucosidase II pour former un carbohydre monoglucosylé ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) qui permet l'interaction avec 2 chaperones lectines, la calnexin et la calreticuline [266, 267]. La calnexin est une protéine transmembranaire de type I qui possède un domaine luminal de liaison aux carbohydrates à partir duquel s'étend une longue boucle riche en proline (domaine P) impliquée dans le recrutement de ERp57, une oxydoreductase catalysant la formation de ponts disulfures [268-271]. La calreticuline est un paralogue soluble de la calnexin. La calnexine interagit avec les protéines solubles et transmembranaires alors que la calreticuline interagit préférentiellement avec les protéines solubles [262]. Une certaine proportion de la population de calnexin interagit avec le translocon et les ribosomes [272, 273] et peut donc interagir très tôt avec les protéines pendant leur synthèse [274, 275]. En plus de favoriser la formation de ponts disulfures via le recrutement de ERp57, ces deux chaperones diminuent la vitesse de repliement ce qui augmente l'efficacité du processus [262].

Afin de permettre le relâchement de la glycoprotéine de la calnexin, le dernier glucose du complexe glucidique initial est enlevé par l' α -glucosidase II [267, 276]. Si la protéine est bien repliée, elle est alors libre de quitter le reticulum endoplasmique. Par contre, si la protéine présente des structures hydrophobes indiquant qu'elle n'est pas correctement repliée, elle est reconnue par l'UDP-Glucose:glycoprotein glycosyltransferase (UGGT), un enzyme qui interagit avec les régions hydrophobiques exposées au solvant et qui transfère un glucose sur le complexe glucidique initial [277, 278]. Ceci permet à la protéine mal repliée de reformer un complexe avec la calnexin/calreticuline et de continuer le cycle de repliement jusqu'à l'obtention de la structure native. Plusieurs études suggèrent que la calnexin peut également lier les protéines de façon carbohydrate indépendante, dont plusieurs protéines transmembranaires [279-282]. De plus, la délétion du premier domaine transmembranaire de la protéine tetraspanin82 (4TM) provoque la rétention de cette

protéine dans le RE et une interaction prolongée avec la calnexine [283]. Aussi, la calnexin interagit avec le TM4 de la protéine protéolipidique et une mutation ponctuelle dans ce TM provoque un mauvais repliement de la protéine et la présence de la calnexin retarde la dégradation de ce mutant [284]. Ces résultats suggèrent que la calnexin a également un rôle de chaperone du repliement des domaines transmembranaires dans la membrane du reticulum endoplasmique. Compte tenu du fait que les RCPGs sont glycosylés, il n'est pas surprenant de constater que plusieurs études ont observé une interaction entre la calnexin et divers récepteurs [243, 244, 285-290]. La calnexin ralentit la dégradation du récepteur thyrotropin (TSHR)[243] et une mutation du récepteur V2 de la vasopressin (V2R-R337X), qui provoque une rétention du récepteur dans le reticulum endoplasmique, présente une interaction prolongée avec la calnexin [286]. Des mutations de la calnexin chez la drosophile bloquent la maturation de la Rhodopsin 1 et mène à la dégénérescence rétinale [288]. Ces études suggèrent que la calnexin joue un rôle important dans la maturation des récepteurs couplés aux protéines G.

2.2.5 Formation de ponts disulfures

La formation de ponts disulfures représente une étape importante de la maturation de la majorité des protéines qui traversent la voie de sécrétion. Comme mentionné dans le premier chapitre, la majorité des RCPGs possèdent des ponts disulfures dans leur domaine N-terminal et dans les boucles extracellulaires. Ces liaisons covalentes, formées par l'oxydation de deux groupements thiols libres de résidus cystéines, participent au repliement adéquat et à la stabilisation de la structure protéique [291]. La formation, la réduction et l'isomérisation des ponts disulfures sont catalysées par une famille d'enzyme contenant plus d'une vingtaine de membres nommées Protein disulfide isomerase (PDI) [292]. Cette famille de protéines localisées principalement dans le reticulum endoplasmique est caractérisée par la présence d'un ou plusieurs domaines thioredoxin contenant la séquence CXXC dans le site actif. Lors de la catalyse de la formation d'un pont disulfure, les résidus cystéines du site actif sont initialement sous formes oxydées (ponts disulfures) et agissent comme accepteur d'électron pour terminer sous formes réduites, alors que lors de la réduction d'un pont disulfure, ils sont initialement réduites pour finir sous formes oxydées [291]. L'état d'oxydation du site actif est contrôlé par l'environnement du RE et par des protéines telles que ERO1p qui peuvent transporter des électrons de par et d'autre

de la membrane du RE [293]. La structure cristalline de la protéine disulfide isomérase de la levure révèle que les deux domaines non-catalytiques forment une structure en forme de U enrichie en résidus hydrophobes qui pourrait servir de poches de liaisons pour des structures non-repliées du substrat et positionner ce dernier à proximité des domaines catalytiques [294]. Cette capacité de lier des régions hydrophobes non-repliées explique probablement pourquoi la PDI peut aussi agir comme chaperone moléculaire, indépendamment de son site actif, en inhibant l'agrégation d'une protéine mal-replée ne contenant pas de ponts disulfures [295, 296]. Le rôle potentiel de ces enzymes dans la maturation des RCPGs est peu caractérisé. Une interaction entre la PDI et les récepteurs des hormones glycoprotéiques a été observée (LHR, FSHR, TSHR) [244] mais l'importance de cette protéine dans la maturation des RCPGs demeure inconnue. ERp57, par son association avec la calnexin et la calreticuline, interagit spécifiquement avec les glycoprotéines [297, 298]. La surexpression de cette protéine, ainsi que ERp18, inhibe l'expression à la surface du récepteur de relâchement de l'hormone gonadotropine (hGnRHR) alors que ERp72, un autre membre de la famille des PDIs n'a aucun effet [299, 300]. ERp57 interagit également avec l'homodimère du récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT1R) et l'hétérodimère AT1R- β 2AR, mais pas avec l'homodimère β 2AR [301]. La présence de ERp57 semble favoriser la formation de l'homodimère AT1R et l'hétérodimère AT1R- β 2AR sans avoir d'effet sur l'homodimère β 2AR [301]. Ces résultats suggèrent que cette classe de protéines pourrait également participer à l'oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G. Cependant, la majorité des membres des PDIs sont peu caractérisés et leur importance dans la maturation des RCPGs demeure indéfinie.

2.2.6 Isomérisation Peptidyl-prolyl *cis-trans*

La plupart des liens peptidiques d'une protéine native possèdent une conformation *trans* à l'exception des liens Xaa-Pro qui se retrouvent en conformation *cis* ou *trans*. L'isomérisation *cis-trans* des liens peptidyl-prolyl est une étape limitante du processus de repliement protéique [302] qui est catalysée par une famille d'enzymes nommées peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérases (PPI)[303]. La cyclophiline B et les FKBP 2/13, 7/23 et 10/65 sont les membres de cette famille retrouvés dans le RE. La cyclophiline B interagit avec la calnexin et la calreticuline [304], BiP et PDI [305]. FKBP 23 lie et contrôle l'activité de BiP [306] et FKBP65 peut s'associer à un substrat lié à BiP [307]. Bien que ces protéines

accélèrent le repliement *in vitro*, peu d'information existe sur leur implication dans la maturation des protéines et des RCPGs dans les cellules vivantes [219].

Malgré la présence de tous ces facteurs favorisant le repliement, un certain pourcentage de protéines ne se replient pas adéquatement et doivent être éliminées afin d'éviter leur agrégation et leur accumulation dans la cellule.

2.3 Dégradation protéique associée au reticulum endoplasmique (ERAD)

L'efficacité du processus de repliement dans le reticulum endoplasmique varie d'une protéine à l'autre et ne peut être prédite par la séquence polypeptidique. L'efficacité du repliement de la protéine hémagglutinine de l'influenza a été évaluée à plus de 95 % [308] alors que seulement 25 % du CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) nouvellement synthétisé se replie de façon à pouvoir échapper au contrôle de qualité du RE et être transporté à la membrane plasmique [309]. Alors que les protéines ayant atteint leur structure tertiaire et quaternaire native peuvent poursuivre leur progression dans la voie de sécrétion, la majorité des protéines mal repliées ou dont le repliement n'a pu être complété sont retenues dans le RE puis dégradées par la voie de dégradation associée au RE (ERAD). Cette voie est caractérisée par la déglycosylation, la rétrotranslocation dans le cytosol, l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome 26S puis d'autres peptidases, des protéines présentant un défaut de maturation. La proportion de protéines dégradée avant d'atteindre leur structure native est controversée et varie d'une petite fraction dans une étude [310] à plus de 30% dans une autre étude [311]. La dégradation rapide des protéines malformées permet de conserver l'homéostasie du RE en prévenant l'accumulation de protéines mal repliées qui pourraient diminuer la capacité du RE à favoriser la maturation des protéines nouvellement synthétisées [312].

Comment le RE peut-il distinguer entre des intermédiaires de repliement qui doivent être protégés de la dégradation pendant leur maturation et une protéine mal repliée qui n'atteindra jamais son état natif et qui doit donc être éliminée? Ces deux conformères présentent des structures hydrophobes exposées qui sont reconnues par les différentes chaperones du RE et sont donc difficiles à discriminer. Une partie de la réponse pourrait provenir de la glycosylation qui jouerait un rôle crucial dans ce processus de reconnaissance [313]. Bien que la dégradation de certaines protéines puisse être initiée très

rapidement pendant leur traduction [314], la majorité des polypeptides nouvellement synthétisés possèdent une certaine période de temps pour atteindre leur structure native. Les protéines qui vont éventuellement être dégradées restent emprisonnées dans le cycle calnexin/UGGT précédemment décrit afin d'essayer d'atteindre, sans succès, une conformation leur permettant d'échapper au contrôle de qualité du RE. Alors que la présence d'un glucose sur la branche A du complexe glucidique initial ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) (Figure 7) contrôle l'interaction des glycoprotéines avec la calnexin, c'est la composition en mannose du complexe glucidique initial qui semble contrôler la destinée de la protéine. En effet, l'inhibition de l'enzyme $\alpha_{1,2}$ -mannosidase diminue la dissociation de la calnexin et la dégradation de protéines mal repliées [315-317]. L'enlèvement du mannose terminal pour former le complexe $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, en plus d'inhiber l'interaction avec la calnexin, favorise l'interaction avec d'autres lectines qui lient les mannoses préférentiellement. La famille de protéine EDEM (EDEM 1, 2, 3) sont des lectines qui lient le groupement $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, favorisent la dissociation de la calnexin de protéines mal repliées et favorisent leur dégradation [318-320] en accélérant leur démannosylation et en prévenant leur agrégation [321, 322]. OS-9 et XTP3-B sont deux autres lectines du RE qui lient les précurseurs partiellement démannosylés et favorisent la dégradation de protéines mal repliées [323-325]. La démannosylation progressive d'une protéine mal repliée permettrait donc de terminer la phase de maturation et d'initier le processus de dégradation.

OS-9, XTP3-B et EDEM1 interagissent avec le complexe SEL1L qui joue un rôle important dans la prochaine étape du processus de dégradation, la rétrotranslocation dans le cytoplasme et l'ubiquitination des protéines mal repliées [324-326]. La protéine SEL1 (homologue de Hrd3p) forme un complexe avec la E3 ubiquitin ligase HRD1p, la E2 ubiquitin-conjugating UBC6e, ancien ubiquitine protein 1 (AUP1), UBXD8, la p97 AAA ATPase ainsi que les protéines Derlin 1 et 2 qui sont nécessaires pour la rétrotranslocation de certains substrats [327-329]. Le mécanisme par lequel les protéines solubles ou transmembranaires sont transportées dans le cytoplasme demeure inconnu mais une étude récente chez la levure suggère l'existence d'un canal protéique formé par la E3 ligase Hrd1p pour transporter des protéines solubles de part et d'autre de la membrane du RE [330]. Dans le cas des protéines transmembranaires, l'intervention du translocon pour extraire les TMs de la membrane pourrait être nécessaire. Supportant cette hypothèse, des intermédiaires déglycosylés de dégradation du récepteur delta opiacé, un RCPG,

interagissent avec le translocon [331]. La formation de gouttellettes lipidiques pourraient également permettre d'extraire les protéines transmembranaires du RE mais peu de données supportent cette hypothèse pour l'instant [332]. Plusieurs chaperones telles que BiP, GRP94 et certaines disulfide isomerase (PDI) ont également été démontrées pour interagir avec la machinerie de dégradation et contribuer à la dégradation de certains substrats [317, 324, 333-335]. Certaines études suggèrent que Sec61 et la signal peptide peptidase pourraient également participer au processus de dégradation du RE [336-340]. Ceci suggère que la machinerie contrôlant le bon repliement des protéines et celle responsable de la dégradation de protéines mal repliées sont intimement liées.

Parallèlement à la rétrotranslocation, les protéines sont polyubiquitinées afin de les marquer pour la dégradation par le protéasome 26S. Les cellules de mammifères possèdent plusieurs E3 ubiquitin ligases résidentes du RE associées au processus de ERAD, incluant HRD1P, GP78, RNF5/RMA1, TEB3/MARCHIV, TRC8 et RFP2 [341-345]. La sélectivité de ces enzymes pour leur substrat demeure cependant mal définie. Les sucres restant sur les glycoprotéines sont enlevés par la N-glycanase cytosolique (PNG1) ce qui favorise, sans être essentiel, la dégradation par le protéasome [346, 347]. Ce dernier est un complexe multicatalytique contribuant à l'homéostasie cellulaire en dégradant les protéines redondantes ou mal repliées [348]. Comprenant plus de 30 sous-unités, il est formé de 2 structures principales. La particule cœur (20S), est formée de plusieurs sous-unités possédant une activité protéase responsable de l'hydrolyse des protéines en courts peptides. La particule régulatrice (19S) est formée de sous-unités qui lient les chaînes polyubiquitinées du substrat, et de sous-unités ATPases qui catalysent le dépliement des protéines et permettent l'accès au site de protéolyse [349]. Bien que la dégradation des protéines par le ERAD semble majoritairement dépendre du protéasome, d'autres systèmes pourraient également être impliqués dans la dégradation de protéines mal repliées. La peptidase géante tripeptidyl-peptidase II démontre une activité accrue dans des cellules adaptées avec un inhibiteur du protéasome [350]. De plus, certaines protéines mal repliées pourraient être éliminées par un processus d'autophagie impliquant les lysosomes [351-353].

Quelques études suggèrent que les RCPGs sont dégradés par ces différents processus. Lorsqu'ils sont exprimés dans des systèmes hétérologues, les récepteurs olfactifs

sont retenus dans le reticulum endoplasmique, polyubiquitinés et dégradés par le protéasome [289]. Ils forment également des agrégats qui sont dégradés par autophagie [289]. Certains mutants du récepteurs V2 de la vasopressin (V2R) et du récepteur de la mélanocortin de type 4 sont retenus dans le RE, ubiquitinés et dégradés par le lysosome et/ou le protéasome [354, 355]. Une proportion significative des récepteurs delta-opiacés nouvellement synthétisés sont déglycosylés, polyubiquitinés et dégradés par le protéasome [331]. EDEM1 interagit avec un mutant de l'opsin normalement retenu dans le RE et peut favoriser simultanément la dégradation et le repliement de ce mutant [356]. Une interaction entre le récepteur V2R et p97 AAA-ATPase et Derlin-1 a également été observée [357]. Malgré tout, très peu de choses sont connues sur les facteurs dirigeant la dégradation des RCPGs à partir du reticulum endoplasmique.

2.4 Système de réponse à l'accumulation de protéines mal repliées (UPR)

Les protéines mal repliées peuvent avoir un effet toxique pour la cellule, car les régions hydrophobiques exposées qui les caractérisent provoquent l'interaction et l'inhibition de la fonction d'autres protéines [358]. L'accumulation de protéines mal repliées dans le reticulum endoplasmique provoque l'activation de voies de signalisation intracellulaire qui augmentent la capacité du RE à replier et/ou dégrader les protéines. Cette adaptation se fait en deux phases. La première, rapide et transitoire, consiste à diminuer la quantité de protéine entrant dans le RE en inhibant la synthèse et la translocation des protéines. La deuxième, plus lente, implique l'activation de la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans le repliement et la dégradation des protéines dans le RE [359] telles que Bip, GRP94, PDI, Derlin (1, 2, 3), HRD1, EDEM [360-364]. Ce processus est initié par trois protéines transmembranaires du RE, l'inositol-requiring protein-1 (IRE1), le facteur de transcription 6 (ATF6) et la protéine kinase RNA (PKR)-like ER-kinase (PERK). L'augmentation de protéines mal-repliées dans le RE provoque l'oligomérisation d'IRE1 et son auto-phosphorylation par le domaine kinase de sa partie cytoplasmique. Cette auto-phosphorylation stimule l'activité endonucléase d'IRE1 et provoque le clivage de son seul substrat connu, le mRNA codant pour le facteur de transcription XBP1 [365, 366]. La protéine codée par le mRNA clivé est plus stable et est un activateur de gènes important pour l'UPR [365]. L'oligomérisation d'IRE1 pourrait être provoquée directement par la liaison de protéines mal repliées à son domaine luminal. Une autre hypothèse suggère

qu'en conditions normales, BiP interagit avec IRE1 et le conserve dans un état non-phosphorylé inactif, alors que l'augmentation de protéines mal repliées dans le RE mène à la dissociation de BiP du domaine luminal d'IRE1 et à l'oligomérisation de ce dernier [367, 368]. ATF6 est un facteur de transcription normalement ancré à la membrane du RE par son domaine transmembranaire. Dans des conditions de stress du reticulum, ATF6 est transporté vers l'appareil de Golgi où il est clivé par S1P (site 1 protease) et S2P (site 2 protease) ce qui permet au domaine cytosolique d'être transporté dans le noyau et d'activer l'expression de gène important pour le UPR [369]. ATF6 serait retenu dans le RE par BiP dans des conditions normales, alors que le stress du RE provoquerait la dissociation de BiP de ATF6 et le transport de ce dernier vers l'appareil de Golgi [370]. PERK est une protéine très similaire structurellement et fonctionnellement à IRE1 à la différence que son domaine kinase en plus de catalyser son autophosphorylation, stimule la phosphorylation et l'inactivation du facteur d'initiation de la traduction eIF2B, inhibant ainsi la synthèse protéique [371], permettant ainsi de diminuer la quantité de protéine entrant dans le RE. L'activation de l'UPR va donc affecter les processus généraux de synthèse, maturation et transport des protéines dans la cellule.

2.5 Transport RE-Golgi

2.5.1 Structure et formation des vésicules COPII

Lorsque que les protéines ont complété leur repliement normal, leur permettant ainsi d'échapper au contrôle de qualité du RE, elles sont empaquetées dans des vésicules de transport pour être acheminées vers l'appareil de Golgi. Le transport de protéines entre les différents compartiments de la voie de sécrétion est principalement effectué par des petites vésicules formées à la membrane du compartiment donneur et qui incorporent les protéines à transporter pour ensuite fusionner avec le compartiment accepteur et libérer leur cargo [372]. La formation de ces vésicules est initiée par des protéines cytoplasmiques qui se lient à la surface de la membrane lipidique et provoque une déformation locale de cette dernière. Ces protéines, aussi nommées protéines d'enveloppes, favorisent également l'incorporation sélective des protéines dans les vésicules en interagissant avec des signaux spécifiques présents dans le domaine cytoplasmique des cargos (protéines transportées par les vésicules). Différents assemblages de protéines d'enveloppes contrôlent différentes étapes de la voie de sécrétion. La clathrine et ses adaptateurs contrôlent la formation de vésicules de

transport entre le réseau *trans*-Golgien, les endosomes et la membrane plasmique. Les vésicules formées des protéines de l'enveloppe COPI sont responsables du transport intra-Golgi et du transport rétrograde du Golgi vers le RE alors que les vésicules COPII véhiculent les protéines du RE vers l'appareil de Golgi (Figure 8).

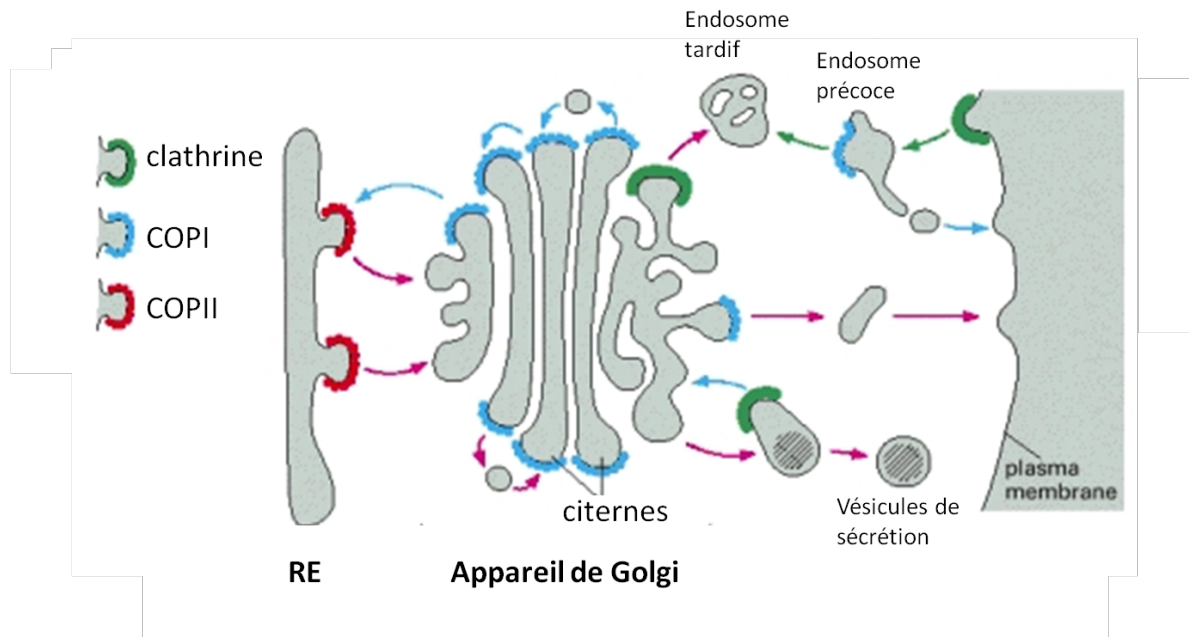


Figure 8. Représentation schématique des différents types de vésicules de transport, selon les protéines de l'enveloppe qui les composent (clathrine, COPI ou COPII), qui contrôlent le transport des protéines entre les différents compartiments cellulaires de la voie de sécrétion. Adapté de (528).

Nous allons d'abord décrire la formation et la composition des vésicules COPII. Ces vésicules sont formées dans des régions spécialisées du RE nommées sites de sortie du RE (ERES) [373, 374]. Un mutant de la glycoprotéine G du virus stomatitis vesicular (VSVG) dont le repliement est sensible à la température est retenu dans le RE mais exclu de ces sites de sortie à température restrictive, alors qu'à la température permissive, il colocalise avec ces sites et est transporté en dehors du RE [375]. Cette étude révèle également que plusieurs chaperones du RE (calnexin, calreticulin, BiP, PDI, ERp57) ne sont pas présentes dans ces sites suggérant que seules les protéines bien repliées ont accès aux sites de formation des vésicules COPII. La formation des vésicules COPII est initiée par le recrutement à la membrane du RE de la petite protéine G Sar1 qui oscille entre une forme inactive et cytoplasmique liée au GDP, et une forme active liée au GTP qui est

recrutée à la membrane du RE. L'échange de GDP pour GTP est catalysé par le facteur d'échange de nucléotide guanylé (GEF) Sec12, une protéine transmembranaire localisée au niveau des ERES [376, 377]. En plus de provoquer un changement de courbature de la membrane via l'insertion d'une hélice α -amphipatique de la bicouche lipidique [378], Sar1-GTP recrute séquentiellement l'hétérodimère Sec23/24 puis l'hétérotétramère Sec13/31. Ces cinq composantes sont suffisantes pour former des vésicules COPII dans un système reconstitué utilisant des liposomes synthétiques [379]. Sec23 interagit directement avec Sar1 et stimule son activité GTPase [380, 381], alors que Sec24 est principalement impliqué dans la reconnaissance des protéines (cargos) recrutées dans les vésicules COPII. L'hétérotétramère Sec13/31 est recruté aux complexes Sa1-Sec23/24 pour former la couche externe de l'enveloppe COPII. Il accélère l'activité GAP de Sec23 envers Sar1 [382] et permettrait de polymériser les complexes Sec23/24 pour former les vésicules [372]. Des expériences de cryo-microscopie révèlent que Sec23/24 et Sec13/31 s'assemblent pour former des structures en forme de cage de différentes géométries d'un diamètre allant de 60 à 100 nm [383]. Bien que non-essentielle *in vitro*, la protéine accessoire Sec16 semble jouer un rôle important dans le recrutement des composants de l'enveloppe COPII aux sites de sortie du RE [384, 385]. L'importance de la formation des vésicules COPII dans le transport des RCPGs a été démontrée par des études utilisant un dominant négatif de Sar1 qui provoque la rétention intracellulaire des récepteurs β 2AR, α _{2B}AR, AT₁R et hCaR [77, 386, 387].

2.5.2 Mécanisme de reconnaissance des cargos

En théorie, les protéines pourraient être intégrées de façon passive dans les vésicules COPII en fonction de leur concentration dans le reticulum endoplasmique. Bien que ce processus, nommé *bulk flow*, semble utilisé par quelques protéines sécrétées [388], la majorité des protéines cargos transmembranaires ou solubles sont spécifiquement enrichies à des concentrations de 3 à 50 fois supérieures dans les vésicules de transport [372]. Cet enrichissement est effectué par des séquences situées dans les régions cytoplasmiques des protéines cargos qui interagissent avec les protéines de l'enveloppe COPII. Ces séquences sont généralement caractérisées par la présence d'un motif dihydrophobe [389, 390], dibasique [391] ou diacide [392-394]. Sec24 semble être la principale sous-unité impliquée dans la liaison des cargos. Elle possède au moins trois domaines distincts de recrutement de

cargos et des mutations dans ces domaines affectent le recrutement de différentes protéines de façon variable [395]. De plus, les cellules de mammifères contiennent quatre homologues de Sec24 qui semblent posséder une certaine sélectivité pour les cargos reconnus [396]. Le fait que des mutations dans les domaines de liaisons de Sec24 n'ont aucun effet sur certaines protéines suggère que Sar1 et/ou sec23 pourraient aussi être impliqués dans la reconnaissance de certains cargos, mais peu d'évidences expérimentales supportent cette hypothèse. Afin d'être recrutées dans les vésicules COPII, les protéines solubles localisées dans la lumière du RE doivent interagir avec des protéines transmembranaires qui possèdent des motifs d'interaction avec le complexe COPII. Il existe différentes familles de ces récepteurs de cargos contenant plusieurs membres possédant chacun une spécificité particulière pour les cargos recrutés [397]. Les protéines transmembranaires qui possèdent un motif d'export dans leur domaine cytoplasmique peuvent être recrutées directement dans les vésicules COPII via une interaction avec le complexe Sec23/24. Cependant, ce ne sont pas toutes ces protéines qui possèdent un tel motif et la sortie du RE de certaines protéines transmembranaires nécessite également la présence d'un récepteur de cargos qui sert de lien avec les vésicules COPII [398-400]. Pour ce qui est des RCPGs, plusieurs études démontrent la présence de motifs situés dans la région proximale de la queue C-terminal important pour leur sortie du RE. Le motif E(X)₃LL pour le récepteur V2R, le motif F(X)₃F(X)₃F pour le récepteur D1R, FN(X)₂LL(X)₃L pour le récepteur V1b/V3 de la vasopressin et le motif F(X)₆LL pour les récepteurs AT1, α_{2B} -AR et β 2AR [401-403]. Un résidu leucine conservé dans la 1^{ère} boucle intracellulaire des récepteurs de la famille A semble également important pour leur sortie du RE [404]. L'export du récepteur AT2 semble dépendre de la présence d'un motif diacidique dans la queue C-terminale de ce récepteur [405]. Cependant, bien que présent chez les récepteurs α_{1B} -AR, V1b/V3 et β 2AR, ce motif n'est pas nécessaire pour leur export [403, 405]. Aucune interaction directe ou par l'intermédiaire d'un récepteur cargo entre un RCPG et des composantes des vésicules COPII n'a été détectée jusqu'à maintenant et le ou les rôles des motifs d'export des RCPGs demeurent inconnus.

2.5.3 Compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC)

Chez les levures, les vésicules COPII sont transportées directement du RE à l'appareil de Golgi. Les cellules de mammifères possèdent un réseau de membranes tubulo-

vésiculaires nommé compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC) avec lequel les vésicules COPII fusionnent peu après leur formation. Ce compartiment sert de site de triage entre les protéines qui doivent poursuivre leur chemin vers l'appareil de Golgi (cargo) et les récepteurs de cargo qui sont ramenés dans le reticulum endoplasmique [406-409]. La dissociation des cargos de leur récepteur est probablement stimulée par un changement de pH et/ou de la concentration calcique entre le RE et le ERGIC. Le transport rétrograde des protéines vers le RE est effectué par les vésicules COPI dont l'enveloppe est constituée de 7 sous-unités et l'assemblage dépend de la petite GTPase Arf1 [410, 411]. Ces vésicules reconnaissent des motifs dilysine [412] ou diphenylalanine. Des récepteurs cargos pour le transport rétrograde ont également été identifiés telle que le récepteur KDEL, qui reconnaît la séquence KDEL, et la protéine Rer1 qui est nécessaire pour la localisation dans le RE de plusieurs protéines transmembranaires [377, 413, 414]. Le transport de molécules du ERGIC vers l'appareil de Golgi pourrait également être effectué par des vésicules COPI [415-417]. Peu de choses sont connus sur les mécanismes de sélection des protéines pour le transport antérograde à partir du ERGIC, mais une étude récente sur le transporteur GABA1 suggère que la présence de signaux spécifiques pourraient être nécessaire [418]. Qu'est-ce qui différencie les vésicules COPI pour le transport antérograde des vésicules COPI pour le transport rétrograde? Une partie de la réponse pourrait provenir de la famille de petites protéines GTPase Arf qui contrôlent la formation des vésicules COPI. La suppression sélective de l'expression de combinaisons des 6 isoformes de Arf provoquent des effets spécifiques sur le transport antérograde et rétrograde [419]. La bidirectionnalité du transport des vésicules COPI pourrait aussi être contrôlée par des protéines de la famille Rab GTPases qui contrôlent l'assemblage de protéines d'échafaudages impliquées dans le transport vésiculaire. Le ERGIC contient 2 Rab; Rab2 stimule la formation de vésicules COPI enrichies de protéines recyclées vers le RE [420] et Rab1 (Rab1a, Rab1b) semble plutôt impliqué dans la formation de vésicule pour le transport antérograde [421, 422]. Rab1 est nécessaire pour le transport des récepteurs AT₁R et β 2AR, mais n'influence pas l'expression à la surface du récepteur α_{2B} -AR suggérant une voie alternative de transport [423]. Le ERGIC pourrait également être impliqué dans le contrôle de qualité du repliement des protéines. Il contient plusieurs chaperones incluant BiP, PDI et le senseur de repliement UGGT [424, 425]. Il existe une grande variété de substrats qui pourraient être sujets au contrôle de qualité du ERGIC, incluant la molécule MHC de classe I, des mutants de la

sucrase-isomaltase et de l' α -glucosidase, un mutant du cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), le mutant de la connexine E186K et certains mutants du récepteur V2 de la vasopressine (R143P, Y205C, V226E et R337X) [426-430]. Le ERGIC servirait donc également de point de contrôle supplémentaire pour les protéines mal repliées qui ont réussi à échapper au contrôle de qualité du RE.

2.6 Appareil de Golgi

Après avoir quitté le ERGIC, les vésicules de transport atteignent l'appareil de Golgi (AG). En plus de contrôler le transport des protéines vers différents compartiments cellulaires, l'AG est aussi un centre de nucléation des microtubules, un site d'entreposage de calcium, une plateforme de signalisation et un point de contrôle de la mitose [431]. Cette organelle est constituée de disques membranaires aplatis, nommés citernes, qui sont empilés et reliés entre eux pour former un ruban continu [432]. L'appareil de Golgi est divisé en trois compartiments: cis, median et trans [433] qui contiennent des enzymes (glycosyltransferases, RabGTPases) qui leur sont spécifiques. Les cargos en provenance du ERGIC fusionnent avec la partie cis puis sont transportés à travers l'appareil de Golgi pour ressortir dans la région trans. Il existe différents modèles de transport des molécules dans le Golgi dont la formation de vésicules intra-Golgi [434], le transport direct par des tubules connectant les citernes [435-437] ou le modèle de maturation des citernes où le cargo demeure dans une citerne qui mûrit progressivement de cis à trans par l'acquisition de nouvelles enzymes provenant du transport rétrograde des citernes trans vers les citernes cis [438]. La N-glycosylation des glycoprotéines est considérablement modifiée lors de leur passage à travers l'appareil de Golgi. Les résidus mannoses sont d'abord enlevés puis des résidus de N-acétylglucosamine, de galactose, d'acide sialique et dans certains cas de fucose sont ajoutés menant à la formation d'oligosaccharides complexes. Les enzymes catalysant les premières réactions (enlèvement de mannose et ajout de N-acétylglucosamine) sont enrichis dans les régions proximales (cis) de l'AG alors que les réactions tardives (ajouts de galactose, acide sialique et fucose) sont catalysées par des enzymes enrichies dans le réseau *trans*-Golgien [439-441]. Les RCPGs possèdent des

sucres complexes confirmant le passage de ces protéines par l'AG lors de leur transport vers la membrane plasmique.

Certaines protéines acquièrent également un deuxième type de glycosylation lors de leur passage dans l'AG. La O-glycosylation est initiée par une famille d'environ 20 enzymes nommés GalNac-Ts qui catalysent l'ajout de N-acetyl-galactosamine sur des résidus sérines ou thréonines [442]. Plusieurs glycosyltransferases agissent ensuite pour créer des sucres complexes [443]. Les fonctions de cette modification ne sont pas très bien connues, mais elle semble jouer un rôle dans le transport intracellulaire de plusieurs protéines [444-446]. La présence de O-glycosylation a été détectée sur la rhodopsin de pieuvre [447], le β 1AR [448], le récepteur delta-opiacé [449], kappa-opiacé [450], le V2R [451], le CCR5 [452] et le récepteur B2 de la bradykinine [453], mais le rôle de cette modification dans la régulation des RCPGs demeure inconnu. L'appareil de Golgi contient également plusieurs enzymes catalysant la palmylation et les rôles de cette modification post-traductionnelle dans la régulation des RCPGs ont été discutés dans la section 1.6.

Lorsque les cargos arrivent dans le réseau trans-Golgien (TGN), ils sont séparés et emmagasinés dans des vésicules pour être transportés vers les endosomes (vésicules de clathrine), ramenés vers le reticulum endoplasmique (vésicules COPI) ou acheminés à la membrane plasmique [454]. La composition des transporteurs de protéines du TGN vers la membrane plasmique n'est pas très bien définie. Un modèle récent basé sur différentes études de microscopie propose que les cargos s'accumulent dans des domaines excluant les enzymes du Golgi et que ces domaines s'allongent sous l'action de moteur de kinesin pour former des tubules. Des réactions de fission le long de ces tubules forment et relâchent ensuite les transporteurs de cargos. Ces réactions de fission sont contrôlées par plusieurs molécules dont la protéine kinase D, le diacylglycerol, la dynamin et les protéines G hétérotrimériques [454] et pourraient donc être contrôlées par les RCPGs. Le transport des protéines de l'AG à la membrane plasmique semble également être un processus régulé par la présence de signaux sur les protéines cargos. La présence d'un motif di-acidique tyrosiné (YTDIE) dans la queue C-terminale du VSVG est nécessaire pour le recrutement du complexe adaptateur 3 (AP3) et son transport du TGN à la membrane plasmique [455]. Des résidus chargés positivement situés dans la région N-terminale cytoplasmique du canal potassique (Kir 2.1) sont nécessaires pour son export de l'AG [456]. La glycosylation et des

motifs dans les domaines transmembranaires peuvent aussi influencer l'export de l'AG de certaines protéines [446, 457-459]. Chez les RCPGs, la mutation d'un motif YS dans la région N-terminale des récepteurs α_{2A} -AR et α_{2B} -AR bloque le transport de ces récepteurs dans l'appareil de Golgi [460]. De plus, certains récepteurs olfactifs et des mutants du récepteur CCR5 et de l'opsin sont accumulés dans l'appareil de Golgi suggérant que l'export des RCPGs de cette organelle est régulé par des mécanismes qui sont pour l'instant inconnus [461-463]. Finalement, l'appareil de Golgi semble également posséder la capacité de reconnaître des protéines mal repliées et de les rediriger vers le RE pour être repliées ou dégradées par le ERAD [464, 465], ou de les transporter vers les endosomes pour être dégradé par les lysosomes ou les vacuoles [466, 467]. Les mécanismes impliqués dans le contrôle de qualité du Golgi ne sont pas très bien connus, mais lorsque des résidus polaires sont introduits dans les domaines transmembranaires de certaines protéines, elles sont ubiquitinées par une ubiquitin ligase transmembranaire résidente du Golgi (Tul1) et dégradées par les vacuoles [468].

Comme vous avez pu le constater dans ce chapitre, toutes les étapes de la voie de sécrétion sont étroitement régulées par une multitude de facteurs afin d'assurer un repliement adéquat et un transport précis des protéines vers les différents compartiments cellulaires. De plus, le fonctionnement précis de la plupart de ces mécanismes demeure mal défini et le rôle de plusieurs protéines impliquées dans ces processus est vague ou inconnu. Il est également possible que certaines protéines ont évoluées afin de contrôler spécifiquement la maturation de certaines familles de protéines. L'existence de chaperones ou de facteurs d'export spécifiques des RCPGs permettrait de contrôler spécifiquement l'expression à la membrane plasmique des récepteurs.

3. Chaperones et protéines d'export spécifiques des RCPGs

Une grande partie des processus décrits dans le chapitre précédent semblent être des mécanismes relativement généraux de maturation des protéines car ils affectent le repliement et le transport d'une grande variété de substrats. L'identification de facteurs qui influencent la maturation d'une protéine ou d'une classe de protéines de façon spécifique pourrait amener au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant de façon sélective le repliement et le transport de certaines protéines. L'importance thérapeutique des récepteurs couplés aux protéines G a déjà été décrite dans la première section. Dans cette section, je vais d'abord décrire des partenaires protéiques des RCPGs qui semblent posséder un rôle spécifique ou partiellement spécifique dans leur transport et décrire deux nouvelles classes de protéines identifiées lors de cette thèse.

3.1 Chaperones et facteurs d'export connus des RCPGs

Un nombre grandissant de protéines interagissant avec les RCPGs et qui influencent leur transport ont été identifiées dans les dernières années. Certaines de ces protéines sont des chaperones spécialisées agissant sur des RCPGs particuliers. Par exemple, NinaA et RanBP2 sont des homologues de la cyclophilin qui possèdent une activité peptidyl-prolyl cis-trans isomerase et ont un rôle de chaperone pour la rhodopsine de drosophile et de vertébrés [469, 470]. La rhodopsine interagit également avec HSJ1b, une chaperone de la famille Hsp40 localisée dans le cytosol et exprimée spécifiquement dans les neurones. La surexpression de cette protéine retient la rhodopsine dans le RE alors que HSJ1a n'a aucun effet [471]. La protéine d'interaction au récepteur de la dopamine de 78 kDa (DRiP78) est une protéine possédant 2 domaines transmembranaires qui fait partie de la famille des chaperones Hsp40, localisée dans le RE, dont la surexpression et la suppression de son expression endogène provoque la rétention dans le RE du D1R [402]. Cette protéine interagit avec le motif FxxxFxxxF qui est conservé chez les RCPGs et semble contrôler le transport d'autres RCPGs tels que l'AT1R, et le récepteur de l'adénosine A1 [136, 472]. Des mutants de la région C-terminale proximale (hélice 8) qui affectent le repliement du récepteur de l'adénosine A1 sont davantage retenus à l'intérieur de la cellule par la surexpression de DRiP78 que le récepteur sauvage, suggérant que DRiP78 pourrait détecter des problèmes de repliement dans cette région du récepteur [136]. DRiP78 servirait

également de chaperone pour la sous-unité γ des protéines G hétérotrimériques [473] et ne serait donc pas exclusivement spécifique aux récepteurs. Une étude récente démontre que la protéine contenant des domaines ankyrin répétés (ANKRD13C) favorise la biogénèse de plusieurs RCPGs (récepteur DP, TP α , β 2AR, CRTH2) en inhibant la dégradation des récepteurs nouvellement synthétisés [474]. Cette augmentation de l'expression ne se traduit cependant pas nécessairement par une augmentation du nombre de récepteurs à la membrane plasmique. En effet, les récepteurs DP et TP α , dont le processus de maturation est très peu efficace dans les cellules HEK293, sont davantage retenus dans le RE et éventuellement dégradés lorsqu'ANKRD13C est co-exprimé. Par contre, les récepteurs β 2AR et CRTH2, dont le transport à la membrane plasmique est très efficace dans ce système, ne sont pas retenus dans le RE par ANKR13C. Ces résultats suggèrent qu'ANKRD13C pourrait servir de chaperone moléculaire pour plusieurs RCPGs.

Certaines protéines, nommées protéines escortes, interagissent avec les récepteurs dans le RE et les accompagnent jusqu'à la membrane plasmique. Les RAMPs (Receptor-activity modifying proteins 1, 2 et 3) furent les premières protéines escortes identifiées pour un RCPG. Ces protéines possèdent un domaine transmembranaire, un domaine N-terminal extracellulaire et un court domaine C-terminale cytoplasmique, et sont nécessaires pour l'expression à la membrane plasmique du RCPG de classe B CRLR (calcitonin receptor-like receptor) [475]. Les RAMPs sont présents dans un complexe avec le CRLR à la surface et influencent ses propriétés de liaison de ligand. En effet, RAMP1 favorise la liaison du CGRP (calcitonin gene-related peptide) au récepteur, alors que RAMP 2 et 3 permettent la liaison de l'adrénomédulline [476]. Bien que les RAMPs puissent former des dimères, il semble qu'ils interagissent sous forme de monomères avec le CRLR [477]. RAMP1 et 3, mais pas RAMP 2, peuvent également favoriser l'expression à la surface du récepteur senseur de calcium, un RCPG de classe C [478]. Les RAMPs interagissent également avec plusieurs autres RCPGs de classe B mais ne semblent pas affecter l'expression à la membrane plasmique de ces récepteurs [479]. Le transport à la surface des récepteurs olfactifs peut aussi être favorisé par d'autres protéines possédant un domaine transmembranaire. Les protéines de transport de récepteur (RTP) 1 et 2 et la protéine d'augmentation de l'expression de récepteur 1 (REEP1) permettent le transport des récepteurs olfactifs à la membrane plasmique lorsqu'exprimés dans des fibroblastes [480]. De même, les protéines ODR-4 et ODR-8 sont nécessaires pour la localisation des

récepteurs olfactifs dans les cils des neurones olfactifs de *C. elegans* [481]. L'expression de RTPs et de REEPs peut également favoriser le transport d'un récepteur de goût (TAS2R16) dans un système hétérologue [482]. De plus, la protéine RTP4 diminue l'ubiquitination et la dégradation de l'hétérodimère mu-delta opiacé et favorise son expression à la membrane plasmique [483] démontrant que certaines protéines peuvent influencer la dimérisation des RCPGs. L'organe voméronasal contient des RCPGs de classe C qui sont des récepteurs de phéromones et qui requiert l'assistance de protéines M10 appartenant à la famille des molécules MHC de classe 1 [484]. La protéine MRAP (MC2-receptor accessory protein) interagit avec le récepteur de l'adrénocorticotropine (ACTH ou melanocortin 2) via son domaine transmembranaire et transporte ce récepteur du RE à la membrane plasmique [485]. De plus, des mutations dans MRAP ou le récepteur ACTH causent la même maladie héréditaire, la déficience familiale en glucocorticoïdes [486, 487]. Surprenamment, le récepteur melanocortin 5 qui est normalement transporté à la membrane plasmique dans les cellules HEK 293, est retenu dans le RE et son homodimérisation est diminuée lorsque MRAP est co-exprimé [488]. MRAP ne semble pas avoir d'effet sur le β 2AR. Les mécanismes par lequel les protéines escortes transmembranaires favorisent le transport à la membrane plasmique de RCPGs spécifiques sont inconnus.

Il existe plusieurs autres protéines qui influencent le transport des RCPGs, mais dont les mécanismes d'action sont également peu connus. La co-expression de la protéine p11 (calpactin ou chaîne légère de l'annexin II) augmente l'expression à la membrane plasmique du récepteur de la sérotonine 5-HT_{1B} dans les cellules COS-7 sans avoir d'effet sur le récepteur D1 de la dopamine [489]. De plus, des souris knock-out de cette protéine ont une réponse moindre pour des agonistes du récepteur 5-HT_{1B} et un phénotype de dépression [489]. p11 interagit spécifiquement et colocalise à la membrane plasmique avec le récepteur 5-HT_{1B} et non avec d'autres récepteurs de la sérotonine. Par contre, cette protéine favorise également le transport à la surface d'autres types de protéines transmembranaires tels que le canal sodium Nav 1.8 [490] et les canaux calciques TRPV5/6 [491]. ATBP50 (AT2-receptor binding protein of 50 kDa), qui possède une séquence homologue aux longues protéines de la matrice du Golgi (GM-130, GCP70, Golgin-160), est une protéine associée à la membrane de l'AG qui interagit avec la queue C-terminale du récepteur AT2. Des siRNA dirigée contre ATBP50 diminuent l'expression à la surface de l'AT2R [492].

Le récepteur pour la kinase C activée-1 (RACK1), une protéine d'échaffaudage cytoplasmique possédant plusieurs domaines WD40, est une autre protéine qui interagit avec la queue C-terminale de certains RCPGs et régule leur transport. La surexpression de RACK1 augmente l'expression à la surface de l'isoforme β du récepteur A2 de la thromboxane (TP β) alors que la suppression de son expression provoque la rétention dans le RE du TP β , du CXCR4 et de l'AT1R, sans affecter le β 2AR et le récepteur des prostaglandines D2 [493]. Cette étude démontre également que les fonctions de la protéine kinase C (PKC) et de la dynamine sont nécessaires pour l'augmentation à la surface du TP β suggérant que ces protéines jouent un rôle dans le transport antérograde de ce récepteur. RACK1 a aussi été démontré pour influencer l'internalisation du récepteur M2 muscarinique et interagit avec une multitude de protéines influençant ainsi une grande variété de processus cellulaires.

La sélectivité de certaines protéines d'export pour des RCPGs particuliers est aussi observée pour la protéine GEC1 qui interagit avec le récepteur κ -opioïde et non avec les autres récepteurs opiacés. GEC1 appartient à la famille de protéines associées aux microtubules, dont les membres sont impliqués dans les processus de fusion membranaire et de transport intracellulaire, et la liaison de GEC1 à la tubulin contribue à l'augmentation de l'expression à la surface du récepteur κ OR lorsque ces 2 protéines sont co-exprimées [494]. De plus, GEC1 interagit également avec NSF (le facteur sensible au n-ethylmaléimide), une ATPase impliquée dans les processus de fusion membranaire [494]. GEC1 interagit avec la séquence FPXXM situées dans la région proximale de la queue C-terminale du κ OR. Cette séquence est également retrouvée chez le récepteur de la prostaglandin EP3 et GEC1 augmente l'expression de ce dernier [495]. Une surface hydrophobe chez GEC1 est responsable de cette interaction ce qui suggère que cette protéine pourrait aussi avoir un effet de chaperone sur le récepteur. La protéine multifonctionnelle gC1q-R interagit avec une séquence riche en arginine des récepteurs V2R et α_{1B} -AR et ces derniers sont retenus à l'intérieur de la cellule lorsque gC1q-R est surexprimé [496, 497]. La peroxydase peroxiredoxin-4 (Pxr-4) interagit avec le récepteur de la thromboxane A2 et sa surexpression retient le récepteur dans le RE et provoque la dégradation du récepteur dans des conditions de stress oxydatif [498].

Plusieurs protéines du cytosquelette semblent influencer le transport des RCPGs. Les différentes isoformes de la protéine Homer 1 (1a, 1b et 1c) interagissent avec les récepteurs metabotropiques du glutamate (mGluR1a et mGluR5) et affectent différemment l'expression à la membrane plasmique de ces récepteurs [499-501]. Homer1a est une protéine d'échafaudage qui peut former un complexe avec le récepteur mGlu et la protéine ProSAP1 (Proline-rich synapse-associated proteins) qui elle peut interagir avec le cytosquelette suggérant un mécanisme d'action possible de Homer1 sur le transport de mGluR1 et mGluR5 [502]. La sous-unité M des neurofilaments, un composant majeur du cytosquelette des neurones, interagit avec la 3^e boucle intracellulaire du D1R et provoque l'accumulation intracellulaire de ce récepteur [503]. Des membres de la famille de protéines du cytosquelette 4.1 peuvent également interagir avec la 3^e boucle intracellulaire et la queue C-terminale de certains RCPGs et contrôler leur expression à la membrane plasmique [504-506]. La filamine A est une autre protéine qui interagit avec la 3^e boucle intracellulaire des récepteurs D2R et D3R, mais qui n'interagit pas avec les récepteurs D1, D4, D5, muscarinique M1 et β 2AR [507]. L'expression de cette protéine de liaison à l'actine favorise l'expression à la surface des récepteurs D2 et D3. Finalement, la queue C-terminale de la rhodopsine interagit avec Tctex-1, une chaîne légère de la dynéine, une protéine moteur des microtubules [508]. Cette interaction est nécessaire pour la liaison aux microtubules de vésicules post-Golgi contenant la rhodopsine et des mutations naturelles de ce récepteur qui bloquent l'interaction avec Tctex-1 provoquent la rétention intracellulaire du récepteur et la maladie rétinite pigmentaire.

Comme vous pouvez le constater, bien que la recherche de protéines contrôlant la maturation des récepteurs n'ait été initiée que très récemment, plusieurs protéines de nature très variées influençant le repliement et le transport des RCPGs ont été identifiées au cours des dernières années. Ceci suggère que de façon similaire aux processus contrôlant l'activité des RCPGs à la membrane plasmique, les mécanismes régulant la synthèse et le transport à la surface des récepteurs impliquent une multitude de facteurs cellulaires. De plus, une étude à grande échelle par spectrométrie de masse de la composition protéique du reticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi révèle plus de 1400 protéines, dont 345 qui ne sont pas caractérisées [509]. Ceci suggère que plusieurs autres protéines n'ayant pas été identifiées jusqu'à présent pourraient participer à la biogénèse et au transport des RCPGs. Le développement de nouvelles techniques de détection d'interaction protéine-

protéine pourrait potentiellement permettre l'identification de nouveaux partenaires des RCPGs. Les études contenues dans cette thèse décrivent comment l'utilisation de la technique de Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) a permis l'identification de deux protéines préalablement non-caractérisées qui sont résidentes de la voie de sécrétion et interagissent avec les RCPGs pour influencer leur transport à la membrane plasmique. Dans les deux prochaines sections, je vais décrire ces protéines nommées: homologue humain de cornichon 4 (CNIH4) et protéine transmembranaire 9 (TMEM9). Je vais terminer en décrivant brièvement la technique de BRET.

3.2 Famille de protéines cornichon

Les protéines cornichon appartiennent à une famille de protéines transmembranaires conservées de la levure aux mammifères qui semblent jouer un rôle important dans le transport intracellulaire. Je vais décrire dans cette section la découverte de ces protéines et les caractéristiques des différents membres de cette famille chez différents organismes.

3.2.1 Cornichon chez la drosophile

Le premier membre de la famille des protéines cornichons a été identifié chez la drosophile. Le nom cornichon provient du fait que la délétion du gène codant pour cette protéine résulte en la formation d'oocytes allongés ne possédant pas d'appendices dorsaux, un phénotype similaire (oocytes en forme de cornichon) à la délétion du gène *gurken* (*grk*), qui signifie cornichon en allemand [510]. Une étude plus poussée a révélée que les phénotypes des oocytes en formation produits par la délétion de *cni* sont tout à fait identiques à ceux produits par la délétion de *grk*, l'homologue de TGF α chez la drosophile, ou de *torpedo* (*top*), l'homologue du récepteur EGF de la drosophile [511]. Cette étude démontrait également que *cni* n'est pas requis pour la transcription de *grk* et la stabilité, la localisation et la traduction de l'ARN de *grk*. Par contre, la protéine *grk* se retrouve davantage localisée dans le cytoplasme plutôt qu'à la membrane plasmique lorsque *cni* est absent ou muté suggérant que cette dernière pourrait influencer le transport de *grk* [511, 512]. Ensuite, il fut observé que *grk* colocalise avec dSec23p dans les sites de sortie du RE, alors que des allèles mutants de *cni* provoquent la diffusion de *grk* dans le RE et son exclusion des sites de sortie du RE [513]. Ces résultats suggèrent que *cni* permet de recruter *grk* aux sites de sortie du RE. De plus, la présence de sucres complexes sur *grk* modifiés

par les glycosyltransferases de l'appareil de Golgi nécessite *cni* confirmant que cette dernière est essentielle pour la sortie du RE de *grk* [514]. La fusion d'un domaine connu pour interagir avec les vésicules COPII sur *grk* permet de compenser partiellement la perte de *cni* et la fusion de la boucle intracellulaire de *cni*, qui serait responsable de l'interaction avec les protéines de COPII, à *grk* permet aussi de compenser pour la perte de *cni* [514]. Ces résultats suggèrent un modèle où *cni* agit comme récepteur-cargo de *grk* en recrutant ce dernier dans les vésicules COPII. Ensuite, la boucle luminale de *cni* peut lier directement la région adjacente du domaine transmembranaire de *grk* [514]. De plus, comme le domaine transmembranaire est nécessaire pour localisation de *grk* à la membrane plasmique et que plusieurs mutants à l'intérieur ou très près du TM de *grk* mènent à une localisation cytoplasmique de cette protéine, il a été suggéré que *grk* et *cni* interagissent aussi via leurs domaines transmembranaires [515].

Il existe chez la drosophile un deuxième gène similaire à *cni* qui se nomme *cni-related* (*cnir*) [514]. Les deux protéines possèdent 28.5 % d'identité et 43.1 % de similarité au niveau de leur séquence d'acides aminés et possèdent une structure similaire avec trois domaines transmembranaires, un domaine N-terminal cytoplasmique et un domaine C-terminal luminal. *Cnir* est incapable de lier *grk* et ne peut secourir le phénotype de signalisation déficiente de *grk* dans les oocytes contenant des mutants de *cni* [514]. Ces deux protéines ne possèdent donc pas des fonctions redondantes dans le transport de *grk*. De plus, contrairement aux mutants de *grk*, la perte de la fonction de *cni* cause également plusieurs phénotypes dans les tissus somatiques de la drosophile adulte suggérant que *cni* possède d'autres rôles que le transport de *grk*. La surexpression de *cnir* peut sauvegarder certains de ces phénotypes indiquant qu'il existe une redondance entre les deux protéines pour certaines fonctions cellulaires. Pour l'instant, aucun autre cargo de cornichon n'a été identifié chez la drosophile, mais des études effectuées chez la levure indiquent que cette famille de protéines pourrait favoriser l'export du RE de plusieurs substrats.

3.2.2 Cornichons chez la levure

La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède deux homologues de cornichon nommés erv14p et erv15p (ER-vesicle proteins of 14 kD or 15 kD) qui ont d'abord été identifiés comme des composantes de vésicules COPII purifiées [516, 517]. Erv14p est localisé dans le RE, les vésicules COPII et l'appareil de Golgi [518]. La délétion d'erv14p

provoque la rétention dans le RE d'axl2p, une glycoprotéine transmembranaire, mais n'affecte pas le transport de gas1p, une protéine ancrée à la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI), et de la protéine carboxypeptidase, suggérant qu'erv14p n'est pas nécessaire pour le transport de toutes les protéines employant la voie de sécrétion [518]. La délétion d'erv14p provoque un phénotype similaire à celle d'axl2p chez les cellules haploïdes, c'est-à-dire un défaut de la sélection du site de bourgeonnement. La délétion d'erv15p, qui partage 63 % d'identité d'acides aminés avec erv14p, ne reproduit pas ni n'accentue le phénotype de la délétion d'erv14p indiquant que ces deux protéines ne possèdent pas une fonction redondante sur le transport d'axl2p. De façon similaire à ce qui est observé chez la drosophile pour cornichon, erv14p interagit directement avec axl2p et forme un complexe avec les sous-unités des vésicules COPII (Sar1 et Sec23/24) permettant de favoriser l'incorporation d'axl2p dans ces vésicules [398]. Pour l'instant, on ne sait pas si erv14p interagit directement avec les sous-unités de COPII ou par l'intermédiaire d'une autre protéine. Un alignement de séquence de la boucle cytoplasmique de cornichon de différentes espèces révèle la présence de plusieurs résidus conservés et la mutation combinée de certains de ces résidus inhibe la liaison d'erv14p aux sous-unités de COPII [398]. De plus, la surexpression de ce mutant provoque la formation d'un complexe axl2p/erv14p retenu dans le RE. Le mécanisme d'action des protéines cornichons semble donc conservé entre les espèces.

La délétion d'erv14p provoque un défaut de sporulation chez les cellules diploïdes, un phénotype qui n'est pas relié à un défaut du transport d'axl2p, suggérant qu'erv14p pourrait favoriser le transport d'autres protéines. En effet, le défaut de sporulation est causé par la rétention dans le RE de la protéine Sma2p en absence d'erv14p [519]. Sma2p est une protéine possédant quatre domaines transmembranaires. Contrairement à ce qui était observé avec axl2p, la surexpression d'erv15p est capable de secourir le défaut de sporulation causé par l'absence d'erv14p et la délétion combinée de ces protéines accentue le phénotype. Enfin, une étude récente révèle que plusieurs protéines transmembranaires (gap1p, hxt1p, hxt2p et mid2p) sont retenues dans le RE en absence d'erv14p alors que d'autres protéines ne sont pas affectées [520]. Étonnamment, gap1p possède dans sa région C-terminale un motif d'export di-acidique essentiel pour l'incorporation de gap1p dans les vésicules COPII [521]. La présence de ce motif n'est semble-t-il donc pas suffisant pour

son transport hors du RE et gap1p requiert également la présence d'une protéine adaptatrice telle que erv14p.

3.2.3 Cornichons chez les mammifères

Quatre membres de la famille des protéines cornichons ont été identifiés chez les mammifères. Chez l'homme, ces protéines sont nommées CNIH1, CNIH2, CNIH3 et CNIH4. CNIH1 partage 32 % d'identité avec erv14p et 66 % avec *cni* de la drosophile. Remarquablement, la surexpression de CNIH1 permet de secourir le défaut de bourgeonnement observé dans les souches de levures où erv14p est absent, suggérant que la fonction de ces protéines est conservée de la levure à l'homme [522]. CNIH1 est localisé dans le RE, aux sites de sortie du RE et dans l'appareil de Golgi. De plus, CNIH1 interagit avec la forme immature de TGF α dans les cellules de mammifères et la surexpression de CNIH1 retient TGF α dans le RE [522]. Par contre, CNIH1 n'interagit pas avec d'autres protéines transmembranaires de la voie de sécrétion telles que le récepteur de la transferrine, le récepteur EGF, sec61 β et gp130 et n'affecte pas le transport à la membrane plasmique de gp130. Ceci indique une certaine sélectivité dans la fonction de transport de protéines transmembranaires par CNIH1. Le mRNA de CNIH1 est exprimé à un niveau élevé dans le cœur, le foie, les muscles squelettiques, le pancreas, les testicules, la glande thyroïde, la rate et l'appendice alors qu'il est peu exprimé dans le cerveau, les reins, les poumons, les ovaires, l'estomac et le thymus indiquant que son expression est tissu spécifique [523].

CNIH2 et CNIH3 partagent 66 % et 68 % respectivement d'identité d'acides aminés avec CNIH1 et sont donc très similaires. La principale différence entre CNIH2/3 et CNIH1 est la présence d'une séquence de 15 acides aminés supplémentaires dans la boucle luminale entre le TM1 et le TM2 chez CNIH2/3 qui n'est pas présente chez CNIH1 ou CNIH4. Une étude de spectrométrie de masse dans le cerveau de rat a révélé que CNIH2 et CNIH3 font partis d'un complexe avec les récepteurs du glutamate de type AMPA (AMPA), des canaux ioniques activés par le neurotransmetteur glutamate [524]. De plus, CNIH2/3 favorisent l'expression à la surface des AMPARs et accompagnent les récepteurs AMPA jusqu'à la membrane plasmique où ils modifient les propriétés d'ouverture du canal

en ralentissant leur cinétique de désensibilisation [524]. CNIH2 et CNIH3, contrairement à CNIH1, pourraient donc accompagner leur cargo jusqu'à la membrane plasmique. De plus, CNIH2 inhibe la resensibilisation des AMPARs par la sous-unité TARP γ -8 (protéines transmembranaires régulatrices des récepteurs AMPA). Cet effet n'est pas reproduit par CNIH1 indiquant que ces deux protéines ne sont pas redondantes dans le contrôle des récepteurs AMPA [525]. CNIH2 augmente l'efficacité d'un antagoniste non-compétitif des AMPAR indiquant qu'il pourrait affecter la pharmacologie du canal [526].

CNIH4, un des nouveaux partenaires des RCPGs identifié dans cette thèse, ne partage que 38 % d'identité avec CNIH1 et diffère donc davantage des trois autres cornichons. En fait, CNIH4 possède beaucoup plus d'homologie avec *cni-related* (51 % identiques, 82 % similaires), l'autre protéine cornichon chez la drosophile dont la fonction n'est pas caractérisée. Le premier article de cette thèse, qui démontre un rôle de CNIH4 dans le transport des RCPGs, représente la première caractérisation fonctionnelle de cette protéine. Comme les autres membres de la famille cornichon, cette protéine de 139 acides aminés possède 3 domaines transmembranaires potentiels ainsi que de très courtes régions N-terminale et C-terminale. Elle ne possède pas de domaine fonctionnel connu ni de sites consensus de modifications post-traductionnelles. L'ARNm de cette protéine est exprimé dans une grande variété de tissus incluant la moelle épinière, le cerveau, le cortex, le cœur, les muscles lisses et squelettiques, les reins, les poumons, le pancréas, la prostate la glande thyroïde, les ovaires et les testicules [527]. La région nécessaire pour l'interaction avec les vésicules COPII d'erv14p semble conservée chez CNIH4 suggérant un rôle possible de CNIH4 dans le recrutement de protéines dans ces vésicules de transport. Il est également possible que CNIH4 agisse de concert avec d'autres protéines pour influencer le transport intracellulaire. Dans le deuxième article de cette thèse, nous avons identifiés une protéine qui interagit avec les RCPGs et CNIH4 et coopère avec CNIH4 pour influencer le transport des RCPGs. Cette protéine se nomme protéine transmembranaire 9 (TMEM9).

3.3 Protéine transmembranaire 9

TMEM9 est une protéine transmembranaire récemment identifiée qui possède un peptide signal (résidus 1 à 20), une région N-terminale luminale glycosylée (résidus 21 à 89), un domaine transmembranaire (résidus 90 à 110) et une queue C-terminale cytoplasmique (résidus 111 à 183). La recherche de banques de données d'homologie de

séquence révèle la présence d'orthologues de TMEM9 chez plusieurs espèces dont la souris (mTMEM9, 95 % d'identité d'acides aminés), *takifugu rubripes* (trTMEM9, 76 % d'identité), *Drosophila melanogaster* (31 % d'identité) et *Caenorhabditis elegans* (28 % d'identité) [528]. La région C-terminale de ces protéines est particulièrement conservée suggérant que ce domaine joue un rôle important dans la fonction de TMEM9. La région C-terminale contient également un site potentiel de phosphorylation (S137). En plus des sites de glycosylations, on retrouve dans la région N-terminale trois domaines riches en cystéines conservés, qui pourraient jouer un rôle dans le repliement protéique, l'interaction avec d'autres protéines ou l'oligomérisation. La nature des sucres (simples ou matures) retrouvés sur TMEM9 n'est pas connu pour l'instant. L'analyse de l'expression de l'ARNm de TMEM9 suggère que cette protéine est hautement exprimée dans la glande surrénale, la glande thyroïde, les testicules, les ovaires, la prostate et à un moindre degré dans la colonne vertébrale (moëlle épinière), le gros et le petit intestin, la trachée, l'estomac, le thymus et la rate [528]. De plus, le mRNA de TMEM9 est surexprimé dans les cellules de carcinomes hépatiques [529]. La fusion de la protéine fluorescente verte (GFP) à TMEM9 révèle qu'en plus d'être localisée dans le RE, TMEM9 est aussi présente dans les endosomes tardifs et les lysosomes [528]. La fonction de cette protéine était inconnue avant les travaux effectués dans cette thèse.

TMEM9 possède également un homologue nommé TMEM9B chez l'homme avec lequel il partage 57 % d'identité d'acides aminés. TMEM9B est essentiel pour la signalisation de NF- κ B et la production de cytokines en réponse à divers signaux inflammatoires, mais le mécanisme par lequel il agit est inconnu [530].

3.4 Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)

Le transfert non-radiatif d'énergie entre une molécule donneuse et une molécule acceptrice d'énergie est utilisé depuis plusieurs années afin d'étudier les interactions protéines-protéines. Lorsque le donneur d'énergie est fluorescent, il est excité par un faisceau lumineux à une longueur d'onde donnée et transmet de l'énergie à une autre longueur d'onde qui peut être absorbée par la molécule acceptrice. On parle alors de transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET). Lorsque le donneur d'énergie est un enzyme bioluminescent, la luciférase de *renilla*, qui dégage de l'énergie par oxydation de son substrat, le transfert d'énergie est alors nommé BRET, pour transfert d'énergie de

résonance de bioluminescence. L'efficacité du transfert d'énergie dépend du chevauchement des spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur, de l'orientation des dipôles donneur-accepteur et de la distance qui les sépare, qui doit être inférieure à 100 Å pour que le transfert puisse avoir lieu [531]. L'efficacité du transfert est inversement proportionnelle à la puissance 6 de la distance [532] ce qui fait du transfert d'énergie de résonance un excellent système pour l'étude d'interactions protéiques. Donc, un signal de BRET ou de FRET généré par une protéine fusionnée à un donneur d'énergie et une autre protéine fusionnée à un accepteur d'énergie est le reflet de la proximité entre ces deux protéines (Figure 9).

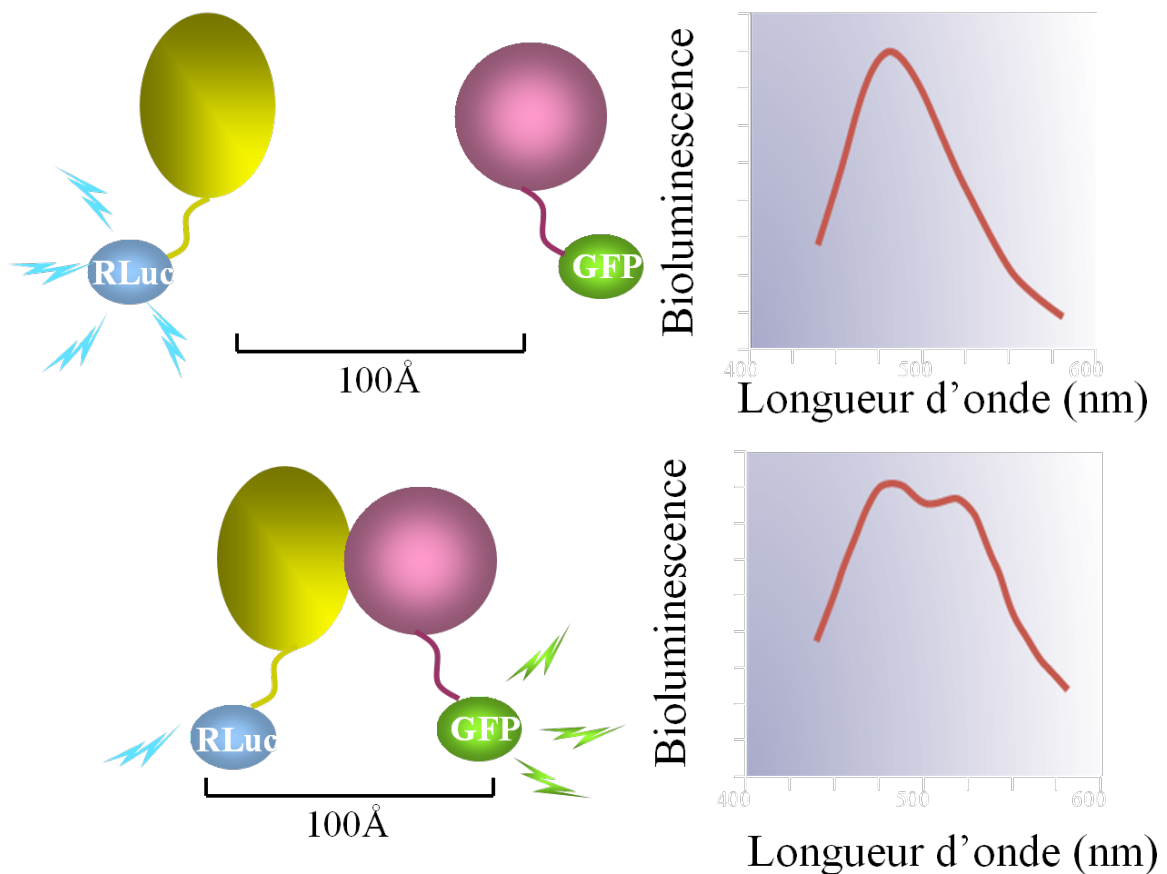


Figure 9. Représentation schématique du BRET. En haut, les protéines fusionnées à la RLuc et à la YFP ne sont pas à proximité et le spectre d'émission correspond à celui de la luciférase. En bas, les deux protéines sont à proximité et il y a transfert d'énergie de la RLuc à la YFP et l'apparition d'un deuxième pic d'émission.

Cette proximité peut être causée par une interaction directe entre les deux protéines ou par une interaction indirecte par l'intermédiaire de la formation d'un complexe avec

d'autres protéines. Dans certains cas, la concentration des deux protéines dans un compartiment cellulaire pourrait favoriser des collisions aléatoires entre ces molécules et mener à la production d'un signal de BRET ou de FRET non-spécifique. Il existe différentes façons de distinguer entre interactions spécifiques et non-spécifiques qui seront décrites dans la discussion.

Les principaux avantages du BRET sur le FRET sont liés à l'élimination des problèmes associés au photoblanchiment du signal, à l'auto-fluorescence des cellules et à l'excitation simultanée du donneur et de l'accepteur par le faisceau lumineux. En effet, contrairement au FRET, le BRET ne requiert pas de stimulation lumineuse qui peut causer les problèmes mentionnés ci-dessus.

Objectifs de la thèse

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent une classe importante de cibles pharmacologiques et sont par conséquent l'objet de multiples recherches afin de comprendre leur mécanisme de régulation. Cependant, bien que l'expression à la membrane plasmique de la majorité des RCPGs soit essentielle à leurs fonctions, la synthèse des récepteurs dans le reticulum endoplasmique et leur transport jusqu'à la membrane plasmique sont des aspects de leur fonctionnement qui étaient pratiquement ignorés jusqu'à très récemment. Bien qu'au cours des dernières années, plusieurs laboratoires se sont mis à la recherche de facteurs contrôlant le transport antérograde des RCPGs, les mécanismes qui régissent le repliement, la maturation et le transport des récepteurs du reticulum endoplasmique à la membrane plasmique sont encore imprécis.

L'objectif principal de cette thèse était donc d'augmenter notre compréhension des mécanismes permettant l'expression à la membrane plasmique des RCPGs. Pour ce faire, nous voulions d'abord identifier des nouveaux partenaires protéiques des récepteurs couplés aux protéines G impliqués dans la maturation et/ou le transport des récepteurs jusqu'à la surface. Nous avons donc effectué un crible protéomique utilisant la technologie de BRET (transfert d'énergie de résonance de bioluminescence), qui permet l'étude d'interactions protéines-protéines dans les cellules vivantes. Cela nous permettait de remplir un second objectif qui était le développement et la validation de l'essai de criblage protéomique de BRET pour l'identification de nouveaux partenaires des RCPGs. Nous avons mesuré le BRET entre le récepteur CCR5 fusionné à la luciférase et une librairie d'open reading frames (ORF) fusionnés à la protéine fluorescente jaune (YFP) qui codent pour des protéines non-caractérisées localisées dans la voie de sécrétion (RE, Golgi) [533]. Ces protéines étant localisées dans les compartiments cellulaires responsables de la synthèse et du transport des RCPGs, la probabilité d'identifier des partenaires protéiques des récepteurs impliqués dans leur repliement et/ou leur transport serait probablement très élevée. Le récepteur CCR5 a été choisi étant donné l'importance de sa localisation à la membrane plasmique dans le processus d'infection par le VIH.

Après avoir identifié des nouveaux partenaires protéiques potentiels des RCPGs localisés dans la voie de sécrétion, nous voulions ensuite évaluer la spécificité de ces

protéines envers les RCPGs, déterminer lesquelles jouent un rôle dans la maturation des récepteurs et si possible déterminer par quels mécanismes ou à quelle(s) étape(s) (repliement, dégradation, transport) elles influencent l'expression à la membrane plasmique des RCPGs.

Étant donné que la majorité des protéines impliquées dans les processus de repliement et de transport fonctionnent en complexes, nous voulions également déterminer si certaines des protéines identifiées pouvaient collaborer pour influencer le transport des RCPGs.

Afin d'améliorer la compréhension des mécanismes de régulation de la maturation des RCPGs, nous avons également contribué à une étude portant sur le rôle de la N-glycosylation dans la maturation et le transport de récepteurs V2 de la vasopressin mutants (annexe, article 3).

En plus de développer une nouvelle application de la technique de BRET pour le criblage d'interactions protéiques, nous avons également contribué à une étude visant le développement de nouvelles configurations de BRET constituées de protéines fluorescentes de différentes couleurs et permettant de mesurer plusieurs interactions indépendantes dans les mêmes cellules (annexe, article 4).

RÉSULTATS

Article 1 :

CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and control their export from the endoplasmic reticulum

Etienne Sauvageau, Driss M. Rochdi, Morad Oueslati, Fadi F. Hamdan, Yan Percherancier, Jeremy C. Simpson, Rainer Pepperkok, and Michel Bouvier

Résumé

Les mécanismes moléculaires contrôlant la synthèse des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dans le reticulum endoplasmique ainsi que leur transport jusqu'à la membrane plasmique sont très peu caractérisés. Dans cette étude, un crible protéomique basé sur la technologie de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) a permis l'identification de nouveaux partenaires des RCPGs localisés dans la voie de sécrétion. Nous avons ensuite démontré qu'une de ces protéines, l'homologue humain de cornichon 4 (CNIH4), est localisée dans les régions précoces de la voie de sécrétion (RE et ERGIC) et interagit sélectivement avec des récepteurs des trois familles de RCPGs. La surexpression de cette protéine préalablement non-caractérisée, mène à la rétention intracellulaire et à la dégradation des récepteurs par le protéasome. La suppression de l'expression endogène de CNIH4 provoque également une diminution du transport du récepteur à la surface cellulaire et la surexpression de CNIH4 à de faibles niveaux favorise la maturation d'un récepteur mutant normalement retenu dans le RE, indiquant que cette protéine joue un rôle positif dans l'export du RE des RCPGs. Consistant avec le rôle proposé des homologues de cette protéine chez la levure et la drosophile, CNIH4 est associée avec Sec23, une protéine de l'enveloppe des vésicules COPII, suggérant que CNIH4 pourrait servir de récepteur-cargo favorisant le recrutement des RCPGs dans les vésicules COPII qui sont responsables du transport des protéines du RE à l'appareil de Golgi.

CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and control their export from the endoplasmic reticulum

Etienne Sauvageau¹, Driss M. Rochdi¹, Morad Oueslati¹, Fadi F. Hamdan¹, Yan Percherancier¹, Jeremy C. Simpson², Rainer Pepperkok², and Michel Bouvier¹

¹Institute for research in Immunology and Cancer and Department of Biochemistry, Université de Montréal,

²European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Germany.

Present address:

D. M. Rochdi: The Montreal Heart Institute Coordinating Center, 4100 Molson St., Suite 400,

Montreal (Qc) H1Y 3N1

M. Oueslati: Catalent Pharma Solutions, Steinbeisstrasse 2, D-73614 Schorndorf, Germany

F.F. Hamdan: Centre of Excellence in Neuroscience of Université de Montréal, Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal (Qc) H3T 1C5, Canada

Y. Percherancier: CNRS, UMR5218 Laboratoire de l'intégration, du matériau au système (IMS),

1 av du Dr Albert Schweitzer, BP 99, 33402 Talence CEDEX, France

J. C. Simpson: School of Biology and Environmental Science, UCD, Dublin 4, Ireland

Corresponding author:

Michel Bouvier

IRIC, Université de Montréal

C.P. 6128 Succursale Centre-ville

Montréal (Qc) H3C 3J7, Canada

Tel: 514-343-6319

Fax: 514-343-6843



Short Title: CNIH4 control GPCR export from the ER

Number of characters: 38, 855

Abstract

The molecular mechanisms regulating G protein-coupled receptors (GPCRs) trafficking from their site of synthesis in the endoplasmic reticulum (ER) to their site of function (the cell-surface) are relatively unknown. Using a bioluminescence resonance energy transfer based proteomic screen, we identified a novel GPCR-interacting protein; the human cornichon homolog 4 (CNIH4). This previously uncharacterized protein is localized in the early secretory pathway where it interacts with members of the 3 family of GPCRs. Over-expression of CNIH4 caused the intracellular retention and proteasomal degradation of different GPCRs. Downregulation of endogenous CNIH4 also resulted in the intracellular trapping of the receptors. Moreover, over-expression of CNIH4 at low levels rescued the maturation and cell-surface expression of an intracellularly retained mutant receptor, confirming the positive role of CNIH4 in GPCR trafficking. CNIH4 was also found to coimmunoprecipitate with Sec23, a component of the COPII coat complex responsible for ER export. Together, our data suggest that CNIH4 acts as a cargo-sorting receptor recruiting GPCRs into COPII vesicles.

Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent a large family of cell-surface receptors sharing a common seven transmembrane domains topology. GPCRs signalling regulate a great variety of physiological processes and cell functions (Allen and Roth, 2011; Dong et al., 2008; Dupre et al., 2006). Once at the cell surface, GPCRs are tightly regulated by a myriad of mechanisms including phosphorylation, palmitoylation, ubiquitination, β -arrestin recruitment and endocytosis by clathrin-dependent or clathrin-independent processes (Hanyaloglu and von Zastrow, 2008; Moore et al., 2007; Qanbar and Bouvier, 2003). GPCR signalling regulation has been extensively studied during the last decade and several proteins involved in these processes have been identified and characterized (Ritter and Hall, 2009). However, relatively little is known about the mechanisms regulating the trafficking of GPCRs from the endoplasmic reticulum (ER) to the cell surface. GPCR life cycle begins by their synthesis, folding and assembly at the ER. The well folded receptors are packaged into COPII-coated vesicles at the ER exit site (Dong et al., 2008; Dupre et al., 2006) and traffic through the ER-Golgi intermediate complex (ERGIC), the Golgi apparatus and finally the trans-Golgi network (TGN) before their final delivery to the plasma membrane (Dong et al., 2007). Throughout this process, receptors undergo post-translational modifications involving successive additions and modifications of carbohydrates that can be used as markers of the maturation state of the receptors.

Although relatively little is known about the molecular process controlling the folding and the trafficking of GPCRs along the secretory pathway, the export from the ER has been shown to represent the limiting step in the maturation and cell surface trafficking (Ulla et al. 2000). Several chaperones and ER export proteins have been proposed to participate to the GPCR forward trafficking. For instance, a number of general molecular chaperones, including calnexin, calreticulin and BiP, have been shown to interact with several GPCRs and to play a role in the early steps of receptor folding and ER export (Achour et al., 2008). In addition, an increasing number of specialized chaperones and export proteins have been proposed to interact and regulate the export in a receptor-specific manner, interacting with only one or a subfamily of GPCRs (Achour et al., 2008). Well characterized examples of these proteins include RAMP-1 that assist the trafficking of the calcitonin receptor-like receptor (Hilairiet et al., 2001; McLatchie et al., 1998), MRAP that

is needed for the cell surface targeting of the MC2 melanocortin receptor (Cooray et al., 2008; Metherell et al., 2005), as well as REEP for the odorant and taste receptors (Behrens et al., 2006; Saito et al., 2004). The DnaJ/HSP-40 class protein, DriP-78, has also been proposed to play a chaperone-like role for the dopamine D1, AT1 angiotensin, M2 muscarinic and A1 adenosine receptors (Bermak et al., 2001; Leclerc et al., 2002; Malaga-Dieguez et al., 2010), suggesting that it may be a specialized chaperone for many GPCRs as its documented interactions site is well conserved among the GPCR family (Dong et al., 2007). However the finding that it can also promote the assembly of γ and β subunits of the G proteins (Dupre et al., 2007) indicates that it may be a more general chaperone. Despite the interest generated by these studies, relatively little is known about the machinery involved in the ER-export of GPCRs.

In an effort to identify proteins that could be involved in GPCR trafficking, we designed a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-based assay to screen a library consisting of 109 ER/Golgi/plasma membrane-resident open-reading frames (ORFs) for which little functional annotations were available (Simpson et al., 2000). Among the proteins found to interact with the chemokine receptor CCR5, used as bait, we identified the human cornichon homolog 4 (CNIH4). Earlier studies in *D. melanogaster* and *S. cerevisiae* showed that cornichon homologues are integral membrane proteins that reside in vesicles budding from ER exit sites and direct secretory cargo to the cell surface (Bokel et al., 2006; Powers and Barlowe, 1998; Powers and Barlowe, 2002). We found that CNIH4 interacts with all GPCRs tested, including members of the three major subfamilies. Overexpression and knock-down of CNIH4 combined with immunofluorescence and BRET assays indicate that CNIH4 is an ER/ERGIC resident protein that promotes the exit of GPCRs from the early secretory pathway, most likely through interactions with the COPII component protein Sec23.

Results

Identification of ER-localized CCR5 interactors using BRET-based screening

In order to identify new proteins involved in the quality control and/or trafficking of GPCRs, we set up a BRET-based screening assay that detects molecular proximity between a protein fused to the bioluminescent energy donor, the *Renilla* luciferase (Rluc), and a second protein fused to the fluorescent energy acceptor, the yellow fluorescent protein (YFP) (Hamdan et al., 2006). For the purpose of the screen, a GPCR, the chemokine CCR5 receptor, was fused to Rluc at its C-terminus and used as bait. It has previously been shown that the CCR5-Rluc retains its normal signalling and trafficking properties (Issafras et al., 2002). As preys, we took advantage of a library of proteins generated by the LIFEdb Project (Mehrle et al., 2006; Simpson et al., 2000) where ~1200 uncharacterized ORFs were subcloned in fusion with eYFP at their C-terminus in order to determine their cellular localization. We used a subset of 109 eYFP-fused proteins that were found mostly in the secretory pathway (ER and Golgi) and thus are more likely to be involved in GPCRs trafficking. CCR5-Rluc and each of the individual eYFP-fused proteins were transiently co-transfected in HEK293 cells and the BRET signal was measured. The background signal resulting from random collisions between the energy donor- and acceptor-fused proteins was determined in cells co-expressing soluble YFP and CCR5-Rluc and the BRET signal obtained used as the cut-off value to identify positive hits. CCR5-eYFP was also included as a positive control for the experiment since it is known to exist as a constitutive homodimer (Issafras et al., 2002). As shown in Fig. 1A, 18 of the 109 preys generated BRET signals above the cut-off and were considered for further validation.

Confirmation of the CCR5 interacting proteins by co-immunoprecipitation

We then used a biochemical approach to confirm the hits obtained in the BRET screen. Each positive hit was cotransfected individually with the CCR5-Rluc in HEK293 cells. The preys were then immunoprecipitated using an antibody against YFP. The presence of CCR5 in the immunoprecipitate was assessed by measuring the luminescence signal. As can be seen in Fig. 1B, 6 of the 18 BRET hits were co-immunoprecipitated with CCR5-Rluc, yielding a 33% confirmation hit rate. The metabotropic gamma aminobutyric

acid receptor 1 (GABAbR1), a receptor that does not interact with CCR5, fused to YFP, was used as a negative control. Eight preys that did not yield BRET signals with CCR5-Rluc were used as additional negative controls for the co-immunoprecipitation assays. None of them led to the immunoprecipitation of a high level of luminescence activity, confirming the selectivity of the assay. Again, CCR5-YFP was used as a positive control.

Among the six positive hits common to both assays, clone 1746 and 2059 are alternatively splice variants of the gene *CNIH4* coding for the human cornichon homolog 4 protein (CNIH4). The remaining 4 interactors were distinct open-reading frames known as TMEM9, TMEM47, TMEM130 and NCLN (nicalin). No functional annotations are available for the first 3 whereas nicalin was found to form a complex with Nomo (Nodal modulator) that could play a role in the development of zebra fish embryo (Haffner et al., 2004). Given the ER/Golgi localization already ascribed to some members of CNIH protein family and the proposed role of the drosophila cornichon and yeast homologues (Erv14p) in ER-exit and transport (Bokel et al., 2006; Powers and Barlowe, 1998; Powers and Barlowe, 2002), we further explored the potential role of CNIH4 in the ER-maturation and trafficking of GPCRs. CNIHs, are predicted to have 3 transmembrane domains, a cytosolic N-terminus and a luminal C-terminus. Interestingly, the shorter splice variant (clone 1746) lacks the predicted third transmembrane domain and thus has a cytoplasmic C-terminal tail. Such topology may explain why a higher BRET signal was observed between CCR5-Rluc and clone 1746 than with the longer variant clone 2059 (Fig. 1A), since both YFP and Rluc would be on the same side of the membrane for clone 1746 whereas the YFP and Rluc moieties would be on opposite sides for clone 2059. Consistent with this notion, when the YFP was fused at the N-terminus of both splice variants, thus being on the cytosolic side in both cases, similar BRET signals with CCR5-Rluc were observed (data not shown). The fact that we observed similar co-immunoprecipitation levels for both splice variant (Fig. 1B), is also in keeping with this idea. Because, the homologues found in yeast and drosophila have 3 predicted transmembrane domains, we focused our attention on the longer CNIH4 splice variant (clone 2059).

CNIH4 is localized in the early secretory pathway

In the original characterization of clone 2059, the full length protein fused to CFP or YFP at its N-terminus and C-terminus, respectively, was found to be localized mainly to

the ER and Golgi (Simpson et al., 2000). To confirm that such localization did not result from an aberrant targeting due to the fusion with the fluorescent protein, the subcellular distribution of CNIH4 fused to a small Xpress tag at the N-terminus was assessed in COS-7 cells. These cells were chosen for their large cytoplasm and relatively small nucleus, thus facilitating a clearer distinction between different cytoplasmic organelles. As shown in Fig. 2, immunofluorescence confocal microscopy revealed a punctate labelling pattern with a slightly higher density around the nucleus, which is characteristic of ER localization. A significant co-localization between CNIH4 and the ER-resident protein calnexin and to a lesser extent with the ERGIC marker, ERGIC53, confirmed the presence of this cornichon homolog in the early secretory pathway.

CNIH4; a selective interaction partner for GPCRs

To determine if the interaction with CNIH4 is specific for CCR5 or if other GPCRs can also interact with this protein, BRET assays between vYFP-CNIH4 and a variety of Rluc-fused GPCRs were performed. As shown in Fig. 3A, the family A GPCR beta-2-adrenergic receptor (β 2AR), platelet-activating factor receptor (PAFR), chemokine receptor CXCR4 and the V2 vasopressin receptor (V2R) as well as family B calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and family C GABAb-R1 and -R2 all yielded high BRET signals with CNIH4. In comparison, the one transmembrane domain T cell receptors CD4 and CD8, the receptor tyrosine kinase EGFR and the twelve transmembrane domains enzyme adenylyl cyclase, which are also processed through the secretory pathway, all yielded very low BRET with CNIH4 despite similar levels of expression, indicating that the interaction between CNIH4 and GPCRs displays some level of selectivity. Further confirming the selectivity of interaction, BRET titration curves, where a constant level of Rluc-fused receptor were cotransfected with an increasing amount of vYFP-CNIH4, resulted in BRET signals that increased as a hyperbolic function of the vYFP-CNIH4 concentration (Fig. S1), reflecting a specific interaction (Mercier et al., 2002).

CNIH4 interacts with the precursor forms of GPCR in the early secretory pathway

To biochemically characterize the receptor species interacting with CNIH4, the association between one of the GPCRs, the β 2AR (for which the glycosylation intermediates have been well characterized), and CNIH4 was confirmed by reciprocal co-

immunoprecipitation and Western blot analysis. For this purpose, epitope-tagged CNIH4 and β 2AR were co-transfected in HEK293 cells. As can be seen in Fig. 2B, lane 1, immunoreactive β 2AR is characterized by two distinct sets of bands corresponding to the core-glycosylated (precursor; ~ 49 kD) and fully glycosylated (mature; ~ 65 to 80 kD) forms of the receptor. Upon immunoprecipitation of HA-CNIH4 using an anti-HA antibody, the β 2AR immunoreactive bands corresponding to the precursor forms but not the mature receptor species were found in the immunoprecipitate (Fig. 2B, lane 2), indicating that CNIH4 interacts with the receptor in the early secretory pathway (ER, ERGIC and/or cis-Golgi) before the addition of complex oligosaccharides to the N-linked carbohydrate core. Interestingly, some of the lower molecular weight bands of the β 2AR that were co-immunoprecipitated with CNIH4 are not present when the receptor is expressed alone (Fig. 2B, compare lane 1 and 2). These bands most likely represent partially or fully deglycosylated degradation intermediates of the receptor. In the reverse orientation, immunoprecipitation of HA- β 2AR with the anti-HA antibody co-sedimented the co-expressed CFP-tagged CNIH4, which appeared as a sharp immunoreactive band of ~42 kD (Fig. 2C, bottom panel, lane 3). Parallel blotting for the receptor revealed a decrease in the amount of mature forms and the appearance of lower molecular bands (corresponding to deglycosylation intermediates) that were not visible in the absence of co-expressed CNIH4 (Fig. 2C, upper panel, compare lane 3 and 2) indicating that the over-expression of CNIH4 may affect the maturation profile of the β 2AR.

Overexpression of CNIH4 causes the intracellular retention of GPCR

We next investigated the effect of over-expressing CNIH4 on GPCR trafficking. For this purpose, HEK293 expressing either β 2AR or CCR5 were co-transfected or not with CNIH4 and the subcellular distribution of the receptors assessed by ELISA, radioligand binding and confocal immunofluorescence microscopy. As shown in Fig. 4A, the over-expression of CNIH4 lead to a dramatic reduction of the cell surface β 2AR and CCR5, as assessed by ELISA, whereas it only modestly affected the amount of CD8 detected at the plasma membrane. Such reduction of the cell surface receptor could result from both a defect in trafficking and a decrease in the total expression of the receptors in the presence of CNIH4. To discriminate between these two causes, whole cell radio-ligand binding assays were performed using a cell-permeant radioactive ligand (125 I-CYP) in the presence

or absence of the cell permeant antagonist alprenolol or the cell non-permeant ligand, CGP12177A, to determine simultaneously the overall and cell surface expression level respectively. As can be seen in Fig. 4B, the over-expression of CNIH4 caused a decrease in both total receptor expression (right panel) and a reduction in the proportion of β 2AR reaching the cell-surface (left panel). The trafficking hindrance caused by CNIH4 over-expression was further confirmed by fluorescence microscopy (Fig. 4C), clearly illustrating that the presence of CNIH4 led to a significant retention of the β 2AR and CCR5 in an intracellular compartment where they colocalize with the cornichon homolog. In cells over-expressing both the receptor and the CNIH4, the receptor was localized to a reticular compartment strongly resembling the ER. The striking effect of CNIH4 can readily be appreciated by comparing cells in the same field that expressed only the receptors and display characteristic plasma membrane localization. In contrast to the effect on the receptor trafficking, over-expression of CNIH4 did not affect the plasma membrane targeting of CD8 and no colocalization between the T cell receptor chain and the cornichon homolog was observed.

CNIH4-promoted intracellular retention of GPCR leads to their proteasomal degradation

Intracellular retention of GPCRs often causes their targeting to the proteasome degradation pathway (Lu et al., 2003), a fact which could explain the decrease in total receptor levels upon CNIH4 over-expression. To test this hypothesis, HEK293 cells were co-transfected with β 2AR and increasing quantities of CNIH4 in the presence and absence of the proteasome inhibitor, MG132. Western blot analysis of the immunoprecipitated receptor (Fig. 5A) revealed a dose dependent effect of CNIH4, leading to a decrease in the amount of fully glycosylated mature receptor, a corresponding increase in the precursor forms of the receptor and the appearance of lower molecular weight species most likely corresponding to deglycosylated degradation intermediates. At the highest concentration of CNIH4, a global reduction in the amount of all receptor species was observed. Treatment of the cells for 2 hours with MG132 led to an accumulation of the precursor forms and degradation intermediates of the receptor with no effect on the amount of the mature forms (Fig. 5A, last lane). The effect of MG132 was further quantified using a Myc- β 2AR-Rluc construct that allows the simultaneous determination of the quantity of receptor at the cell-

surface (by ELISA using an antibody against the Myc epitope) and the overall level of expression of the receptor (by measuring the luciferase signal). As shown in Fig.5B, proteasome inhibition significantly attenuated the loss of total β 2AR promoted by high levels of CNIH4 overexpression but did not increase the proportion of receptor reaching the cell surface. Taken together these results indicate that CNIH4 over-expression inhibits the processing of the receptor by preventing its exit from the ER, eventually leading to its degradation by the proteasome. The results also indicate that preventing the proteasomal degradation of the ER-retained receptors was not sufficient to overcome the effect of CNIH4 on the cell surface trafficking, supporting a role for this cornichon homolog in the forward trafficking of the receptor from the ER to the plasma membrane.

Knockdown of endogenous CNIH4 retains the receptor inside the cell

To further investigate the possible role of CNIH4 in the normal trafficking of GPCR in cells, the expression of CNIH4 was assessed by PCR analysis of its mRNA and the effect of a shRNA targeting the cornichon homolog was tested. As shown in Fig. 6A, the short and long splice variants were detected in the two cell types studied (HEK293 and COS1), the longer form being more abundant. Transfection of HEK293 cells with a shRNA targeting a coding region of the long isoform of CNIH4 lead to a specific reduction of the mRNA encoding this isoform 48 hours following the transfection, as assessed by RT-PCR (Fig. 6B). Since no selective antibodies against CNIH4 are currently available, the effect of the shRNA treatment on the CNIH4 protein level was assessed by quantifying the reduction in luminescence signal observed in HEK293 cells expressing CNIH4 fused to Renilla luciferase at its N-terminus (Rluc-CNIH4) when co-transfected or not with the CNIH4-targetted shRNA. As shown in Fig. 6C, increasing quantities of shRNA lead to a concentration-dependent reduction in the luminescence signal, reflecting a reduction of CNIH4 expression that reached ~50% knock-down at the highest shRNA concentration used. In contrast, the shRNA did not decrease the expression level of another ER-resident protein DRiP78 fused to Rluc. An unrelated scrambled shRNA was without effect on the CNIH4 mRNA and protein levels (Fig. 6B and 6C). The effect of the endogenous CNIH4 knock-down on the trafficking of the β 2AR was assessed using the myc- β 2AR-Rluc construct and monitoring the ratio between the anti-myc ELISA (reflecting cell surface expression) and luciferase (reflecting the total receptor level) signals as an index of cell

surface targeting. As shown in Fig. 6E, increasing concentration of shRNA led to a progressive reduction in the cell surface targeting. To rule out the possibility that the decreased cell surface targeting efficacy may result from an increase in the level of total receptor expression, the effect of the shRNA was also assessed by comparing the absolute cell surface expression levels of cells expressing identical total receptor numbers. As shown in Fig. 6F, the shRNA treatment led to a 60% reduction in the cell surface targeting, confirming a role for CNIH4 in the forward trafficking of the β 2AR.

CNIH4 overexpression rescue the maturation and cell-surface expression of an intracellularly-retained mutant β 2AR

The observation that both the knock-down and over-expression of CNIH4 led to a reduction in the cell surface targeting of the receptors may indicate that the cornichon homolog plays a positive role in the forward trafficking of GPCRs and that its over-expression has a dominant negative effect resulting from the titration of other components of the ER-export machinery. To further test the possible positive forward trafficking role of CNIH4, we monitored the effect of over-expressing CNIH4 on the maturation and trafficking of an ER-retained β 2AR mutant form. Mutations in the 8th alpha-helix following the 7th transmembrane domain have been shown to impair β 2AR trafficking (Duvernay et al., 2009). We created a mutant where a series of 7 alanine residues were added in that region (β 2AR-A7; see Fig. 7A). As seen in Fig. 7A lane 1, only the core-glycosylated precursor form of this receptor is observed following Western blot analysis of the immunoprecipitated receptor and the cell surface expression of this mutant form is significantly reduced compared to the wild-type receptor as assessed by ELISA (Fig. 7B). Immunofluorescence microscopy also confirms the intracellular retention of β 2AR-A7 (Fig. 7C). When increasing quantities of CNIH4 were co-transfected with β 2AR-A7, a dose-dependent decrease in the amount of precursor form and a concomitant apparition of mature forms of the receptor was observed (Fig. 7A). This increase in the maturation of the receptor was accompanied by a significant increase of the receptor targeted at the cell surface, as detected by ELISA (Fig. 7B). At the highest CNIH4 concentrations, however, an overall decrease of both the mature and precursor form is observed and is accompanied by the apparition of lower molecular weight bands corresponding to deglycosylated degradation intermediates. The bell shape curve observed for the CNIH4 action on the

maturation of the β 2AR-A7 is consistent with the hypothesis that the cornichon homolog facilitates the forward trafficking of GPCRs but that it acts as a dominant negative at higher concentration.

CNIH4 promotes the exit of β 2AR-A7 from the ER and interacts with Sec23.

To further probe the mechanism by which CNIH4 promotes the maturation and cell surface trafficking of GPCRs, we took advantage of a BRET-based assay monitoring the interaction between the receptor and the ER-resident chaperone calnexin. As shown in Fig. 8A, a significantly higher BRET was observed between calnexin-vYFP, and β 2AR-A7-RLuc than with WT- β 2AR-RLuc, consistent with the notion that the β 2AR-A7 is retained in the ER. Over-expression of CNIH4 led to a reduction of the BRET between β 2AR-A7-Luc and Calnexin-vYFP which is brought back to the levels observed for the WT- β 2AR-RLuc (Fig. 8A), indicating that CNIH4 promotes the ER-exit of the mutant β 2AR-A7. Given the proposed role of COPII vesicles in the forward trafficking of GPCRs (Dong et al., 2008; Dupre et al., 2006), we investigated whether CNIH4 could be acting as an intermediate between ER-processing and the exit from this organelle. In order to do this, we probed for any possible interaction between CNIH4 and Sec23, a component of the COPII coat complex. Sec23 was selected because along with Sec24, it forms the inner layer of the COPII coat directly interacting with the ER membrane. The structural outer shell of the COPII coat, comprising Sec13 and Sec31, is thought to only assemble when Sec23 and Sec24 are stabilized. As shown in Fig. 8B, CNIH4 but not calnexin, used as a negative control, could be co-immunoprecipitated with Sec23, consistent with the hypothesis that CNIH4 plays a role in the ER/COPII transport of GPCR by targeting them to the Sec23-Sec24 component of the COPII-coated bud forming on the ER.

Discussion

Using a BRET-based screening of a collection of ER/Golgi-resident proteins, we identified CNIH4 as a novel protein involved in the active export of GPCRs from the ER, likely through interaction with the COPII machinery.

The role of CNIH4 in the ER export was revealed by the effect of CNIH4 on the glycosylation state of the receptors (used as a marker of the ER-Golgi transition and maturation) as well as the important reduction in the cell surface targeting of GPCRs upon both over-expression and knock-down of endogeneous CNIH4. The similar effect of over-expression and knock-down suggest that the over-expression has a dominant negative effect on the normal function of CNIH4, which may indicate the titration of another component of the ER export process. The bell-shape effect of CNIH4 on the maturation of a mutant form of the β 2AR, β 2AR-A7, which is partially retained in the ER, is consistent with this notion. Indeed at low level of over-expression, CNIH4 facilitates the maturation and cell surface targeting of the transport-compromised receptor but acts as a dominant negative at higher concentrations. For the ER export-competent wild-type receptor, the positive action of CNIH4 on the forward trafficking is not observed upon over-expression, most likely due to the presence of a sufficient level of endogenous CNIH4, and only the dominant negative effect is observed at higher expression levels. Such dominant effects of over-expressed proteins involved in ER export have previously been observed for DRiP78 (Bermak et al., 2001) and CNIH1 (Castro et al., 2007).

The function of CNIH4 in promoting the exit of the receptor from the ER is further supported by the reduction of BRET between the β 2AR-A7 and calnexin upon over-expression of CNIH4, indicating that the cornichon homologue reduced the interaction between the receptor and the molecular chaperone by promoting the exit of the former from the ER. Interestingly, over-expression of CNIH4 also led to a greater proteasome-mediated degradation of the receptors. Such increased degradation was not observed upon knock-down of CNIH4, which in fact led to an increased steady state level of the receptor, suggesting that CNIH4 may play an active role in the degradation of ER-retained cargos. Such a dual role in the maturation and degradation of neonascent proteins has previously been demonstrated for the general molecular chaperone BiP (Nishikawa et al., 2005).

Whether or not CNIH4 is directly involved in the retrotranslocation and degradation of ER-retained proteins will require further investigation.

The observation that, in addition to interacting with GPCRs, CNIH4 also interacts with Sec23, a component of the COPII complex, while no direct interaction between Sec23 and the receptors could be detected (data not shown), suggests that CNIH4 may act as a cargo-sorting receptor bringing GPCRs to ER-exit sites where it can be recruited to newly forming COPII vesicles for ER-Golgi transit. This is consistent with the proposed role of COPII vesicles in GPCR forward trafficking (Dong et al., 2008; Dupre et al., 2006). Interestingly, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the cornichon proteins, Erv14, which is located in the ER, the Golgi and COPII vesicles, has been shown to act as an ER-export protein for the transmembrane proteins Axl2p, Sma2p, Hxt1p, Hxt2p, Mid2p and Gap1 (Castillon et al., 2009; Powers and Barlowe, 2002), and interacts directly with yeast COPII components (Powers and Barlowe, 2002). Another yeast paralogue, Erv15, although less well characterized, has also been proposed to play a role in ER export (Nakanishi et al., 2007). This would suggest an evolutionary conserved role for the cornichon protein family working as cargo sorting protein for ER export of transmembrane proteins. Interestingly, Erv14 was found not to be required for the export of all transmembrane proteins since the ER export of Pma1p was not affected by the suppression of Erv14 (Castillon et al., 2009), indicating a level of selectivity toward different cargos. A similar selectivity toward a subset of transmembrane protein was found in the present study since CNIH4 could interact with all GPCRs tested but not with other transmembrane protein such as CD4, CD8, EGFR and the adenylyl cyclase.

A conserved role for cornichon proteins as ER-export proteins for transmembrane cargos is also supported by the initial discovery of the prototypical cornichon (*cni*) in *Drosophila*, which is located in the ER and is essential for the ER-export of Gurken, the fly homologue of the transmembrane TGF α precursor (Bokel et al., 2006). As in yeast, a less well characterized paralogue, known as *cni*-related (*cnir*), exists but could not interact with Gurken (Bokel et al., 2006). Yet, when expressed under the promoter of *cni*, it could rescue some of the phenotypes observed in the fly homozygous for the *cni* amorphic alleles (Bokel et al., 2006), indicating that it could also be involved in ER-export of some cargos. Interestingly, the mammalian *cni* homologue found in the present study to interact with

GPCRs (CNIH4) is most closely related to *cnir* and no specific role had been found to date for this ER-resident protein.

In humans, 4 cornichon paralogues exist (CNIH1-4), CNIH2 and 3 being closely related and CNIH4 being the most distant member of the family (Castro et al., 2007). As was the case for the *Drosophila* cornichon, CNIH1 has been found to interact with and to promote the ER-export of the TGF α precursor in mammalian cells (Castro et al., 2007). No interaction with EGFR, the transferrin receptor or GP130 and no effect on the cell surface targeting of GP130 was observed, suggesting some selectivity of CNIH1 toward specific transmembrane cargos. For their part, CNIH2 and -3 were found to interact with and favour the cell surface trafficking of the AMPA glutamate receptor (Schwenk et al., 2009). In that latter case, the association with CNIH2 and -3 resulted in a modulation of the electrophysiological properties of the AMPA channel, suggesting that the cornichon homologue acted as an escort protein that remained associated with the cargo protein. No evidence for a sustained interaction between CNIH4 and its GPCR cargos was observed in the present study since no expression of the cornichon homologue could be detected at the plasma membrane and maybe more importantly, CNIH4 was immunoprecipitated selectively with the immature core-glycosylated form of the β 2AR, corresponding to the ER forms of the receptor and not with the fully glycosylated forms present at the plasma membrane.

The fact that distinct cargo proteins were found to interact with CNIH1, CNIH2/3 and CNIH4 may suggest that each member of the family could have distinct selectivity profile toward the pool of transmembrane proteins and be involved in their specific sorting to different types of ER-exit sites that may differ in the nature of cargo that they concentrate and export into different pools of vesicles. Here, we found that CNIH4 interacted with members of the 3 major classes of GPCRs but not with the single transmembrane domain EGFR and T-cell receptors, CD8 and CD4, or the 12 transmembrane domain protein, adenylyl cyclase, suggesting a level of specialization in the type of cargos engaged by this cornichon homologue. These data also indicate that GPCRs exit the ER at least in part through a dedicated sorting mechanism and not only through a general bulk-flow mechanism.

CNIH4 can thus be added to a short list of proteins that have been shown to contribute to the ER-export and forward trafficking of GPCRs. These proteins include both specialized escort proteins that accompany the receptor at the plasma membrane and can modulate their functions, such as RAMP (Parameswaran and Spielman, 2006), nina (Baker et al., 1994), ODR-4 (Dwyer et al., 1998), RTP (Saito et al., 2004), M10S (Loconto et al., 2003), GEC1 (Chen et al., 2006), MRAP (Metherell et al., 2005) as well as more general interactors such as BiP, calnexin, and DRiP78 (Bermak et al., 2001; Rozell et al., 1998; Siffroi-Fernandez et al., 2002). The relative position and specific contribution of CNIH4 in relations with these other proteins remains to be investigated. However, the direct interaction of CNIH4 and of its yeast homologue with the COPII machinery suggest that it may be acting as a sorting molecule targeting the receptors to the COPII-coated budding sites of the ER and thus maybe acting downstream of the more general molecular chaperones.

In addition to identifying a new protein selectively involved in the ER export of GPCR, our study reveals the usefulness of BRET-based screening for the identification of GPCR interacting proteins. In addition to CNIH4, our screen identified 4 additional proteins localized in the secretory pathway, which potential role in GPCR processing and/or trafficking deserves further studies.

Materials and Methods

Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, L-glutamine and penicillin-streptomycin were purchased from Wisent (St-Bruno, Qc, Canada). Poly-D-Lysine, leupeptin, benzamidine, soybean trypsin inhibitor, the proteasome inhibitor MG132, (-)-alprenolol, CGP12177A were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Mississauga, On, Canada). Horseradish peroxidase-conjugated anti-HA antibody (3F10) and Fugene6 were obtained from Roche diagnostics (Indianapolis, IN). Linear polyethyleneimine (PEI) was from Polysciences. Coelenterazine h was purchased from Nanolight technology (Pinetop, AZ). The white opaque and clear-bottomed 96-well plates were from Corning Life Sciences (Lowell, MA). Mouse anti-HA (12CA5) and anti-myc (9E10) were produced in our core facility as ascetic fluids. Horseradish peroxidase conjugated rat anti-HA antibody was purchased from Roche Diagnostics GmbH. Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG were from GE Healthcare (Chalfont St.Giles, Buckinghamshire, UK). Anti- β 2 adrenergic receptor antibody (H20), anti-calnexin, anti-Sec23 and anti-CD8 antibodies were from Santa-Cruz. The anti-GFP antibody, which recognizes the different fluorescent proteins used in this study (YFP and CFP), was from Clontech while the anti-ERGIC53 was from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). The alkaline phosphatase kit was obtained from Bio-Rad. Anti-Xpress antibody comes from Invitrogen.

Eucaryotic Expression Vectors

The plasmids encoding for the 109 eYFP-fused ORFs and CFP-hmCNIH4 are a subset of the library created for the LIFEdb project (Simpson et al., 2000)(Mehrlé et al., 2006). The CCR5 and PAFR were fused to RLuc by subcloning them, minus the stop codon, into a vector that contains the RLuc downstream of the multiple cloning site. The pcDNA3 poly-His-HA-hm β 2AR (Lavoie et al., 2002), hm β 2AR-RLuc (Mercier et al., 2002), myc- β 2AR (Hebert et al., 1996), myc- β 2AR-RLuc, β 2AR-eYFP (Angers et al., 2000) (Salahpour et al., 2004), CXCR4-RLuc and CCR5-eYFP (Issafras et al., 2002), V2R-RLuc (Terrillon et al., 2003), myc-CRLR-RLuc (Heroux et al., 2007) CD8-RLuc (Gales et al., 2005), CD4-RLuc (Rebois et al., 2006), AC2-RLuc (Lavine et al., 2002), were previously described. For calnexin-Venus, the coding sequence of Calnexin (human transcript variant 1) was

subcloned from pCMV6-XL5 and inserted in-frame 5' of the Venus (YFP) fluorescent protein in the pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The β 2AR-A7 and β 2AR-A7-Rluc mutant were constructed by PCR site-directed mutagenesis using the wild-type pcDNA3 poly-His-HA- β 2AR and β 2AR-Rluc. EGFR was amplified by PCR and subcloned in-frame 5' of the Rluc in the pcDNA3.1 vector to create the EGFR-Rluc construct.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney 293 cells (HEK293) and COS-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 100 unit/ml penicillin/streptomycin at 37 °C in a humidified chamber at 95% air and 5% CO₂. The cells were seeded at a density of 2 X 10⁴/well for 96 well plates, 5 X 10⁵/well for 6 well plates or 3 X 10⁶ for 10 cm dishes, 24 hours before transfection. 0.2 μ g/well for 96 well plates, 2 μ g/well for 6 well plates or 6 μ g for 10 cm dishes of plasmids were used for transient transfection with either Fugene6 according to the manufacturer's recommendations or linear polyethyleneimine (3 μ g/ μ g of plasmid).

BRET-based screening assay

ORFs-eYFP and CCR5-Rluc were co-transfected into HEK293 cells in 96 well plates suitable for BRET (white and clear bottom). 48 hrs after transfection, the medium was removed and replaced with PBS. Total fluorescence was first measured using a Packard FluoroCount™ with an excitation and emission filters set at 485 nm and 530 nm, respectively. To measure the BRET signal, the bottom of the plate was covered with a white back adhesive (Perkin Elmer). The BRET¹ substrate coelenterazine h was then added to all wells (5 μ M final concentration) and the BRET¹ signal was measured 2 min later in the Mithras LB940 plate reader from Berthold Technologies (Bad Wildbad, Germany). The same plate was then used to measure total luminescence, approximately 10 min after coelenterazine-h addition. The BRET¹ signal was calculated as a ratio of the light emitted by eYFP (530 \pm 20 nm) over the light emitted by Rluc (480 \pm 20 nm). Finally, the BRET net signal was calculated as the difference between the total BRET signals and the one obtained from experiments where only the Rluc plasmid had been transfected.

Luminescence Coimmunoprecipitation

Potential hits were confirmed using a coimmunoprecipitation approach with a luminescence readout. ORFs-eYFP were co-transfected with CCR5-Rluc in 10 cm dishes containing HEK293 cells. 48 hours after transfection, cells were washed twice with PBS then scraped in 1ml of solubilisation buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM NaCl, 10 % glycerol, 1% CHAPS) containing protease inhibitors (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ benzamidine, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soybean trypsin inhibitor, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin) and incubated on ice for 1 hour. The lysates were centrifuged at 14000 RPM for 30 minutes at 4 °C and the remaining supernatants were transferred to new microfuge tubes. 50 μl of each sample was removed and assayed for luminescence levels. The supernatants were incubated overnight at 4 °C with protein-G-sepharose and a rabbit polyclonal anti-GFP antibody. The pellets were washed and resuspended with 950 μl of solubilisation buffer. A 50 μl aliquote was taken from each sample and the luminescence was measured. The extent of co-immunoprecipitation is presented as % of total luminescence.

BRET measurement between GPCRs or unrelated transmembrane proteins and CNIH4

The various GPCRs and transmembrane protein fused to luciferase were co-transfected at a low and constant quantity with increasing quantities of vYFP-CNIH4 in HEK293 cells. Approximately 48 hours after transfection, cells were washed, detached in PBS and seeded at a density of approximately 100 000 cells/well in white opaque 96-well plates. The total fluorescence and BRET¹ signals were measured as described above.

BRET measurement between wild-type or mutant β 2AR-RLuc and Calnexin-Venus

Various quantities of plasmid coding for WT- β 2AR-Rluc or β 2AR-A7-Rluc along with various Calnexin-vYFP were transfected in HEK293 cells (6 well plates) with or without a low quantity (100 ng) of a plasmid coding for CNIH4. Approximately 48 hours after transfection, cells were washed twice and detached in PBS then seeded at a density of approximately 100 000 cells/well in 96-well white optiplate (PerkinElmer). The total fluorescence, luminescence and BRET¹ were measured as described above. Conditions of similar total luminescence and fluorescence levels were used for analysis.

Immunoprecipitation

HEK293 cells seeded in 10 cm dishes were transfected with the indicated plasmids. Approximately 36 hours after transfection, cells were washed with PBS then detached with PBS/EDTA and lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS and 10 mM *N*-ethylmaleimide) containing protease inhibitors (10 µg/ml benzamidine, 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 5 µg/ml leupeptin) for 2 hours at 4 °C under gentle agitation. The lysates were clarified by centrifugation at 14 000 rpm for 30 minutes at 4 °C. Indicated antibody and protein-G sepharose were added to the supernatants followed by an overnight incubation at 4 °C. The precipitates were then washed five times in RIPA buffer and the proteins eluted 1 h at room temperature in 50 µl of SDS-PAGE loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.5, 4% SDS, 2 M urea, 5% glycerol, 0.1% bromophenol blue). Proteins were then resolved on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and detected by immunoblotting using the indicated antibody.

Visualization of CNIH4, HA-β2AR or HA-β2AR-A7 cellular localization by confocal immunofluorescence microscopy

HEK293 cells or COS-1 were plated on poly-D-lysine coated coverslips and transfected with the indicated constructs (Xpress-CNIH4, HA-β2AR or HA-β2AR-A7). 24 hours after transfection, cells were washed 3 times with PBS then fixed and permeabilized in 2% PFA/0.1% Triton X-100 in PBS for 20 minutes. Cells were treated with anti-Xpress antibody, anti-calnexin, anti-ERGIC53 or anti-HA (12CA5) and then with Alexa488 (CNIH4), TexasRed (Calnexin or ERGIC53) or Alexa 594 (HA-β2AR or HA-β2AR-A7) conjugated secondary antibody. The samples were analysed by confocal microscopy using a Zeiss510 LSM META laser scanning microscope with a Plan Apochromat 63x, NA 1.4, DIC oil objective at room temperature. The images were captured and analysed using the LSM510 v.3.2 software. Laser excitation and emission filters used were as follows: Alexa 488: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$, Texas Red and Alex 594 $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = \text{LP}560 \text{ nm}$.

Live cell microscopy of receptor cellular localization upon CNIH4 overexpression

HEK293 cells were transfected with the indicated constructs. Direct Fluorescence of CFP and YFP were acquired separately with a Nikon-eclipse TE2000-U (Nikon, Kanagawa, Japan) equipped with a CoolSnap HQ camera (Roper Scientific, Ottobrun, Germany) with a 60x, NA objective at -30 °C. The YFP has been detected using an excitation filter centered at 500 ± 10 nm and emission filter centered at 535 ± 10 nm. CFP $\lambda_{ex} = 436 \pm 10$ nm, $\lambda_{em} = 480 \pm 20$ nm. The images were captured and analysed using the 2D deconvolution function of the software Metamorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA).

Whole-cell radioligand binding

The β 2AR was cotransfected with CNIH4 or not in HEK293 cells in 10 cm dishes. 36 hours later, cells were washed once with PBS, detached with PBS/EDTA, washed twice in PBS and resuspended in 10 ml PBS. For each binding reaction, 350 μ l of cell suspension was used with 200 pM of 125 I-cyanopindolol in a final volume of 500 μ l. Binding reaction were performed at 25 °C for 2 hours and were terminated by rapid filtration over Whatman GF/C glass fiber filters. Total receptor numbers were defined by the amount of radioligand binding inhibited by 0.3 μ M of (-)-alprenolol, whereas cell-surfaced receptors were defined as the amount of 125 I-CYP inhibited by 0.1 μ M of CGP12177A. The results are expressed as a % of cell-surface receptors over total receptors.

Receptor cell-surface expression by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

HEK293 cells (1.2×10^6) were grown overnight in 35 mm dishes. The cells were then transfected with the indicated constructs. 24 hours later, cells were detached by trypsinization and cells (2×10^5) were transferred to 24-well plates pre-coated with 0.1 mg/ml poly-L-lysine (Sigma) and maintained for an additional 24 h. The medium was removed and cells were fixed with 3.7% formaldehyde in TBS for 5 minutes at room temperature followed by three times washed with TBS. Non-specific binding was blocked by incubating the cells 45 minutes in TBS/1% BSA. Cells were then incubated with an anti-HA (12CA5), anti-myc (9E10) or anti-CD8 antibody at a 1:1000 dilution in TBS/1% BSA for 1h at room temperature. Cells were then washed 3 times in TBS, briefly reblocked in TBS/1% BSA for 15 minutes and incubated 1 hour with an alkaline-phosphatase conjugated goat anti-mouse antibody (Bio-Rad). Following three washes with TBS, a

colorimetric alkaline phosphatase substrate (Bio-Rad) was added according to the manufacturer's instructions. The colorimetric reactions were measured using a GENios Plus microplate reader (Tecan). Cells transfected with empty vectors were used to determine background. In some experiment, the receptors were also fused with luciferase at their C-terminus, enabling us to measure the total receptor expression by luminescence and determine a cell-surface/total receptor ratio.

Detection of CNIH4 endogenous mRNA by RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol from HEK293 or COS1 cells transfected or not with a shRNA targeting CNIH4. Two μ g of RNA were reverse transcribed using oligo(dT)₁₂₋₁₈ and the SuperScriptTM Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). The complete CNIH4 cDNA was then amplified by PCR using the following primers:

5'-tgccatcaggtaccatggaggcggtggttcgtcttc-3' and 5'-agttgcgatctagattattcagtcatttatcaaagctaag-3'. The PCR products were resolved on 1% agarose gel.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the BRET titration curves between the three GPCR Families (A, B and C) and CNIH4

Acknowledgement:

We are grateful to Monique Lagacé for her critical reading of the manuscript, Christian Charbonneau for technical assistance with fluorescence microscopy and Stefan Wiemann (Deutsches Krebsforschungszentrum) to generate the ORF clones. This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada to M.B. E.S. received a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada while D.M.R., F.A and Y.P. held fellowships from the Canadian Institute for Health Research. M.B. holds the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

Abbreviations:

β 2AR, beta-2-adrenergic receptor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; cni, prototypical cornichon in drosophila; CNIH4, human cornichon homolog 4; ELISA, enzyme-linked immunosorbent; ER, endoplasmic reticulum; ERGIC, ER-Golgi intermediate complex; Erv14p, cornichon yeast homologues; GABABR1, metabotropic gamma aminobutyric acid receptor 1; GPCR, G protein-couple receptor; HEK293, human embryonic kidney 293 cells; ORFs, open reading frames; PAFR, platelet-activating factor receptor; Rluc, Renilla luciferase; V2R, V2 vasopressin receptor; YFP, yellow fluorescent protein.

References

- Achour, L., C. Labbe-Jullie, M.G. Scott, and S. Marullo. 2008. An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends Pharmacol Sci.* 29:528-535.
- Allen, J.A., and B.L. Roth. 2011. Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 51:117-144.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairret, D. Chelsky, M. Dennis, and M. Bouvier. 2000. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3684-3689.
- Baker, E.K., N.J. Colley, and C.S. Zuker. 1994. The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *EMBO J.* 13:4886-4895.
- Behrens, M., J. Bartelt, C. Reichling, M. Winnig, C. Kuhn, and W. Meyerhof. 2006. Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J Biol Chem.* 281:20650-20659.
- Bermak, J.C., M. Li, C. Bullock, and Q.Y. Zhou. 2001. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol.* 3:492-498.
- Bokel, C., S. Dass, M. Wilsch-Brauninger, and S. Roth. 2006. Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGFalpha-like growth factor Gurken. *Development.* 133:459-470.
- Castillon, G.A., R. Watanabe, M. Taylor, T.M. Schwabe, and H. Riezman. 2009. Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic.* 10:186-200.
- Castro, C.P., D. Piscopo, T. Nakagawa, and R. Derynck. 2007. Cornichon regulates transport and secretion of TGFalpha-related proteins in metazoan cells. *J Cell Sci.* 120:2454-2466.
- Chen, C., J.G. Li, Y. Chen, P. Huang, Y. Wang, and L.Y. Liu-Chen. 2006. GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem.* 281:7983-7993.
- Cooray, S.N., I. Almiro Do Vale, K.Y. Leung, T.R. Webb, J.P. Chapple, M. Egertova, M.E. Cheetham, M.R. Elphick, and A.J. Clark. 2008. The melanocortin 2 receptor accessory protein exists as a homodimer and is essential for the function of the melanocortin 2 receptor in the mouse y1 cell line. *Endocrinology.* 149:1935-1941.
- Dong, C., C.M. Filipeanu, M.T. Duvernay, and G. Wu. 2007. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta.* 1768:853-870.

- Dong, C., F. Zhou, E.K. Fugetta, C.M. Filipeanu, and G. Wu. 2008. Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase. *Cell Signal*. 20:1035-1043.
- Dupre, D.J., M. Robitaille, N. Ethier, L.R. Villeneuve, A.M. Mamarbachi, and T.E. Hebert. 2006. Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J Biol Chem*. 281:34561-34573.
- Dupre, D.J., M. Robitaille, M. Richer, N. Ethier, A.M. Mamarbachi, and T.E. Hebert. 2007. Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for Ggamma subunits before assembly with Gbeta. *J Biol Chem*. 282:13703-13715.
- Duvernay, M.T., C. Dong, X. Zhang, F. Zhou, C.D. Nichols, and G. Wu. 2009. Anterograde trafficking of G protein-coupled receptors: function of the C-terminal F(X)6LL motif in export from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol*. 75:751-761.
- Dwyer, N.D., E.R. Troemel, P. Sengupta, and C.I. Bargmann. 1998. Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *Cell*. 93:455-466.
- Gales, C., R.V. Rebois, M. Hogue, P. Trieu, A. Breit, T.E. Hebert, and M. Bouvier. 2005. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods*. 2:177-184.
- Haffner, C., M. Frauli, S. Topp, M. Irmeler, K. Hofmann, J.T. Regula, L. Bally-Cuif, and C. Haass. 2004. Nicalin and its binding partner Nomo are novel Nodal signaling antagonists. *EMBO J*. 23:3041-3050.
- Hamdan, F.F., Y. Percherancier, B. Breton, and M. Bouvier. 2006. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci*. Chapter 5:Unit 5 23.
- Hanyaloglu, A.C., and M. von Zastrow. 2008. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 48:537-568.
- Hebert, T.E., S. Moffett, J.P. Morello, T.P. Loisel, D.G. Bichet, C. Barret, and M. Bouvier. 1996. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*. 271:16384-16392.
- Heroux, M., B. Breton, M. Hogue, and M. Bouvier. 2007. Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET. *Biochemistry*. 46:7022-7033.
- Hilaret, S., S.M. Foord, F.H. Marshall, and M. Bouvier. 2001. Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem*. 276:29575-29581.

- Issafras, H., S. Angers, S. Bulenger, C. Blanpain, M. Parmentier, C. Labbe-Jullie, M. Bouvier, and S. Marullo. 2002. Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem.* 277:34666-34673.
- Lavine, N., N. Ethier, J.N. Oak, L. Pei, F. Liu, P. Trieu, R.V. Rebois, M. Bouvier, T.E. Hebert, and H.H. Van Tol. 2002. G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 277:46010-46019.
- Lavoie, C., J.F. Mercier, A. Salahpour, D. Umapathy, A. Breit, L.R. Villeneuve, W.Z. Zhu, R.P. Xiao, E.G. Lakatta, M. Bouvier, and T.E. Hebert. 2002. Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem.* 277:35402-35410.
- Leclerc, P.C., M. Auger-Messier, P.M. Lanctot, E. Escher, R. Leduc, and G. Guillemette. 2002. A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology.* 143:4702-4710.
- Loconto, J., F. Papes, E. Chang, L. Stowers, E.P. Jones, T. Takada, A. Kumanovics, K. Fischer Lindahl, and C. Dulac. 2003. Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell.* 112:607-618.
- Lu, M., F. Echeverri, and B.D. Moyer. 2003. Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic.* 4:416-433.
- Malaga-Dieguez, L., Q. Yang, J. Bauer, H. Pankevych, M. Freissmuth, and C. Nanoff. 2010. Pharmacochaperoning of the A1 adenosine receptor is contingent on the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol.* 77:940-952.
- McLatchie, L.M., N.J. Fraser, M.J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M.G. Lee, and S.M. Foord. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 393:333-339.
- Mehrle, A., H. Rosenfelder, I. Schupp, C. del Val, D. Arlt, F. Hahne, S. Bechtel, J. Simpson, O. Hofmann, W. Hide, K.H. Glatting, W. Huber, R. Pepperkok, A. Poustka, and S. Wiemann. 2006. The LIFEdb database in 2006. *Nucleic Acids Res.* 34:D415-418.
- Mercier, J.F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit, and M. Bouvier. 2002. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 277:44925-44931.
- Metherell, L.A., J.P. Chapple, S. Cooray, A. David, C. Becker, F. Ruschendorf, D. Naville, M. Begeot, B. Khoo, P. Nurnberg, A. Huebner, M.E. Cheetham, and A.J. Clark. 2005. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet.* 37:166-170.

- Moore, C.A., S.K. Milano, and J.L. Benovic. 2007. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69:451-482.
- Nakanishi, H., Y. Suda, and A.M. Neiman. 2007. Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 120:908-916.
- Nishikawa, S., J.L. Brodsky, and K. Nakatsukasa. 2005. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem.* 137:551-555.
- Parameswaran, N., and W.S. Spielman. 2006. RAMPs: The past, present and future. *Trends Biochem Sci.* 31:631-638.
- Powers, J., and C. Barlowe. 1998. Transport of axl2p depends on erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila* cornichon gene product. *J Cell Biol.* 142:1209-1222.
- Powers, J., and C. Barlowe. 2002. Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell.* 13:880-891.
- Qanbar, R., and M. Bouvier. 2003. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther.* 97:1-33.
- Rebois, R.V., M. Robitaille, C. Gales, D.J. Dupre, A. Baragli, P. Trieu, N. Ethier, M. Bouvier, and T.E. Hebert. 2006. Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci.* 119:2807-2818.
- Ritter, S.L., and R.A. Hall. 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:819-830.
- Rozell, T.G., D.P. Davis, Y. Chai, and D.L. Segaloff. 1998. Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin. *Endocrinology.* 139:1588-1593.
- Saito, H., M. Kubota, R.W. Roberts, Q. Chi, and H. Matsunami. 2004. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell.* 119:679-691.
- Salahpour, A., S. Angers, J.F. Mercier, M. Lagace, S. Marullo, and M. Bouvier. 2004. Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem.* 279:33390-33397.
- Schwenk, J., N. Harmel, G. Zolles, W. Bildl, A. Kulik, B. Heimrich, O. Chisaka, P. Jonas, U. Schulte, B. Fakler, and N. Klocker. 2009. Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science.* 323:1313-1319.
- Siffroi-Fernandez, S., A. Giraud, J. Lanet, and J.L. Franc. 2002. Association of the thyrotropin receptor with calnexin, calreticulin and BiP. Effects on the maturation of the receptor. *Eur J Biochem.* 269:4930-4937.

- Simpson, J.C., R. Wellenreuther, A. Poustka, R. Pepperkok, and S. Wiemann. 2000. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep.* 1:287-292.
- Terrillon, S., T. Durroux, B. Mouillac, A. Breit, M.A. Ayoub, M. Taulan, R. Jockers, C. Barberis, and M. Bouvier. 2003. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol.* 17:677-691.

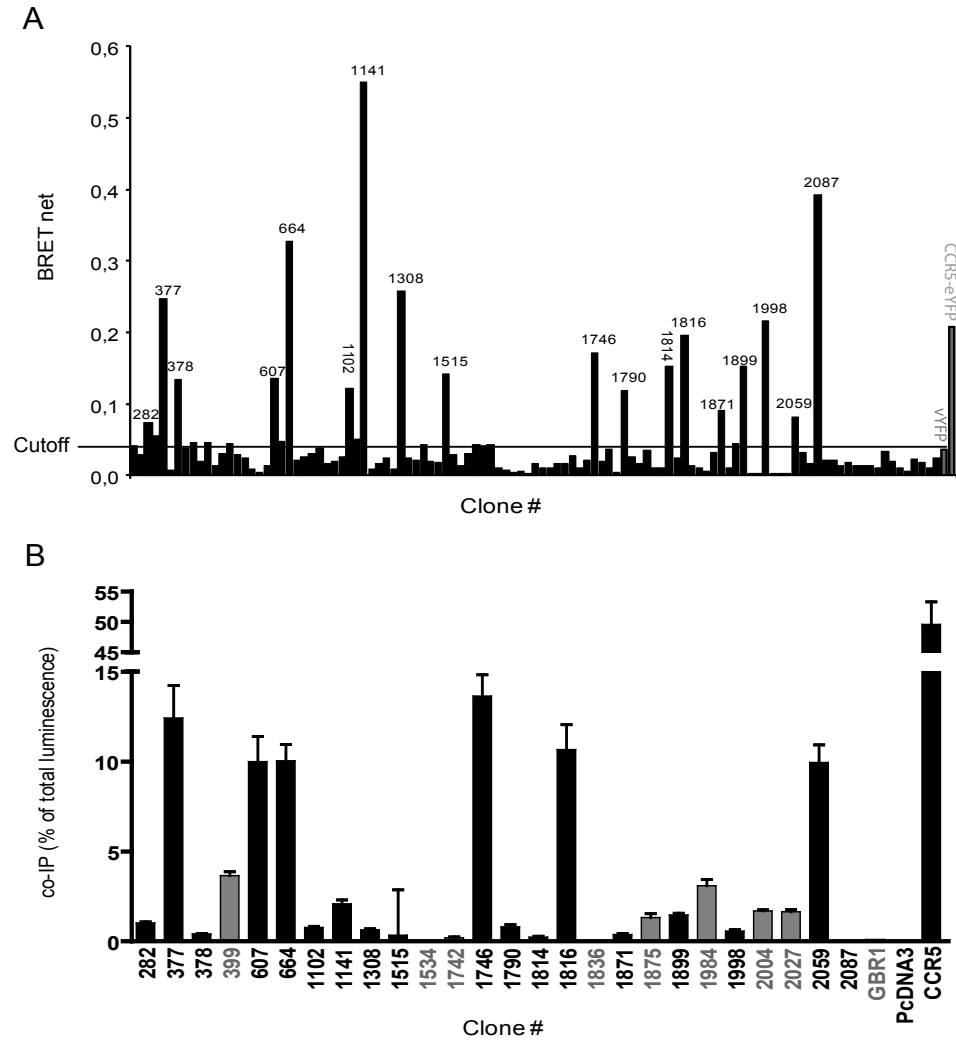


Figure 1. **Identification of CNIH4 as a new GPCR interactor using BRET-based screening.** A) Each of the individual 109 ORFs-eYFP were co-transfected with CCR5-hRLuc into HEK 293 cells and the BRET signal was measured. The cutoff line is the level of BRET obtained when soluble YFP is coexpressed with CCR5-hRLuc. CCR5-eYFP was included as a positive control as it is known to homodimerize. Each clone in the library is assigned a specific number for identification (ID) purpose. 18 positive hits were obtained and are labeled with their ID number. B) Co-immunoprecipitation of CCR5-hRLuc with the 18 positives ORFs-YFP (black bars) and 8 negative clones (grey bars). The ORFs-eYFP were immunoprecipitated from cells co-expressing CCR5-hRLuc and a unique ORF-YFP using an anti-GFP antibody and the co-immunoprecipitated CCR5-hRLuc was detected by measuring the luminescence signal. The result shown is representative of three independent experiment.

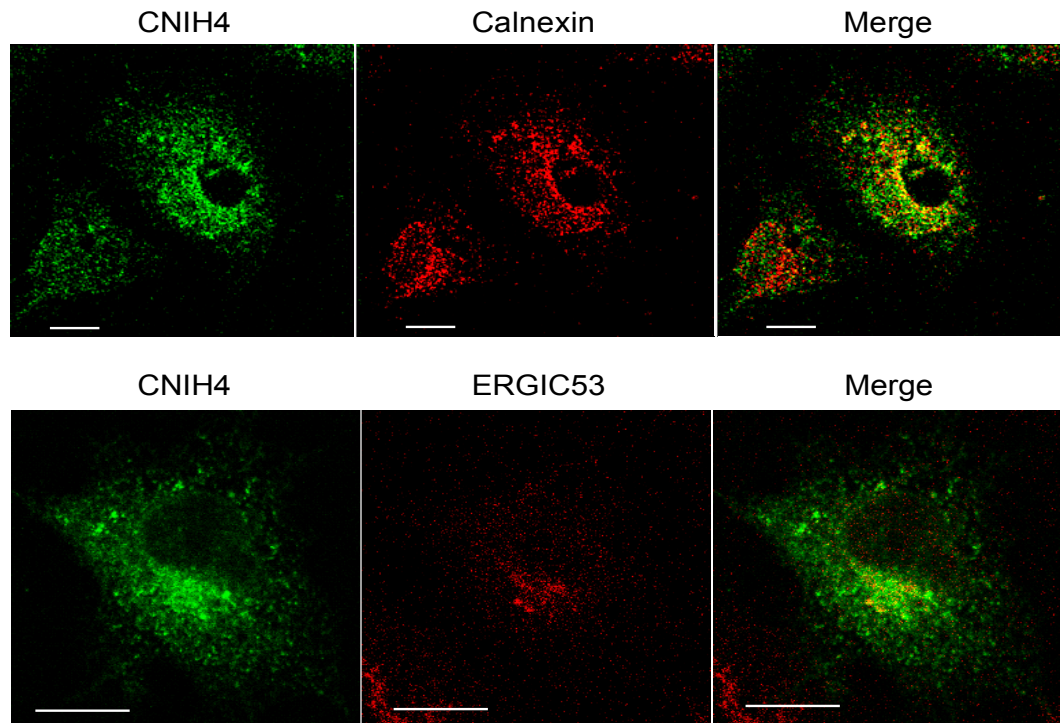


Figure 2. **CNIH4 is localized in the early secretory pathway.** HEK 293 cells transiently expressing Xpress-CNIH4 were co-stained using an anti-Xpress antibody and an anti-calnexin or ERGIC53 antibody. Images were captured using a Zeiss 510 LSM META laser scanning confocal microscope. Images show the localization of CNIH4 in green and calnexin or ERGIC53 in red and their merged co-localization in yellow. The results shown are representative of 3 independent experiments. Scale bar = 10 μ m

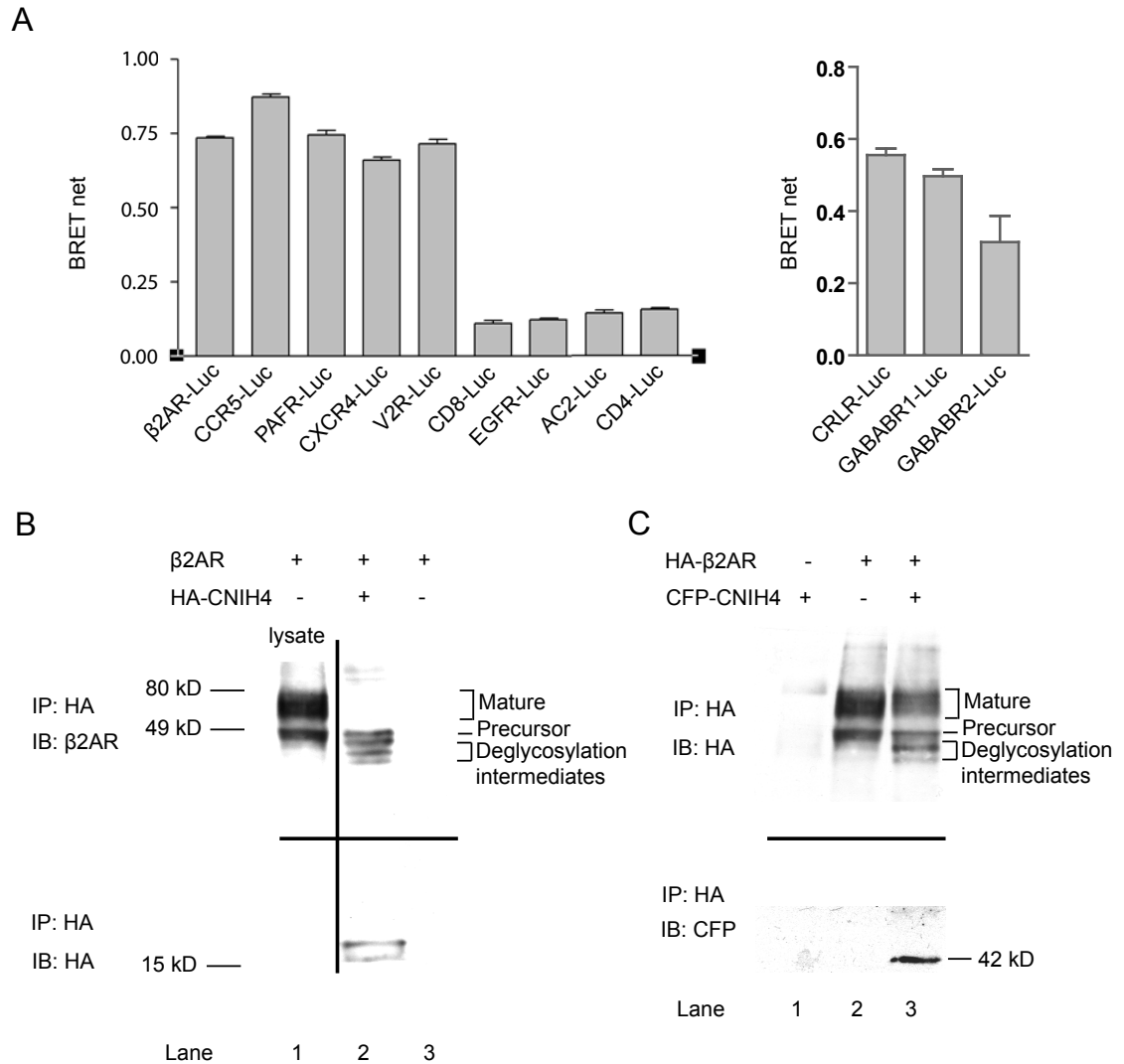


Figure 3. CNIH4 interacts selectively with GPCRs in the early secretory pathway. A) Family A (β 2AR, CCR5, PAFR, CXCR4, V2R), family B (CRLR), family C (GABABR1 and GABABR2) GPCRs and unrelated trans-membrane proteins that also trafficked through the secretory pathway (CD8, EGFR, adenylate cyclase 2 (AC2), CD4) fused with hRLuc were co-transfected with vYFP-CNIH4 in HEK293 cells and BRET was measured. The BRET signals shown are observed at comparable total Fluorescence/Luminescence (acceptor/donor) ratios. The data are expressed as the mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. B) Co-immunoprecipitation of the β 2-adrenergic receptor (β 2AR) with CNIH4 in HEK293 cells co-expressing or not HA-CNIH4 and β 2AR. CNIH4 was immunoprecipitated using a mouse anti-HA (12CA5) antibody and the receptor or CNIH4 were detected by western blot using a rabbit anti- β 2AR (H20) or rat anti-HA (3F10) antibodies (Upper panel, lane 2, 3), respectively. Total receptor expression in lysate of HEK293 cells expressing the β 2AR alone is shown for comparison purpose (upper panel, lane 1). C) Co-immunoprecipitation of CNIH4 with the β 2AR in cells co-expressing CFP-CNIH4. β 2AR was immunoprecipitated using an anti-HA (12CA5) antibody and CFP-CNIH4 was detected by western blot using an anti-CFP antibody (Lower panel, lane 3). Immunoprecipitated receptor was detected using anti-HA (rat 3F10) antibody (upper panel). The result shown is a representative of 3 independent experiments.

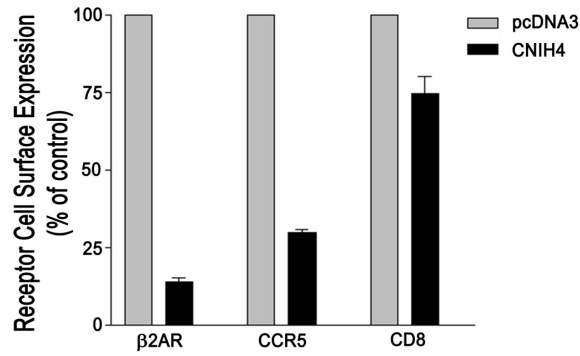
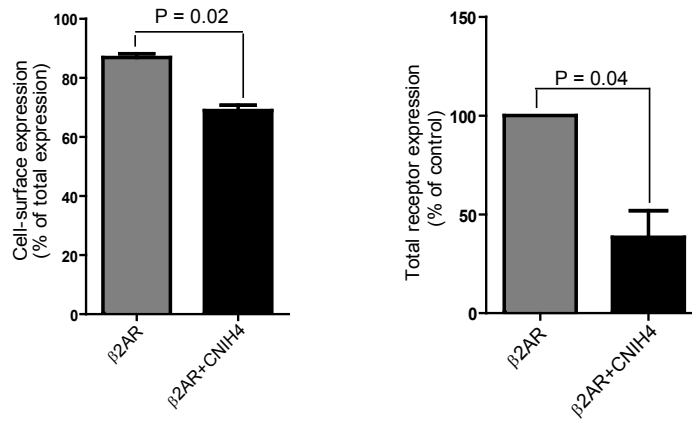
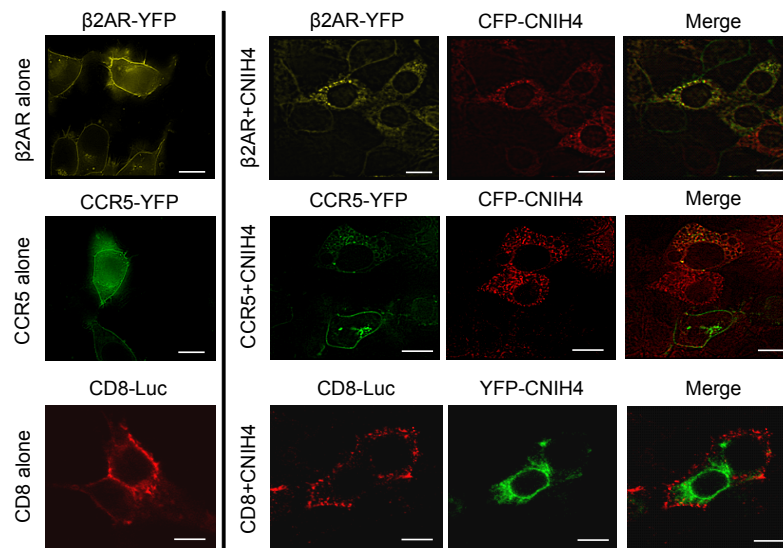
A**B****C**

Figure 4. CNIH4 overexpression leads to intracellular retention of GPCRs. A) Cell-surface expression of β 2AR, CCR5 and CD8 was measured by ELISA in HEK 293 cells co-transfected with an empty pcDNA3 vector (grey bars) or CNIH4 (black bars). Data are expressed as the % of signal in the empty vector condition and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. B) Total receptor expression (right panel) and the proportion of cell-surface receptor expression (left panel) were measured by radioligand binding, as described under Materials and Methods, in HEK 293 cells co-expressing the β 2AR and CNIH4 (black bars) or the receptor alone (grey bars). Data shown are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed by paired Student's t test using the Prism software (GraphPad). C) HEK 293 cells co-expressing CFP-CINI4 and either β 2AR-YFP, or CCR5-YFP were used to monitor the subcellular distribution of the protein by fluorescence microscopy as described under Materials and Methods. CD8-RLuc, was detected by immunofluorescence microscopy using an anti-Luc antibody. The bar = 10 μ m.

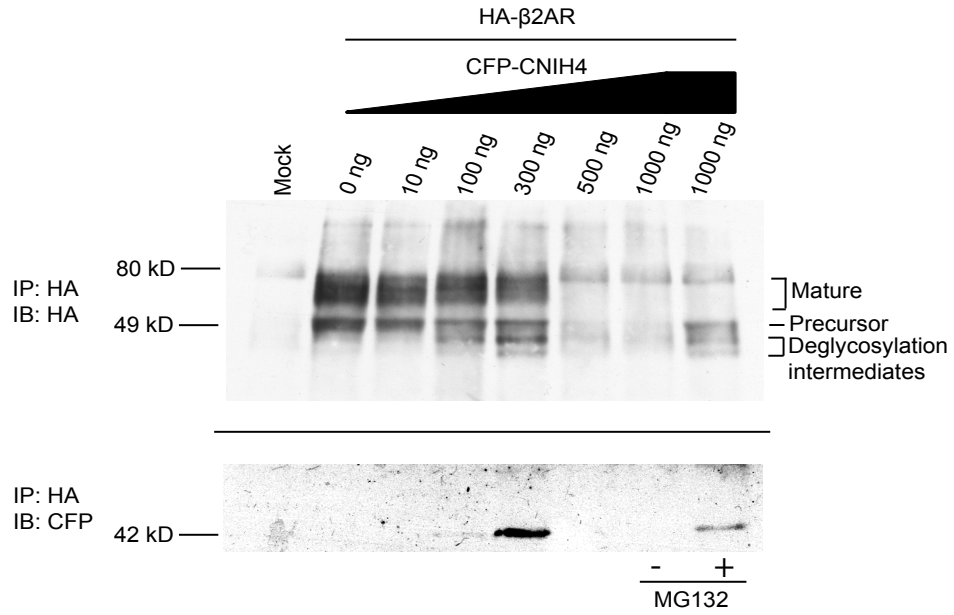
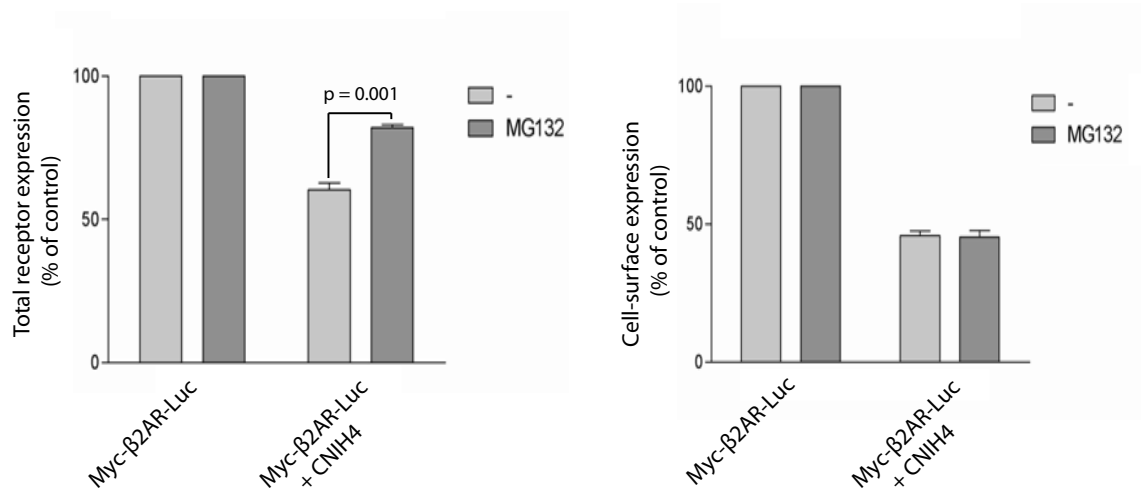
A**B**

Figure 5. Receptors retained in the ER by CNIH4 are degraded by the proteasome. A) HEK 293 cells were co-transfected with the β 2AR and increasing quantities of CNIH4. The receptor was immunoprecipitated and detected by western blot. The condition with the highest expression of CNIH4 was also treated with the proteasome inhibitor MG132 (10 μ M) for two hours prior to lysis. B) The effect of the proteasome inhibitor MG132 on the cell-surface expression of the β 2AR (right graph) in the presence of CNIH4 was measured by ELISA using an anti-myc antibody while the total receptor expression (left graph) was measured by luminescence. Data are expressed as the % of signal observed in the absence of CNIH4 (and are the mean \pm SEM of 4 independent experiments). Statistical significance of the difference was assessed by paired Student's t test using the Prism software.

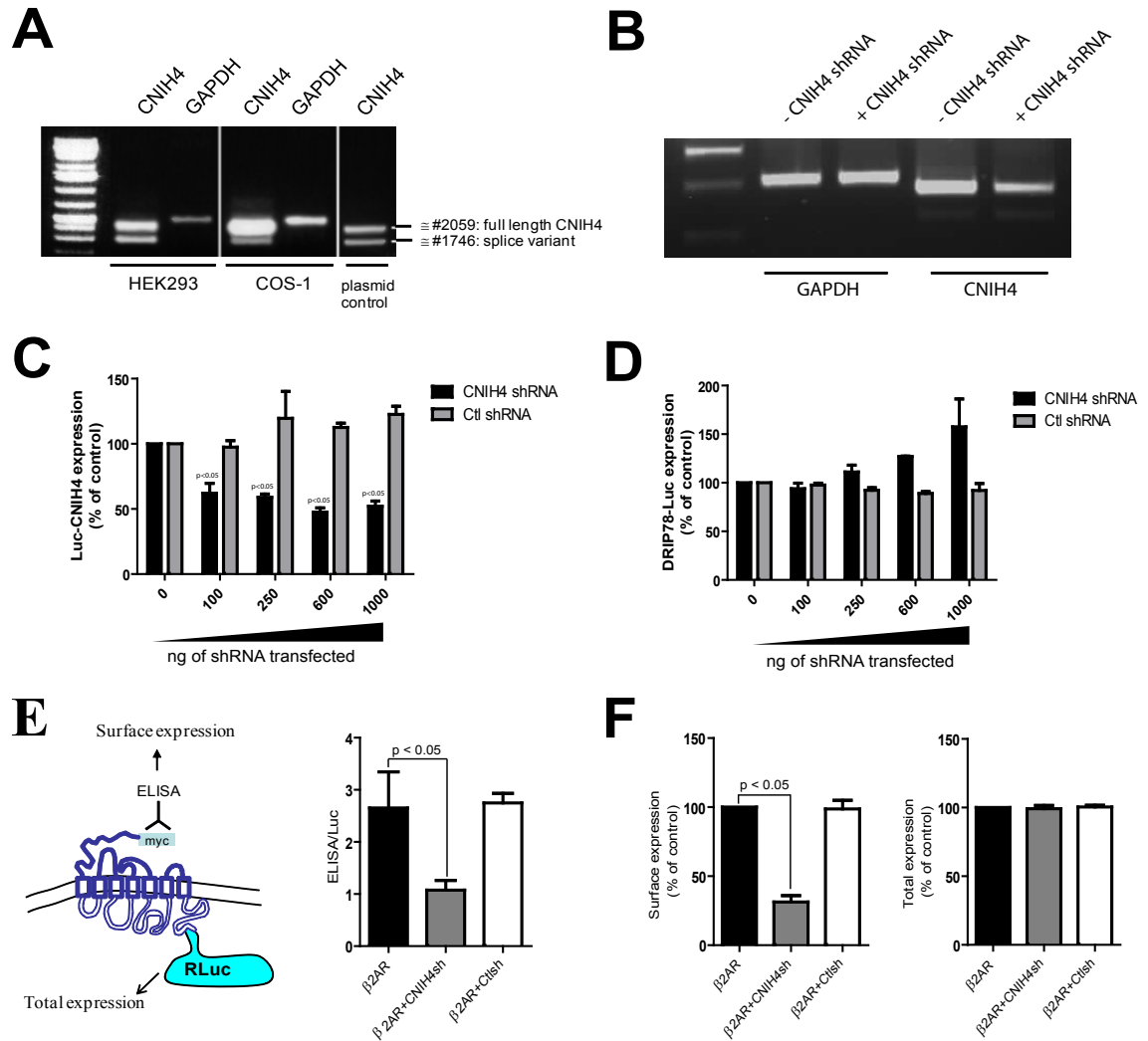


Figure 6. Knockdown of endogenous CNIH4 in HEK 293 cells lead to intracellular retention of the β 2AR. A) The expression of endogenous CNIH4 mRNA was detected in HEK 293 and COS-1 cells by RT-PCR as described under Materials and Methods. B) CNIH4 mRNA knock-down in HEK 293 cells transfected with a shRNA targeting CNIH4 was measured by RT-PCR. The selectivity of the shRNA was controlled by measuring the GAPDH mRNA. C) HEK 293 cells were co-transfected with hRLuc-CNIH4 and increasing quantities of the shRNA against CNIH4 (black bars) or a control shRNA (grey bars) and the luciferase signal was measured. D) HEK 293 cells were co-transfected with DRIP78-hRLuc and increasing quantities of the shRNA against CNIH4 (black bars) or a control shRNA (grey bars) and the luciferase signal was measured. E) HEK 293 cells were co-transfected with myc- β 2AR-Luc and a shRNA targeting the endogenous CNIH4 or a control shRNA. The cell-surface receptors were detected by ELISA using an anti-myc antibody while the luminescence was measured to determine total receptor expression. The cell-surface immunoreactivity/luminescence ratio was used as a measure of the proportion of receptor targeted to the cell-surface. F) HEK293 cells were co-transfected with shRNA targeting CNIH4 or the control shRNA and myc- β 2AR-Rluc and the cell surface receptors were detected by ELISA using anti-myc antibody. Cells expressing similar quantity of total myc- β 2AR-Rluc (as determined by the luminescence signal) were selected for these experiments. For panels C-F, the data shown represent the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Statistical significance of the differences were assessed by paired Student's t test (panel C, D) and one-way anova analysis followed by a tukey test (panel E, F) using the Prism software.

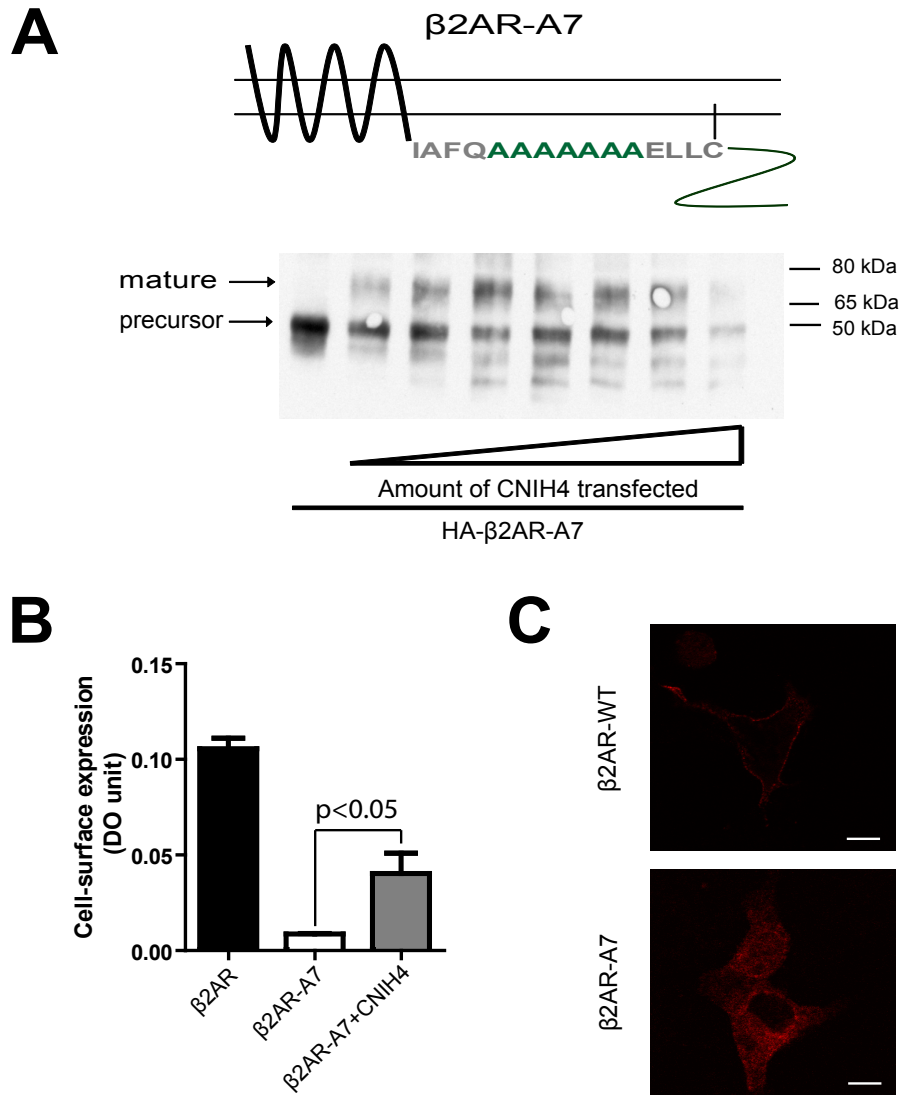


Figure 7. CNIH4 rescues the trafficking of a ER-retained $\beta 2AR$ mutant. A) HA- $\beta 2AR-A7$ was transfected alone or with increasing quantities of CNIH4 in HEK 293 cells and the receptor was immunoprecipitated using a mouse anti-HA antibody then revealed by western blot using a rat anti-HA antibody. The schematic representation of the seven alanines added to the wild-type receptor are shown in green in the figure along with the flanking residues. B) The level of cell-surface receptor was detected by ELISA using an anti-HA antibody in HEK 293 cells expressing HA- $\beta 2AR$, HA- $\beta 2AR-A7$ or co-expressing the receptors and CNIH4. Data shown are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. Statistical significance of the differences were assessed by one-way ANOVA analysis followed by a tukey test using the Prism software. C) HEK 293 cells transiently expressing HA- $\beta 2AR$ or HA- $\beta 2AR-A7$ were labeled with anti-HA antibody. Images were captured using a Zeiss510 LSM META laser scanning microscope. The bar = 10 μm

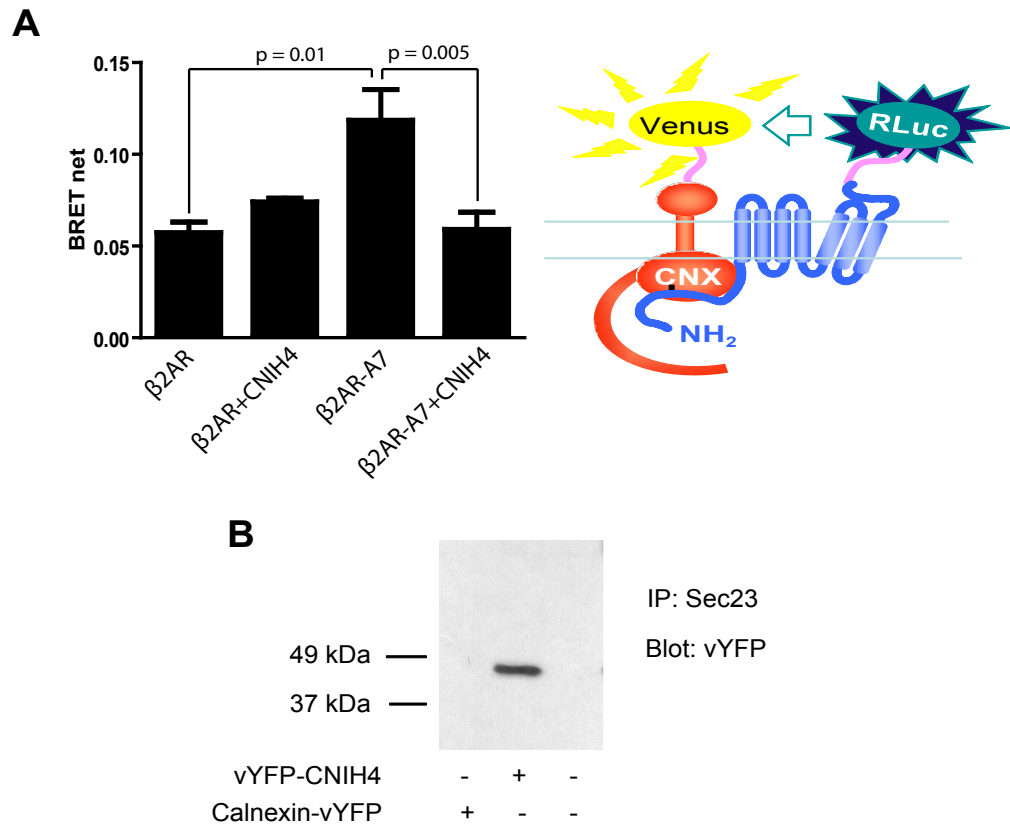


Figure 8. CNIH4 promotes the ER-exit of HA-β2AR-A7 and interacts with Sec23. A) HEK 293 cells were transfected with Calnexin-Venus, β2AR-hRLuc or β2AR-A7-hRLuc in presence or absence of CNIH4 and BRET signals were measured. Data shown are the mean of 4 independent experiments ± SEM performed at comparable level of total fluorescence and luminescence for each condition. Statistical significance of the difference was assessed by paired Student's t test using the Prism software. B) Endogenous Sec23 was immunoprecipitated from lysates of HEK 293 cells expressing vYFP-CNIH4 or Calnexin-vYFP using an anti-Sec23 antibody and the presence of CNIH4 or calnexin was detected by western blot analysis using an anti-YFP antibody. The result shown is representative of 3 independent experiments.

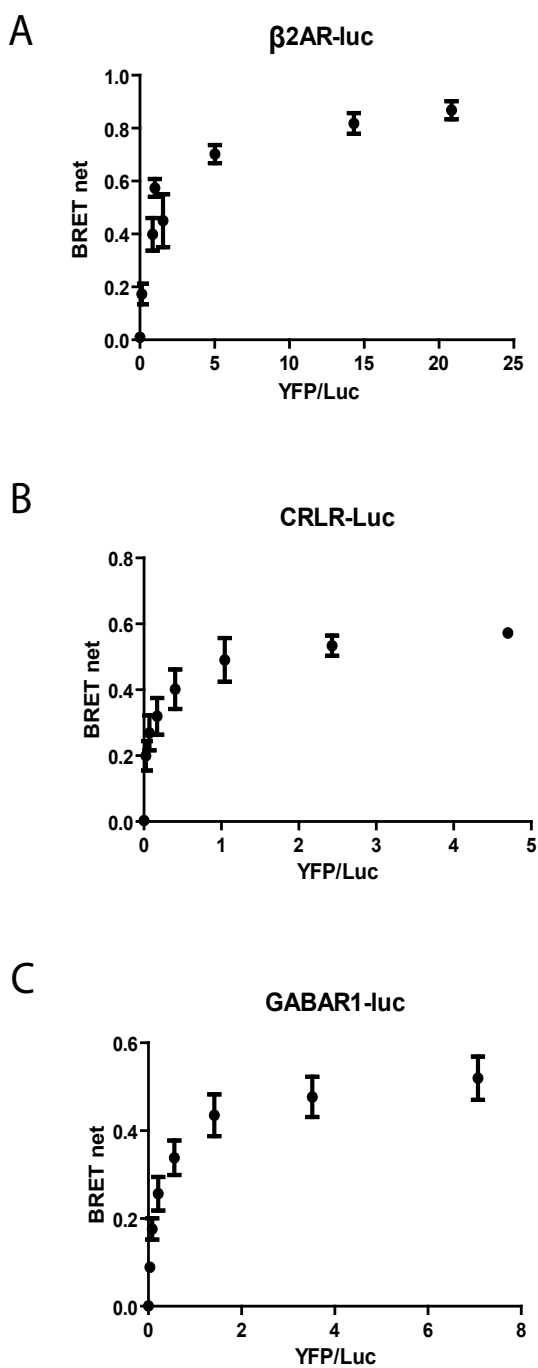


Figure S1. **BRET titration curves between Family A, B and C GPCR and CNH4.** HEK 293 cells were transfected with a fixed concentration of β 2AR-Luc (A), CRLR-Luc (B) or GABAR1-Luc (C) and increasing concentration of vYFP-CNH4 and the fluorescence and BRET were measured in parallel. BRET levels are plotted as a function of the ratio of fluorescence over luminescence. The results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

Article 2:**TMEM9 and CNIH4 form a complex regulating GPCRs export from the endoplasmic reticulum****Etienne Sauvageau and Michel Bouvier****Résumé**


L'identification au cours des dernières années de plusieurs protéines contrôlant la synthèse et le transport des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) a permis d'ouvrir la voie à une meilleure compréhension de ces mécanismes méconnus. Nous avons préalablement identifié l'homologue humain de cornichon 4 (CNIH4) comme une nouvelle protéine interagissant sélectivement avec les RCPGs et favorisant leur export du reticulum endoplasmique. Dans cette étude, nous démontrons que la protéine transmembranaire 9 (TMEM9), une protéine dont les fonctions étaient préalablement inconnues, interagit sélectivement avec les RCPGs et CNIH4. La surexpression de cette protéine provoque la rétention intracellulaire des récepteurs similairement à ce qui était observé pour CNIH4. La surexpression combinée de ces deux protéines rétablit le transport normal d'un récepteur à la membrane plasmique et la co-expression de TMEM9 potentialise la capacité de CNIH4 d'augmenter la maturation d'un récepteur mutant normalement retenu dans le RE. Ces résultats suggèrent que TMEM9 et CNIH4 forment un complexe stoichiométrique contrôlant la maturation des RCPGs.

TMEM9 and CNIH4 form a complex regulating GPCRs export from the endoplasmic reticulum

Etienne Sauvageau¹ and Michel Bouvier¹

¹Institute for research in Immunology and Cancer and Department of Biochemistry,
Université de Montreal.

Corresponding author:

Michel Bouvier
IRIC, Université de Montréal
C.P. 6128 Succursale Centre-ville
Montréal (Qc) H3C 3J7, Canada
Tel: 514-343-6319
Fax: 514-343-6843


Short Title: TMEM9 cooperates with CNIH4 to control GPCR ER-export

Number of characters: 32 040

Abstract

The identification in recent years of several proteins regulating G protein coupled receptors (GPCRs) biogenesis in the endoplasmic reticulum and their transport to the plasma membrane, has started to shed light on these poorly characterized mechanisms. Using a bioluminescence resonance energy transfer based proteomic screen, we previously identified the human cornichon homolog 4 (CNIH4) as a protein selectively interacting with GPCRs and positively regulating their ER export. In the present study, we report that a previously uncharacterized protein, transmembrane protein 9 (TMEM9), selectively interacts with several GPCRs and CNIH4 in the early secretory pathway. Similar to what was observed with CNIH4, over-expression of TMEM9 resulted in the intracellular trapping of the receptor. Over-expression of both proteins together restored the normal trafficking of a receptor and co-expression of TMEM9 potentiated the ability of CNIH4 to rescue the maturation of an ER-retained mutant receptor. These results suggest that CNIH4 and TMEM9 form a stoichiometric complex regulating GPCR maturation.

Introduction

Forming the largest family of cell-surface signal transducing molecules, G protein coupled receptors regulate a vast array of physiological processes and, as such, represent major pharmacological targets (1). The mechanisms regulating GPCR signalling at the plasma membrane have been extensively studied and several post-translational modifications and G protein coupled receptors-interacting proteins involved in the signalling, desensitization, internalization and degradation of the receptors have been identified and characterized (2-6). In contrast, much less is known about the control of GPCRs biogenesis inside the endoplasmic reticulum (ER) and their subsequent transport to the plasma membrane. The therapeutic relevance of these processes is highlighted by the existence of many disease-causing mutations that lead to improper folding of GPCRs and their retention inside the cells (7, 8). Examples of these include nephrogenic diabetes insipidus (NDI), retinitis pigmentosa and early-onset obesity that results from conformational mutations of the V2 vasopressin receptor, rhodopsin and the melanocortin-4 receptor, respectively (9-11).

GPCRs are co-translationally inserted in the ER where several chaperones and folding enzymes ensure that only well-folded proteins are transported to their final destination, whereas aberrant folding products are targeted for degradation. (12). Receptor export from the ER is mediated by COPII-coated vesicles that are responsible for the transport of proteins from ER-exit sites to the Golgi apparatus (13, 14) where the receptors will be directed to the plasma membrane (15). The sequential retrieval and addition of different carbohydrates along the secretory pathway creates different glycosylation profiles of the receptors which can be used to monitor their maturation status (16).

Evidences obtained in recent years suggest that receptor folding and export from the ER is a limiting step in GPCR biogenesis that is tightly regulated and involves many proteins (17, 18). General chaperones involved in the folding of several proteins in the ER, including calnexin, BiP and GRP94, have been shown to interact with some GPCRs and to be important for their maturation (18-23). Additional proteins have also been identified that selectively control the trafficking of some receptors suggesting that GPCRs might also need the assistance of specialized chaperones or export proteins for their efficient maturation (18). Among these export factors, some are transmembrane proteins like RAMPs (receptor

activity-modifying proteins) and MRAP (melanocortin 2 receptor accessory protein) that are needed for the cell-surface targeting of the calcitonin receptor like receptor and the MC2 melanocortin receptor (24-27). Another example is DRiP78, an ER-localized transmembrane chaperone of the Hsp40 family, which interacts with a well-conserved FX3FX3F motif in the C-terminus of GPCRs and regulates the maturation of several receptors (28-30). A recent study revealed that hundreds of resident proteins of the secretory pathway remained uncharacterized raising the possibility that many more proteins could be involved in the regulation of GPCR maturation (31).

In a previous study, we used a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-based screening assay to identify novel GPCR partners localized in the secretory pathway (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol.). For the purpose of that screening, we used a subset of ORFs fused to YFP that encode for proteins localized in the ER and Golgi apparatus that were part of a larger library where ~1200 uncharacterized ORFs were subcloned in fusion with eYFP at their C-terminus in order to determine their cellular localization and possible function (32, 33). Human cornichon homolog 4 (CNIH4), a previously uncharacterized ER-localized transmembrane protein, was found to selectively interact with GPCRs and to positively regulate their forward trafficking possibly via the formation of a complex with COPII-coat proteins (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol.). The down-regulation and over-expression of CNIH4 both resulted in intracellular retention of the receptor indicating that over-expression of CNIH4 has a dominant negative effect that may be caused by the titration of another component of the ER export process. However, very little is known about CNIH4 and its cellular partners. In order to gain a better understanding of the mechanisms of action of CNIH4 on GPCR trafficking, the same library of ER-Golgi resident ORFs was screened using CNIH4 as bait. Among the several potential interactors identified, transmembrane protein 9 (TMEM9), a protein that belongs to a novel family of conserved integral membrane protein of unknown functions (34), was found to selectively interact both with CNIH4 and several GPCR. We report here that a stoichiometric complex between CNIH4 and TMEM9 plays an important role in the ER exit of GPCRs.

RESULTS

Identification of CNIH4 interactors localized in the secretory pathway

In order to identify proteins interacting with CNIH4 we applied a similar screening strategy to the one employed previously, this time using CNIH4 fused at its N-terminus with Rluc as bait. Rluc-CNIH4 and each of the individual 86 ORF-YFPs that were found to be localized along the secretory pathway were co-transfected in HEK 293 cells and the BRET signal was measured. V2R-YFP was included as a positive control in the screening as it is known to interact with CNIH4 (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol.). As seen in Figure 1, 19 of the 86 preys gave a BRET signal significantly higher than the BRET measured between soluble YFP and Rluc-CNIH4 that was used as a measure of the background signal resulting from random collision between energy donor and energy acceptor proteins.

These results indicate that CNIH4 potentially interacts with many proteins localized in the secretory pathway. Interestingly, three of the proteins generating a BRET signal with CNIH4 (clones 377, 607 and 664) were also found to interact by BRET and co-immunoprecipitation with the chemokine receptor CCR5 in the previous study (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol) and thus represent proteins potentially cooperating with CNIH4 for the regulation of GPCR trafficking. Clone 664 codes for a protein named brain cell membrane protein 1 (or TMEM47) of unknown functions mainly expressed in the brain (35) whereas clone 607 is nicalin, a nicastrin-like protein, that forms a complex with NOMO involved in the regulation of Nodal signalling pathway (36, 37). The last protein is named transmembrane protein 9 (TMEM9). This protein is constituted of 183 amino acids and contains an N-terminal signal peptide, a N-terminal region characterized by three potential N-glycosylation sites and three cysteine-rich domains, a single transmembrane region and a conserved C-terminal domain containing a potential phosphorylation site (S137). It is part of a novel family of proteins of unknown functions that, similar to the cornichon protein family, are well-conserved from *Caenorhabditis elegans* to human (34). Fusion of this protein with GFP showed a ER localization and also some colocalization with the late endosomes/lysosomes marker LAMP1(34). Like CNIH4, TMEM9 is widely expressed (34) and given the high level of BRET observed between TMEM9 and both

CNIH4 and CCR5, the interaction between TMEM9 and CNIH4 and their potential roles on GPCR trafficking were further investigated.

TMEM9 interacts with CNIH4

To confirm the interaction between CNIH4 and TMEM9, we performed co-immunoprecipitation from HEK 293 cells co-transfected with Rluc-CNIH4 and TMEM9-YFP. Cell lysates immunoprecipitation of YFP-tagged TMEM9 using an anti-YFP antibody was followed by western blot analysis using an anti-Luc antibody to reveal the association of Rluc-CINH4. As observed in Figure 2A, a band of ~ 50 kDa corresponding to the addition of the MW of *Renilla* luciferase (~ 36 kDa) and CNIH4 (~ 16 kDa) is co-immunoprecipitated with TMEM9 confirming the interaction between CNIH4 and TMEM9. Interestingly, a much stronger band that migrates at approximately twice the MW of the first band is also observed, suggesting that TMEM9 preferentially interacts with a SDS-resistant dimeric form of CNIH4. To determine whether the interaction reflects a specific association or results from crowding in the ER we performed BRET titration curves where a low and constant amount of Rluc-CNIH4 was co-transfected with increasing amount of TMEM9-YFP in HEK 293 cells and the BRET signal was measured. As a negative control, another transmembrane ER-resident protein (clone 836 that corresponds to ERG28) fused to YFP was used. As seen in Figure 2B, the amplitude of the BRET signal increased as a hyperbolic function of the TMEM9-YFP, reflecting a specific interaction between the two proteins (38). The high BRET signals already observable at low expression levels of both partners suggest that the interaction seen between these two proteins is probably not caused by their over-expression. In comparison, ERG28-YFP only generated very weak BRET signal with CNIH4 even at high levels of expression supporting the specificity of the interaction between CNIH4 and TMEM9.

TMEM9 selectively interacts with several GPCRs

To determine if TMEM9 can interact with other GPCRs and/or other types of transmembrane proteins, BRET titration curves looking at the interaction between several GPCRs, CD4 and EGFR fused to *Renilla* luciferase and TMEM9-YFP, were carried out. As shown in Figure 3A, the β 2-adrenergic receptor (β 2AR), platelet-activating factor receptor (PAFR), V1a and the V2 vasopressin receptor (V2R) all yielded robust BRET

signal that increased as a hyperbolic function of the TMEM9-YFP concentration, again reflecting a specific interaction (38). In contrast, the one transmembrane domain tyrosine kinase receptor EGFR, which is also transported through the secretory pathway to the plasma membrane, only gave a very weak BRET signal that increased linearly as a function of TMEM9-YFP levels most likely reflecting random collisions, whereas almost no BRET signal could be detected between the T cell receptor CD4 and TMEM9 (Figure 3A). These results suggest that TMEM9 displays some level of selectivity in its interaction with GPCRs, similar to what was observed for CNIH4 (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol).

TMEM9 interacts with immature and mature GPCR

The association between different GPCRs and TMEM9 was further confirmed by co-immunoprecipitation experiments which also allowed to determine the maturation status of the receptor species interacting with TMEM9. The β 2AR and the V2R were selected because their glycosylation intermediates have been well characterized. The core-glycosylated (immature) ER-localized forms of these receptors migrate at a molecular weight of ~ 50 kDa for the β 2AR (Figure 3B, lane 3, left panel) and ~ 37 kDa for the V2R (Figure 3B, lane 3 right panel). The fully glycosylated (mature) forms representing receptors that have been processed by Golgi-localized glycosylation enzymes migrate at a molecular weight between ~ 60 and 80 kDa for the β 2AR (Figure 3B, lane 3, left panel) and ~ 45 to 53 kDa for the V2R (Figure 3B, lane 3 right panel). After immunoprecipitation of TMEM9-YFP, a strong co-immunoprecipitation of the immature forms of both receptors was detected by western blot (Figure 3B, lane 2, left panel and lane 1, right panel) indicating that they predominantly interact in the early secretory pathway (ER and ERGIC) similar to what was observed between the receptors and CNIH4. However, mature forms of both receptors were also co-immunoprecipitated with TMEM9, although to a significantly lesser degree than the immature forms, (Figure 3B, lane 2, Fig 3C lane 1) suggesting that TMEM9 could also interact with the receptors in the Golgi apparatus or a post-Golgi compartment. Interestingly, the higher molecular weight forms of the mature receptors don't show any interaction with TMEM9 which raise the possibility that some mature population may have completely dissociated from TMEM9 an observation that is consistent

with the low proportion of mature/immature forms associated with TMEM9 (compare the co-immunoprecipitation lanes 2 and 1 of Fig 3B-C with the loading controls lanes 3).

To further confirm the interaction between GPCRs and TMEM9, we performed the reciprocal co-immunoprecipitation where the β 2AR or V2R were first immunoprecipitated and TMEM9 was then detected by western blot. As shown in figure 3C, although TMEM9 seems to exist as both a monomeric and SDS-resistant dimeric entities (Figure 3D, lane 3), only the monomeric form of TMEM9 was seen to interact with the β 2AR or the V2R (Figure 3D, lane 1 and 4). No co-immunoprecipitation could be detected between TMEM9 and EGFR (data not shown) confirming the selectivity of interaction between TMEM9 and GPCRs.

The observation that TMEM9 was co-immunoprecipitated with mature forms of the receptor (Fig 3B and C) suggests that in addition to the interaction in the ER, some of the interactions could occur in the Golgi. To test this hypothesis, the subcellular localization of TMEM9 was assessed by confocal microscopy. As seen in figure 4, a clear colocalization between the Golgi marker GM130 and TMEM9 was observed.

Overexpression of TMEM9 causes the intracellular retention of GPCR

We next determined the effect of over-expressing TMEM9 on the maturation and cell-surface expression of GPCRs. For this purpose, HA- β 2AR or HA-PAFR were co-transfected with increasing amount of TMEM9-YFP and the maturation state of the receptors were detected by western blot using an anti-HA antibody. As shown in figure 5A, increasing levels of TMEM9 resulted in a dose-dependent decrease in fully glycosylated forms of the receptors accompanied by a concomitant increase in the core-glycosylated forms of the receptors. These results suggest that over-expression of TMEM9 leads to the accumulation of these GPCRs in an intracellular compartment before their processing through the Golgi apparatus. To validate this hypothesis, HEK 293 cells were co-transfected with HA- β 2AR or HA-PAFR and TMEM9-YFP or not, and the cell-surface expression of each receptor was assessed by surface enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). As expected, TMEM9 over-expression led to a reduction in the level of receptor present at the plasma membrane (Figure 5B). The retention of the receptor was further confirmed by confocal immunofluorescence microscopy clearly showing an intracellular

distribution of the β 2 adrenergic receptor when TMEM9 is over-expressed and a strong colocalization between the two proteins (Figure 5C). Similar results had also been observed on receptor trafficking upon CNIH4 overexpression (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol).

Intracellular retention of the β 2AR is not caused by misfolding and does not lead to degradation by the lysosome or proteasome.

As no information is available about TMEM9 functions or its protein partners, we sought to explore different mechanisms by which over-expression of this protein could lead to intracellular retention of the receptors. We first investigated if the over-expression of TMEM9 causes misfolding of the receptor that leads to its recognition by the ER quality control, retention inside the cell and degradation by the proteasome. The maturation of misfolded receptors retained in the ER can be rescued by lipophilic ligands called pharmacological chaperones that bind the receptor in the ER and stabilize a conformation compatible with ER export (9, 10, 39, 40). Thus, HEK 293 cells were co-transfected with the β 2AR and TMEM9 and treated for 16 hours with propranolol, a β 2AR cell-permeant ligand known to have pharmacological chaperoning properties (40), and the maturation of the receptor was assessed by western blot following immunoprecipitation of the receptor. As shown in figure 6A, even though propranolol efficiently rescued the maturation of a previously described ER-retained β 2AR mutant (right panel) (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol), it did not restore the trafficking of the receptor in presence of over-expressed TMEM9, indicating that the intracellular retention of the β 2AR in presence of abnormal level of TMEM9 is probably not due to misfolding of the receptor. Supporting this notion, inhibition of the proteasome by lactacystin did not result in the accumulation of receptor in cells overexpressing TMEM9 (Figure 6B). Since TMEM9 has been proposed to also localize to the lysosomes (34), we sought to determine if over-expression of TMEM9 redirects the receptors to the lysosomes which would likely result in their degradation by these organelles. As seen in figure 6B, inhibition of lysosomal function by chloroquin did not result in a discernable increase in the total receptor expression in cells co-expressing TMEM9 and the β 2AR, making it unlikely that the receptor is targeted to the lysosomes.

TMEM9 cooperates with CNIH4 to regulate receptor trafficking

We previously reported that both over-expression and down-regulation of CNIH4 resulted in the intracellular retention of GPCR, suggesting that its stoichiometry is important for its function on receptor trafficking (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol). As TMEM9 interacts with CNIH4 and its over-expression also leads to impaired receptor transport to the plasma membrane, we tested the possibility that TMEM9 and CNIH4 form a complex regulating GPCR maturation and that the stoichiometry of each protein in the complex is important for its functions. To verify this hypothesis, HEK 293 cells were co-transfected with β 2AR, CFP-CNIH4 and increasing amount of TMEM9-YFP, and the total expression and maturation state of the receptor was assessed by western blot analysis. As shown in Figure 7A, even though over-expression of TMEM9 alone caused a decrease in the maturation of the receptor (upper panel, lane 2), it rescued the total expression and maturation of the β 2AR in presence of over-expressed CNIH4 in a dose-dependent manner (upper panel, lane 3-8). The increase in maturation was also associated with an increase in the number of receptor at the cell-surface confirming the restoration of receptor trafficking (Figure 7B). No changes in the CNIH4 expression level was observed upon TMEM9 over-expression (Figure 7A, middle panel), eliminating the possibility that the rescue of the receptor maturation resulted from a lower expression of CNIH4 in the presence of TMEM9.

These results could be explained by a simple mechanism where TMEM9 displaces CNIH4 from the receptor, thus allowing it to traffic normally. The decrease in the amount of CNIH4 co-immunoprecipitated with the receptor in presence of TMEM9, even though more β 2AR is present inside the cells (Figure 7A lower panel), points toward this possibility. Another potential explanation is that as stated before, TMEM9 and CNIH4 are part of a complex where the relative level of each protein is important. In this case, the lower interaction observed between CNIH4 and the β 2AR in presence of TMEM9 would be explained by the fact that most of the receptor is transported to the cell-surface normally, therefore reducing the interaction with CNIH4 in the ER. To discriminate between these two possibilities, we took advantage of a previous observation that low levels of exogenous CNIH4 can partially rescue the maturation of an ER-retained β 2AR-A7 mutant (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol). When expressed alone and as already shown in Fig 6,

β 2AR-A7 migrates as a ~50kDA species representing the core glycosylated immature form of the receptor. If TMEM9 simply blocks the interaction between CNIH4 and the receptor, its over-expression should abolish the rescue action of CNIH4. As seen in figure 8 lane 3, co-expression of CNIH4 with the mutant β 2AR-A7 decreased the immature receptor species while simultaneously increasing mature forms of the β 2AR-A7. Co-expression of TMEM9 with CNIH4, did not prevent the rescue action of CNIH4 but rather enhanced the expression level of both immature and mature forms of the receptor (Figure 8, lane 4 and 5) even though TMEM9 had no effect when expressed alone (Figure 8, lane 2). Interestingly, a higher expression level of TMEM9 was less efficient in promoting the expression of the receptor in presence of CNIH4 (figure 8, lane 6), again suggesting that proper stoichiometry of both proteins is important for their function in GPCR trafficking. These results cannot be reconciled with a simple model where TMEM9 dislodges CNIH4 from the receptor allowing it to be transported out of the ER. In light of these results, we propose that TMEM9 and CNIH4 form a complex regulating GPCR export from the ER.

DISCUSSION

Using a BRET-based screening assay, we identified transmembrane protein 9 as a novel protein interacting with several GPCRs and CNIH4, regulating receptor trafficking to the plasma membrane.

We had previously identified CNIH4 as an ER-localized transmembrane protein positively regulating GPCR export from the ER (Sauvageau *et al.*, in preparation). Knock-down and over-expression of this protein both resulted in intracellular retention of the receptor suggesting that the dominant negative effect caused by elevated levels of CNIH4 could be due to the titration of another component regulating GPCR maturation and/or trafficking. The ability of CNIH4 expressed at low levels to promote the ER-exit of an ER-retained mutant form of the β 2AR while higher expression of CNIH4 failed to rescue the forward trafficking of the mutant receptor is consistent with this notion. CNIH4 was also shown to interact, directly or indirectly, with the COPII inner coat heterodimer Sec23/24 and was suggested to act as a cargo receptor recruiting GPCRs in COPII vesicles consistent with the proposed functions of cornichon homologs in yeast and *Drosophila* (41, 42) (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol). Thus, Sec23/24 could represent the factor titrated by CNIH4 over-expression. However, inhibition of COPII functions should result in trafficking hindrance of most secreted proteins as they are thought to be responsible for all protein transport from the ER to the Golgi (43). Compare to the strong decrease of cell-surface expression of several GPCRs upon CNIH4 over-expression, only a minimal effect could be observed for the T-cell receptor CD8 (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol) suggesting that the protein titrated by CNIH4 could be more specific to GPCR trafficking.

Our findings that TMEM9 interacts with both CNIH4 and GPCRs suggest that it could represent the protein titrated upon over-expression of CNIH4. Consistent with this notion, as was the case for CNIH4, over-expression of TMEM9 promotes the retention of the β 2AR inside the cells, most likely in the ER, as it leads to an increase in the core-glycosylated form of the receptor and a diffuse intracellular distribution. Over-expression of both proteins together rescued the maturation and cell-surface expression of the receptor strongly suggesting that the stoichiometry of the two proteins is important for the normal trafficking of the receptor. This idea is further supported by the observation that co-expression of TMEM9 at low levels potentiates the ability of CNIH4 to increase the

maturation of an ER-retained β 2AR mutant, even though TMEM9 has no effect alone, but that the synergistic effect is much weaker at higher level of TMEM9. Both protein are ubiquitously expressed and present in the cell line used in this study (data not shown). Down-regulation of CNIH4 has already been shown to decrease GPCR trafficking. Unfortunately, we were unable to knock-down TMEM9 with the siRNA tested and the importance of endogenous level of this protein in the maturation of the receptors remains to be investigated.

BRET titration curves looking at the interaction between TMEM9 and different types of transmembrane proteins revealed a selectivity towards G protein coupled receptors similar to what was observed for CNIH4. The similar selectivity of the two proteins toward GPCRs is consistent with the notion that they may form a selective binary complex interacting with only a subclass of transmembrane proteins. The apparent selectivity toward GPCR vs other transmembrane proteins such as EGFR or CD4 for both CNIH4 and TMEM9 is a remarkable feature. It will be interesting to see if such a restricted selectivity will hold as a larger number of potential partners are tested for their physical and functional interactions with the two ER-export factors. Further work will be needed to determine how CNIH4 and TMEM9 cooperate to control GPCR export from the ER. Both belong to novel protein families of poorly characterized functions. The strong BRET and co-immunoprecipitation observed between either TMEM9/CNIH4, CNIH4/receptor or TMEM9/receptor without the expression of the third partner, suggest that none of these proteins is necessary to bring the others together. TMEM9 could contribute to the CNIH4-promoted recruitment of GPCRs to COPII vesicles either by allowing the localization of a CNIH4/TMEM9/GPCR complex at the ER-exit sites or by increasing CNIH4 affinity for COPII-coat proteins. We have previously observed that CNIH4 interacts only with immature GPCRs indicating that they dissociates early in the secretory pathway (Sauvageau *et al.*, Submitted to J, Cell Biol). This dissociation may be necessary at some point to allow the receptor to continue its trafficking to the plasma membrane and the presence of TMEM9 may favour the disengagement of CNIH4 from the receptor. Interestingly, we observed that, contrary to what was observed for CNIH4, a certain proportion of TMEM9 interacts with mature form of the receptor indicating that some TMEM9 molecules remain associated with the receptor after it is released from CNIH4 as it traffics through the Golgi apparatus. Thus, TMEM9 could also control GPCR trafficking

from the Golgi. Prolonged associations between escort proteins and GPCRs have been observed many times before (26, 44-46). For example, in addition to be required for the ER export of the CRLR, RAMPs also traffic to the plasma membrane with the receptor where they affect their pharmacology, agonist-induced internalization and recycling (25, 47, 48). Whether TMEM9 dissociates from the receptors in the Golgi apparatus or remains associated with them at the plasma membrane formally remains to be investigated. However, the low proportion of mature receptor forms associated with TMEM9 couple to the lack of detectable TMEM9 immunoreactivity at the plasma membrane strongly suggests that the dissociation occurs at the Golgi apparatus level.

In one of the only 3 papers studying TMEM9, in addition to its ER localization, an association with lysosomal and late endosomal compartments was reported suggesting a potential role in targeting proteins for degradation (34). However, in the present study, no accumulation of receptors was observed upon inhibition of the lysosomes in cells over-expressing TMEM9, suggesting that intracellular retention of the receptor caused by TMEM9 is not due to altered targeting to lysosomes. The endosomal and lysosomal TMEM9 could be involved in post-endocytic sorting of the receptors controlling whether they are recycled or degraded after constitutive or agonist-induced internalization from the plasma membrane as seen for other proteins like β -arrestin, EBP50/NHERF and GASP (G protein-coupled receptor-associated sorting protein) (54-56). However, the demonstration of such a role for TMEM9 in the endocytic pathway would require additional studies.

A close homolog of TMEM9, called TMEM9B that shares 57 % of amino acids identity with TMEM9, has also been identified. (57). Expression of this homolog was shown to be required for the activation of NF- κ B and MAPK pathways as well as cytokine production in response to inflammatory stimuli (57), suggesting that TMEM9 could be involved in other cellular functions besides intracellular trafficking. Interestingly, several GPCRs have been shown to activate both NF- κ B and MAPK signalling pathway raising the intriguing possibility that through its interaction with GPCRs, TMEM9 could be involved in signal transduction. It would also be interesting to determine if TMEM9B can interact with GPCRs or other types of transmembrane proteins and if it shares its homolog functions in regulating the trafficking of proteins. Unfortunately, relatively little information can be deduced from the evolutionary conservation of TMEM9 homologs

concerning their possible roles in either signalling or protein trafficking. Indeed, although TMEM9 is well-conserved in evolution, sharing 95 % amino acids identity with its homolog in the mouse, 76 % with its homolog in the fish *Takifugu rubripes*, 31 % in the fly *Drosophila melanogaster* and 28 % in the worm *Caenorhabditis elegans* (34), no information is available concerning their possible roles in these organisms. Despite the little information available concerning TMEM9 to date, our study clearly identify this single transmembrane domain protein as a novel G protein coupled receptor interacting protein that cooperates with CNIH4 in regulating receptor export from the ER. The fact that it can form a ternary complex with both CNIH4 and several GPCRs and that the stoichiometry of interaction is crucial for GPCR export clearly indicate that TMEM9 and CNIH4 act as a functional unit. However, the precise mechanisms by which the two proteins control GPCR maturation, remains to be elucidated.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with L-glutamine and fetal bovine serum were purchased from Wisent (St-Bruno, Qc, Canada). Poly-D-Lysine, leupeptin, benzamidine, soybean trypsin inhibitor, (-)-alprenolol and cloroquin were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Mississauga, On, Canada). Lactacystin was from Cayman Chemical. Horseradish peroxidase-conjugated anti-HA antibody (3F10), endoglycosidase H and N-glycosidase F were obtained from Roche diagnostics (Indianapolis, IN). Linear polyethyleneimine (PEI) was from Polysciences. Coelenterazine h was purchased from Nanolight technology (Pinetop, AZ). Mouse anti-HA (12CA5) and anti-myc (9E10) were produced in our core facility as ascetic fluids. Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG were from GE Healthcare (Chalfont St.Giles, Buckinghamshire, UK). Anti-Sec23 and anti-TMEM9 antibodies were from Santa-Cruz. The anti-GFP antibody was from Clontech while the anti-GM130 was from Roche diagnostics (Indianapolis, IN). The alkaline phosphatase kit was obtained from Bio-Rad. The 96 well white plates were from PerkinElmer.

Eucaryotic expression vectors

The plasmids encoding for the 109 eYFP-fused ORFs, including hmTMEM9-YFP, clone 836-YFP and CFP-hmCNIH4, are a subset of the library created for the LIFEdb project (32, 33). The pcDNA3 poly-His-HA-hm β 2AR (58), the pRK5-myc-V2R, V1a-Rluc and V2R-Rluc (59), CD4-Rluc (60), were previously described. The PAFR were fused to RLuc by subcloning it, minus the stop codon, into a vector that contains the RLuc downstream of the multiple cloning site. The β 2AR-A7 and β 2AR-A7-Rluc mutant were constructed by PCR site-directed mutagenesis using the wild-type pcDNA3 poly-His-HA- β 2AR and β 2AR-Rluc. EGFR was amplified by PCR and subcloned in-frame 5' of the RLuc in the pcDNA3.1 vector to create the EGFR-Rluc construct. The PAFR was amplified by PCR and subcloned downstream of the HA epitope in a pIRESpuro3 vector.

Cell-culture and transfection

Human embryonic kidney 293 cells (HEK293) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % fetal bovine serum and 2 mM L-glutamine at 37 °C in a humidified chamber at 95% air and 5% CO₂. The cells were seeded at a density of 1.25 X 10⁵/well for 24 well plates, 5 X 10⁵/well for 6 well plates or 3 X 10⁶ for 10 cm dishes, 24 hours before transfection. 0.625 µg/well for 24 well plates, 2.5 µg/well for 6 well plates or 6 µg for 10 cm dishes of total DNA were used for transient transfection linear polyethyleneimine (3 µg/ µg of plasmid).

BRET-based screening assay

ORFs-YFP and Rluc-CNIH4 were co-transfected in 6 well plates seeded with HEK293 cells. Approximately 48 hours after transfection, cells were washed, detached in PBS and seeded at a density of approximately 100 000 cells/well in white opaque 96-well plates. Total fluorescence was first measured using a Packard FluoroCount™ with an excitation and emission filters set at 485 nm and 530 nm, respectively. The BRET¹ signal was measured 2 min after the addition of The BRET¹ substrate coelenterazine h (5 µM final concentration) in the Mithras LB940 plate reader from Berthold Technologies (Bad Wildbad, Germany). The same plate was then used to measure total luminescence, approximately 10 min after coelenterazine-h addition. The BRET¹ signal was calculated as a ratio of the light emitted by eYFP (530 ± 20 nm) over the light emitted by Rluc (480 ± 20 nm). Finally, the BRET net signal was calculated as the difference between the total BRET signals and the one obtained from experiments where only the Rluc plasmid had been transfected.

BRET titration curves

The various GPCRs, transmembrane proteins and CNIH4 fused to luciferase were co-transfected at a low and constant quantity with increasing quantities of TMEM9-YFP in HEK293 cells. The total fluorescence and BRET¹ signals were measured as described above.

Immunoprecipitation

HEK293 cells seeded in 10 cm dishes were transfected with the indicated plasmids. Approximately 36 hours after transfection, cells were washed with PBS then detached with PBS/EDTA (5 mM) and lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS and 10 mM *N*-ethylmaleimide) containing protease inhibitors (10 µg/ml benzamidine, 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 5 µg/ml leupeptin) for ~4 hours at 4 °C under gentle agitation. The lysates were clarified by centrifugation at 14 000 rpm for 30 minutes at 4 °C. Indicated antibody and protein-G sepharose were added to the supernatants followed by an overnight incubation at 4 °C. The precipitates were then washed five times in RIPA buffer and the proteins eluted 1 h at room temperature in 50 µl of SDS-PAGE loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.5, 4% SDS, 2 M urea, 5% glycerol, 0.1% bromophenol blue). Proteins were then resolved on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and detected by immunoblotting using the indicated antibody.

Receptor cell-surface expression by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

HEK293 cells were grown overnight in 24 well plates coated with 0.1 mg/ml poly-D-Lysine (Sigma). The cells were then transfected with the indicated constructs. Approximately 36 hours later, the medium was removed and cells were fixed with 3.7% formaldehyde in TBS for 5 minutes at room temperature followed by three times washed with TBS. Non-specific binding was blocked by incubating the cells 45 minutes in TBS/1% BSA. Cells were then incubated with an anti-HA (12CA5) antibody at a 1:1000 dilution in TBS/0.5% BSA for 1h at room temperature. Cells were then washed 3 times in TBS, briefly reblocked in TBS/1% BSA for 15 minutes and incubated 1 hour with an alkaline-phosphatase conjugated goat anti-mouse antibody (Bio-Rad). Following three washes with TBS, a colorimetric alkaline phosphatase substrate (Bio-Rad) was added according to the manufacturer's instructions. The colorimetric reactions were measured using a GENios Plus microplate reader (Tecan). Cells transfected with empty vectors were used to determine background.

Immunofluorescence microscopy

HEK293 cells were plated on poly-D-lysine coated coverslips and transfected with the indicated constructs (HA- β 2AR and/or TMEM9-YFP). 24 hours after transfection, cells were washed 3 times with PBS then fixed and permeabilized in 2% PFA/0.1% Triton X-100 in PBS for 20 minutes. Cells were treated with an Alexa-647 anti GM130 antibody or an anti-HA (12CA5) antibody and an Alexa 647 conjugated secondary antibody. The samples were analysed by confocal microscopy using a Zeiss510 LSM META laser scanning microscope with a Plan Apochromat 63x, NA 1.4, DIC oil objective at room temperature. The images were captured and analysed using the LSM510 v.3.2 software. Laser excitation and emission filters used were as follows: YFP: λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 505-530 nm, Alexa 647 λ_{ex} = 633 nm, λ_{em} = LP650 nm.

REFERENCES

1. Allen JA, Roth BL. Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011;51:117-144.
2. Ritter SL, Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(12):819-830.
3. Hislop JN, von Zastrow M. Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors. *Traffic* 2011;12(2):137-148.
4. Qanbar R, Bouvier M. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther* 2003;97(1):1-33.
5. Daaka Y. S-nitrosylation-regulated GPCR signaling. *Biochim Biophys Acta* 2011.
6. Kelly E, Bailey CP, Henderson G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:S379-388.
7. Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K. Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* 2004;104(3):173-206.
8. Thompson MD, Percy ME, McIntyre Burnham W, Cole DE. G protein-coupled receptors disrupted in human genetic disease. *Methods Mol Biol* 2008;448:109-137.
9. Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 2000;105(7):887-895.
10. Rene P, Le Gouill C, Pogozheva ID, Lee G, Mosberg HI, Farooqi IS, Valenzano KJ, Bouvier M. Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335(3):520-532.
11. Noorwez SM, Kuksa V, Imanishi Y, Zhu L, Filipek S, Palczewski K, Kaushal S. Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Biol Chem* 2003;278(16):14442-14450.
12. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(3):181-191.
13. Dupre DJ, Robitaille M, Ethier N, Villeneuve LR, Mamarbachi AM, Hebert TE. Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J Biol Chem* 2006;281(45):34561-34573.
14. Dong C, Zhou F, Fugetta EK, Filipeanu CM, Wu G. Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase. *Cell Signal* 2008;20(6):1035-1043.
15. Dong C, Filipeanu CM, Duvernay MT, Wu G. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768(4):853-870.
16. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004;73:1019-1049.
17. Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M. Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem* 2000;275(18):13727-13736.
18. Achour L, Labbe-Jullie C, Scott MG, Marullo S. An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29(10):528-535.
19. Siffroi-Fernandez S, Giraud A, Lanet J, Franc JL. Association of the thyrotropin receptor with calnexin, calreticulin and BiP. Effects on the maturation of the receptor. *Eur J Biochem* 2002;269(20):4930-4937.
20. Mizrahi D, Segaloff DL. Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors. *Mol Endocrinol* 2004;18(7):1768-1777.

21. Rozell TG, Davis DP, Chai Y, Segaloff DL. Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin. *Endocrinology* 1998;139(4):1588-1593.
22. Morello JP, Salahpour A, Petaja-Repo UE, Laperriere A, Lonergan M, Arthus MF, Nabi IR, Bichet DG, Bouvier M. Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus. *Biochemistry* 2001;40(23):6766-6775.
23. Rosenbaum EE, Hardie RC, Colley NJ. Calnexin is essential for rhodopsin maturation, Ca²⁺ regulation, and photoreceptor cell survival. *Neuron* 2006;49(2):229-241.
24. Hilairiet S, Foord SM, Marshall FH, Bouvier M. Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem* 2001;276(31):29575-29581.
25. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998;393(6683):333-339.
26. Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P, Huebner A, Cheetham ME, Clark AJ. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet* 2005;37(2):166-170.
27. Cooray SN, Almiro Do Vale I, Leung KY, Webb TR, Chapple JP, Egertova M, Cheetham ME, Elphick MR, Clark AJ. The melanocortin 2 receptor accessory protein exists as a homodimer and is essential for the function of the melanocortin 2 receptor in the mouse γ 1 cell line. *Endocrinology* 2008;149(4):1935-1941.
28. Bermak JC, Li M, Bullock C, Zhou QY. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol* 2001;3(5):492-498.
29. Malaga-Dieguez L, Yang Q, Bauer J, Pankevych H, Freissmuth M, Nanoff C. Pharmacochaperoning of the A1 adenosine receptor is contingent on the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol* 2010;77(6):940-952.
30. Leclerc PC, Auger-Messier M, Lanctot PM, Escher E, Leduc R, Guillemette G. A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology* 2002;143(12):4702-4710.
31. Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T, Bergeron JJ. Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* 2006;127(6):1265-1281.
32. Mehrle A, Rosenfelder H, Schupp I, del Val C, Arlt D, Hahne F, Bechtel S, Simpson J, Hofmann O, Hide W, Glatting KH, Huber W, Pepperkok R, Poustka A, Wiemann S. The LIFEdb database in 2006. *Nucleic Acids Res* 2006;34(Database issue):D415-418.
33. Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R, Wiemann S. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep* 2000;1(3):287-292.
34. Kveine M, Tenstad E, Dosen G, Funderud S, Rian E. Characterization of the novel human transmembrane protein 9 (TMEM9) that localizes to lysosomes and late endosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297(4):912-917.
35. Christophe-Hobertus C, Szpirer C, Guyon R, Christophe D. Identification of the gene encoding Brain Cell Membrane Protein 1 (BCMP1), a putative four-transmembrane protein distantly related to the Peripheral Myelin Protein 22 / Epithelial Membrane Proteins and the Claudins. *BMC Genomics* 2001;2:3.
36. Haffner C, Dettmer U, Weiler T, Haass C. The Nicastrin-like protein Nicalin regulates assembly and stability of the Nicalin-nodal modulator (NOMO) membrane protein complex. *J Biol Chem* 2007;282(14):10632-10638.

37. Haffner C, Frauli M, Topp S, Irmeler M, Hofmann K, Regula JT, Bally-Cuif L, Haass C. Nicalin and its binding partner Nomo are novel Nodal signaling antagonists. *EMBO J* 2004;23(15):3041-3050.
38. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2002;277(47):44925-44931.
39. White E, McKenna J, Cavanaugh A, Breitwieser GE. Pharmacochaperone-mediated rescue of calcium-sensing receptor loss-of-function mutants. *Mol Endocrinol* 2009;23(7):1115-1123.
40. Kobayashi H, Ogawa K, Yao R, Lichtarge O, Bouvier M. Functional rescue of beta-adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones. *Traffic* 2009;10(8):1019-1033.
41. Bokel C, Dass S, Wilsch-Brauninger M, Roth S. Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGFalpha-like growth factor Gurken. *Development* 2006;133(3):459-470.
42. Powers J, Barlowe C. Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell* 2002;13(3):880-891.
43. Russell C, Stagg SM. New insights into the structural mechanisms of the COPII coat. *Traffic* 2010;11(3):303-310.
44. Baker EK, Colley NJ, Zuker CS. The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *EMBO J* 1994;13(20):4886-4895.
45. Dwyer ND, Troemel ER, Sengupta P, Bargmann CI. Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *Cell* 1998;93(3):455-466.
46. Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* 2004;119(5):679-691.
47. Bomberger JM, Spielman WS, Hall CS, Weinman EJ, Parameswaran N. Receptor activity-modifying protein (RAMP) isoform-specific regulation of adrenomedullin receptor trafficking by NHERF-1. *J Biol Chem* 2005;280(25):23926-23935.
48. Bomberger JM, Parameswaran N, Hall CS, Aiyar N, Spielman WS. Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J Biol Chem* 2005;280(10):9297-9307.
49. Wu F, Wang P, Zhang J, Young LC, Lai R, Li L. Studies of phosphoproteomic changes induced by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK) highlight deregulation of tumor necrosis factor (TNF)/Fas/TNF-related apoptosis-induced ligand signaling pathway in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(7):1616-1632.
50. Mayya V, Lundgren DH, Hwang SI, Rezaul K, Wu L, Eng JK, Rodionov V, Han DK. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal* 2009;2(84):ra46.
51. Okamoto Y, Shikano S. Phosphorylation-dependent C-terminal binding of 14-3-3 proteins promotes cell surface expression of HIV co-receptor GPR15. *J Biol Chem* 2011;286(9):7171-7181.
52. Jamora C, Yamanouye N, Van Lint J, Laudenslager J, Vandenheede JR, Faulkner DJ, Malhotra V. Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell* 1999;98(1):59-68.
53. Irannejad R, Wedegaertner PB. Regulation of constitutive cargo transport from the trans-Golgi network to plasma membrane by Golgi-localized G protein betagamma subunits. *J Biol Chem* 2010;285(42):32393-32404.
54. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 2000;275(22):17201-17210.

55. Cao TT, Deacon HW, Reczek D, Bretscher A, von Zastrow M. A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 1999;401(6750):286-290.
56. Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, Murray SR, Von Zastrow M. Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 2002;297(5581):615-620.
57. Dodeller F, Gottar M, Huesken D, Iourgenko V, Cenni B. The lysosomal transmembrane protein 9B regulates the activity of inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 2008;283(31):21487-21494.
58. Lavoie C, Mercier JF, Salahpour A, Umapathy D, Breit A, Villeneuve LR, Zhu WZ, Xiao RP, Lakatta EG, Bouvier M, Hebert TE. Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* 2002;277(38):35402-35410.
59. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* 2003;17(4):677-691.
60. Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupre DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hebert TE. Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 13):2807-2818.

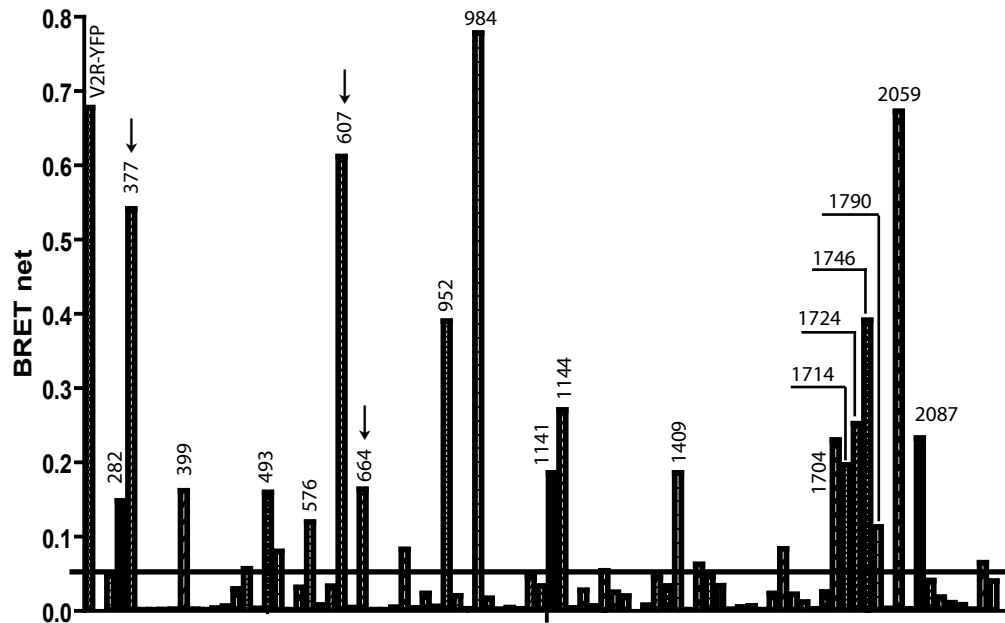


Figure 1. Identification of TMEM9 as a CNIH4 interactor using BRET-based screening. Each of the individual 86 ORFs-YFP and Rluc-CNIH4 were co-transfected in HEK 293 cells and the BRET signal was measured. The cutoff line is the BRET measured when soluble YFP is expressed with Rluc-CNIH4. V2R-YFP was used as a positive control as it is known to interact with CNIH4. 19 potential interactors were obtained and are labeled with the identification number (ID) assigned to them in the library.

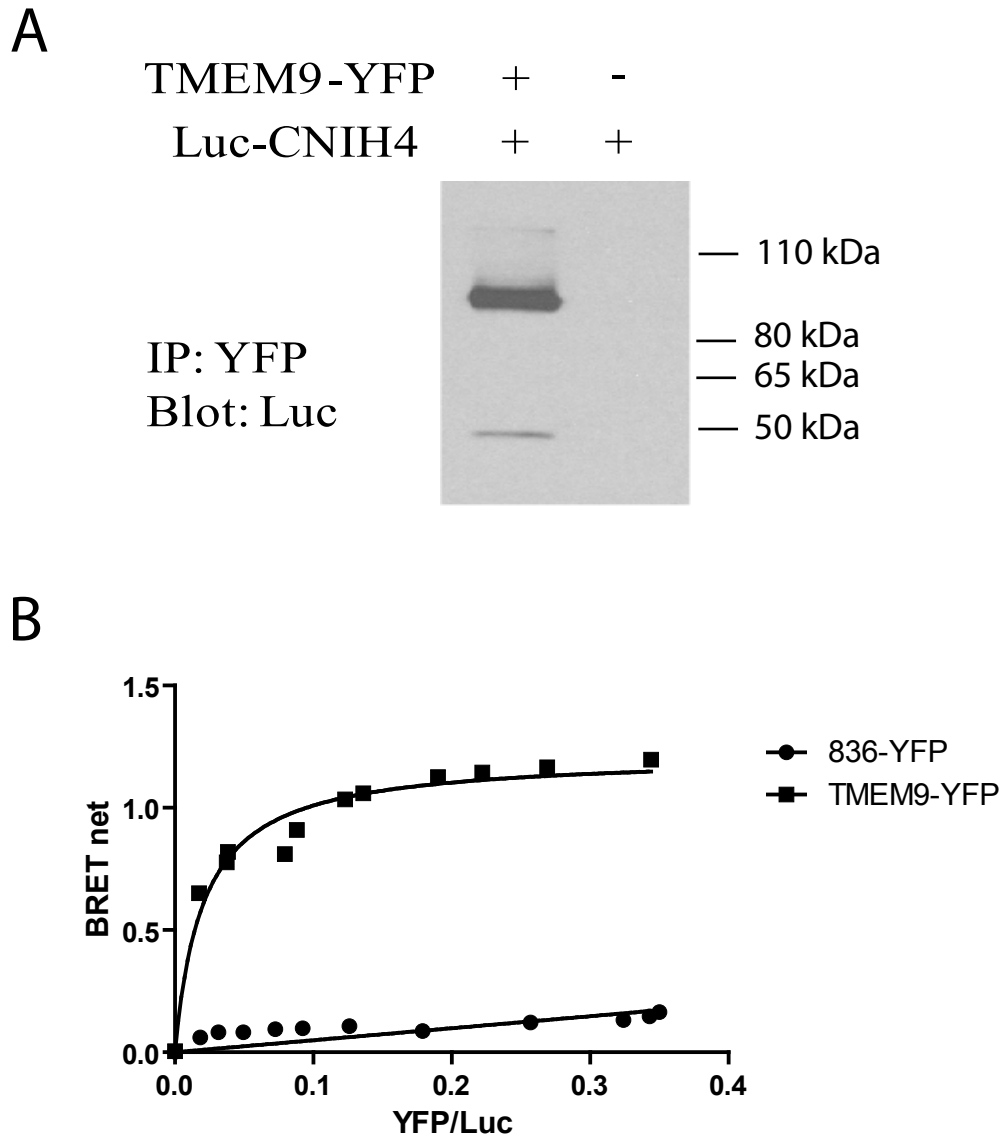


Figure 2: Interaction between TMEM9 and CNIH4. A) Co-immunoprecipitation of CNIH4 with TMEM9 in HEK 293 cells co-expressing Luc-CNIH4 and TMEM9-YFP or not. TMEM9 was immunoprecipitated using a rabbit anti-GFP antibody and CNIH4 was detected by western blot using a mouse anti-Rluc antibody. B) BRET titration curves between Luc-CNIH4 and TMEM9-YFP. HEK 293 cells were transfected with a low and stable concentration of Rluc-CNIH4 and increasing concentration of TMEM9-YFP or 836-YFP and the fluorescence and BRET were measured in parallel. BRET levels are plotted as a function of the ratio of total fluorescence over total luminescence.

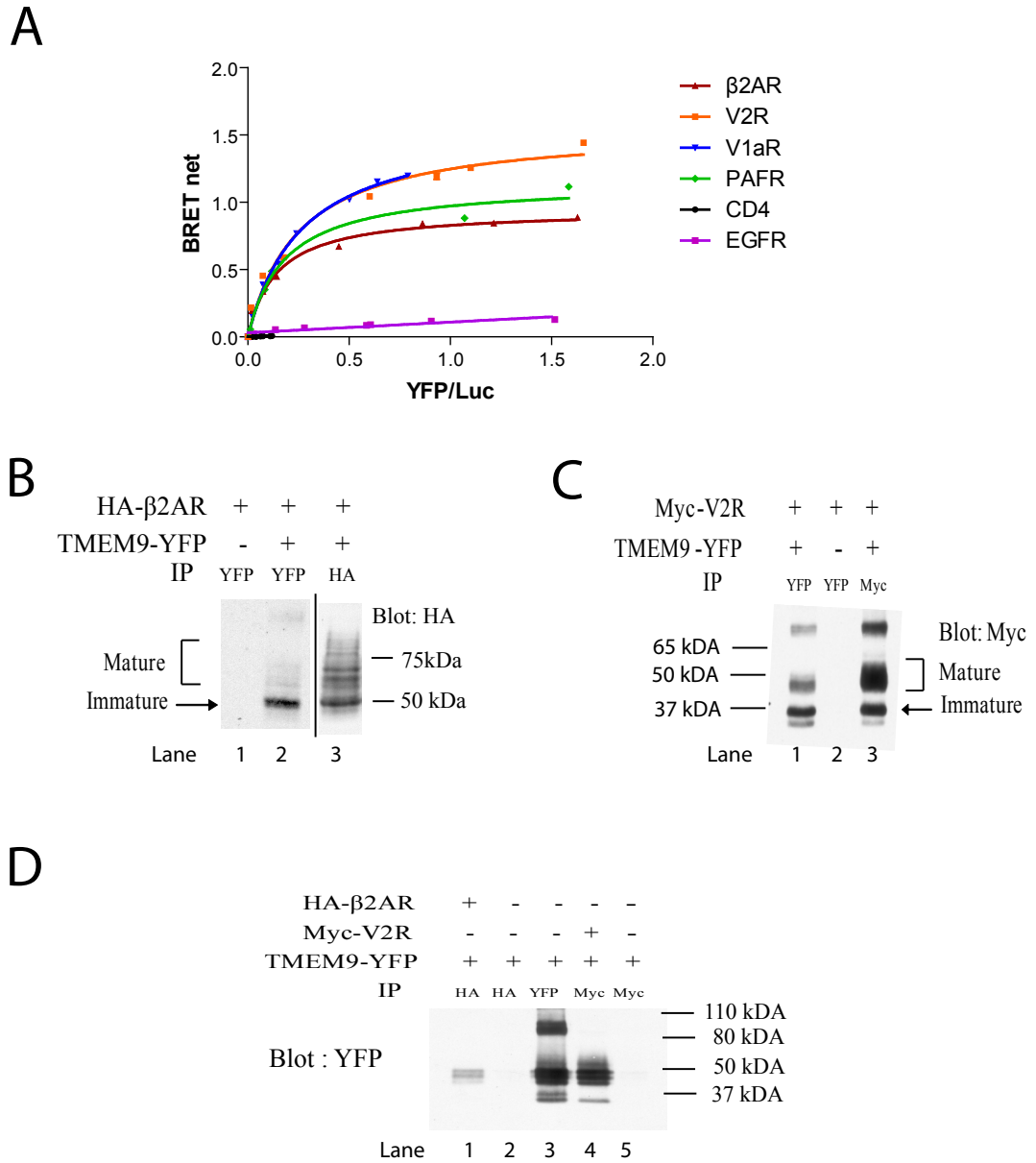


Figure 3. Interaction between multiple GPCRs and TMEM9. A) HEK 293 cells were co-transfected with fixed concentration of different GPCR (β 2AR, PAFR, V2R, V1aR) or unrelated transmembrane proteins which are also transported through the secretory pathway fused with Rluc, and increasing concentrations of TMEM9-YFP. The fluorescence and BRET were measured in parallel and the BRET levels were plotted as a function of the ratio of fluorescence over luminescence. B) Co-immunoprecipitation of β 2AR or V2R with TMEM9 in HEK 293 cells co-expressing HA- β 2AR or myc-V2R and TMEM9-YFP or not. TMEM9 was immunoprecipitated using a rabbit anti-GFP antibody and the receptors were detected by western blot using a rat anti-HA (β 2AR) or mouse anti-myc (V2R) antibody. C) Co-immunoprecipitation of TMEM9 with β 2AR or V2R in HEK 293 cells co-expressing TMEM9-YFP and HA- β 2AR or myc-V2R or not. The receptors were immunoprecipitated using a mouse anti-HA (β 2AR) or anti-myc (V2R) antibody and TMEM9 was detected by western blot using a rabbit anti-GFP antibody.

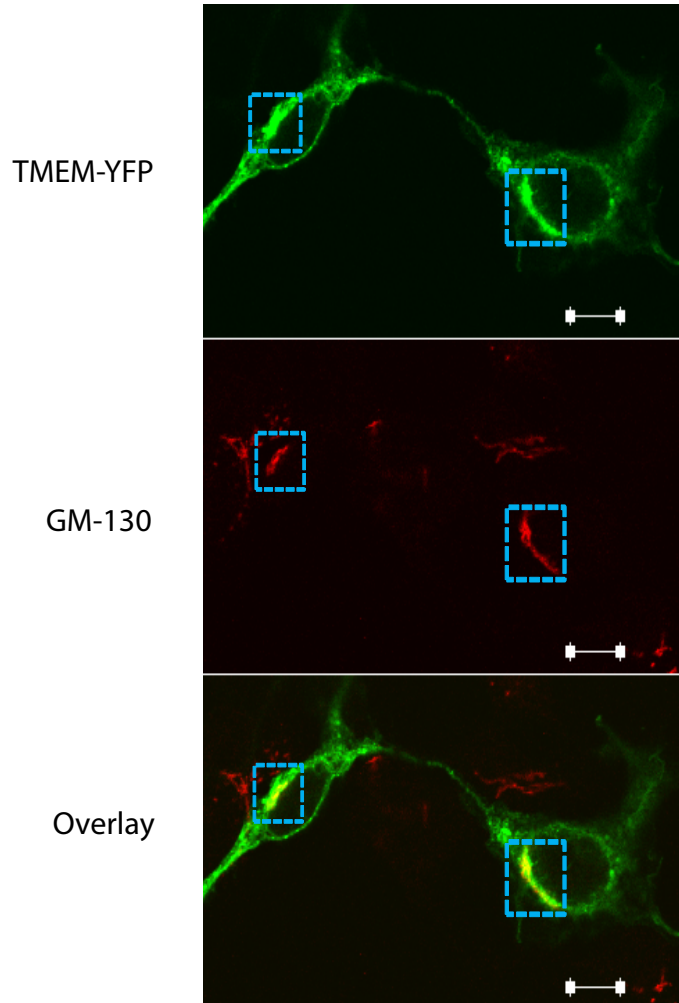


Figure 4. TMEM9 is partially localized in the Golgi apparatus. HEK 293 cells transiently expressing TMEM9-YFP were stained using an anti-GM130 conjugated with AlexaFluor647 antibody. Images were captured using a Zeiss 510 LSM META laser scanning confocal microscope. Images show the localization of TMEM9 in green and GM130 in red and their merged co-localization in yellow. Scale bar = 10 μ m.

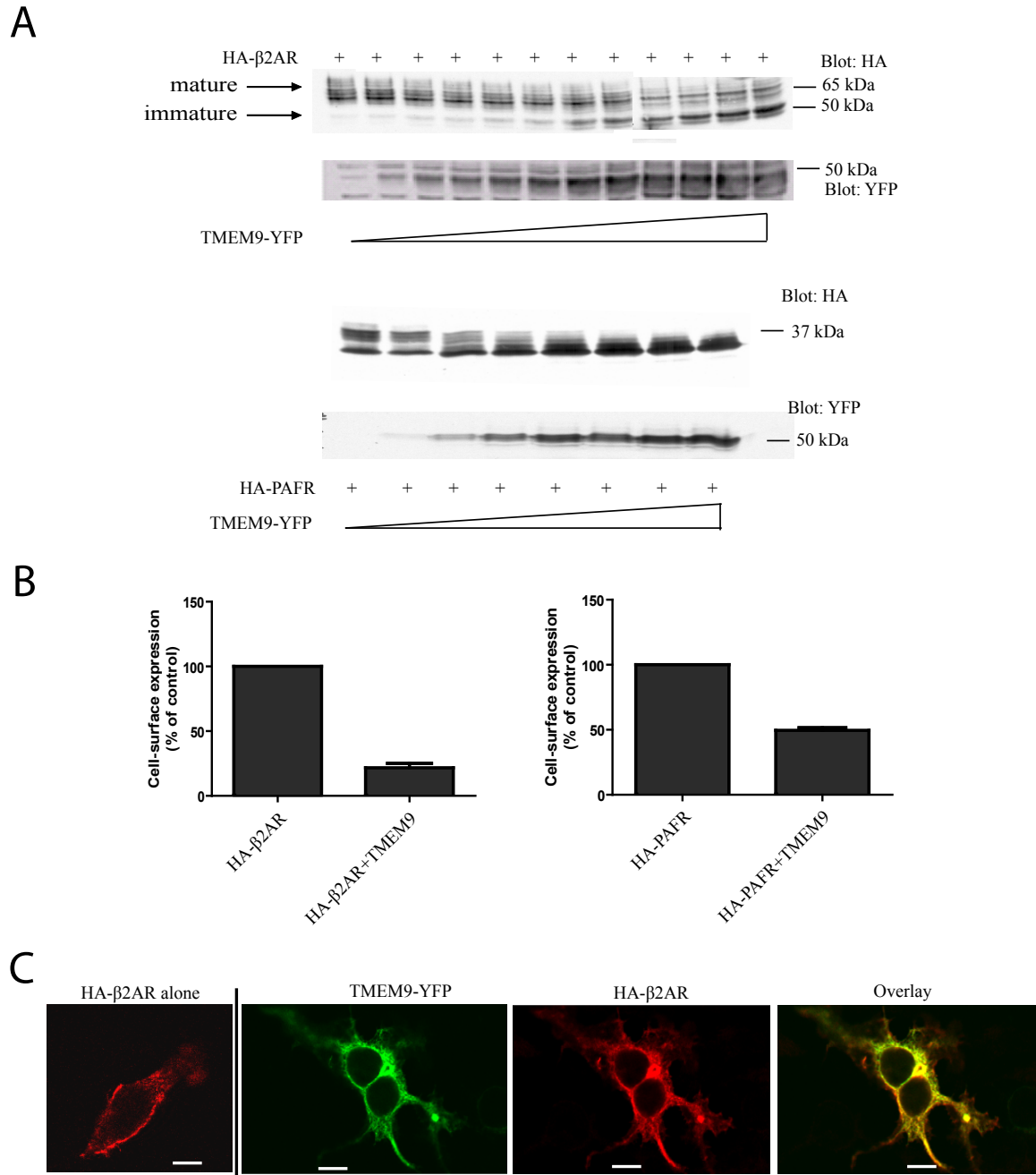
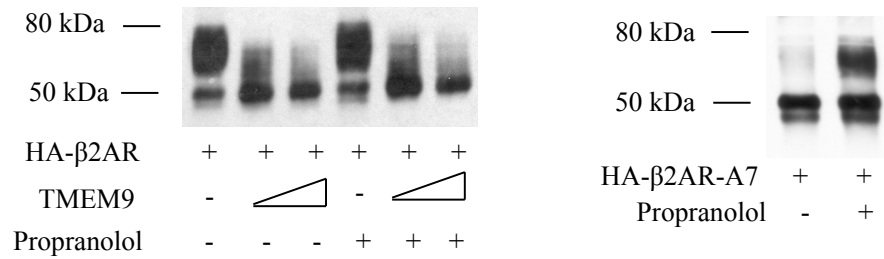
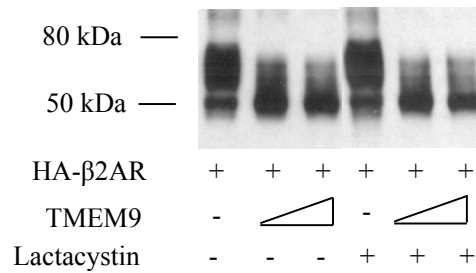


Figure 5. TMEM9 overexpression causes intracellular retention of GPCRs. A) HA-β2AR or HA-PAFR were co-transfected with increasing concentration of TMEM9-YFP or not in HEK 293 cells and the maturation status of the receptor was assessed by western blot using a mouse anti-HA antibody. B) The cell-surface expression of the HA-β2AR or HA-PAFR was measured by ELISA using a mouse anti-HA antibody in HEK 293 cells co-expressing TMEM9-YFP or not. C) At the right of the vertical black bar, HEK 293 cells transiently expressing TMEM9-YFP and HA-β2AR were stained using a mouse anti-HA and an AlexaFluor647-conjugated secondary antibody. Left of the vertical black bar is a representative image of the HA-β2AR when expressed alone. Images show the localization of TMEM9 in green and β2AR in red and their merged co-localization in yellow. Images were captured using a Zeiss 510 LSM META laser scanning confocal microscope. Scale bar = 10 μm.

A



B



C

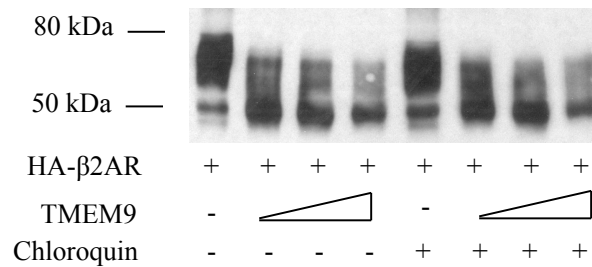


Figure 6. TMEM9 induced receptor intracellular retention is not caused by misfolding or targeting of the receptor to the proteasome or lysosome. A) Left panel: HEK 293 cells were co-transfected with HA-β2AR and different concentration of TMEM9-YFP or not and treated with propranolol for approximately 16 hours or not and the receptor was immunoprecipitated using a mouse anti-HA antibody and detected by western blot using a rat anti-HA antibody. Right Panel: HEK 293 cells transiently expressing HA-β2AR-A7 were treated with propranolol (10 μM) for approximately 16 hours or not and the receptor was detected by western blot using a rat anti-HA antibody. HEK 293 cells were co-transfected with HA-β2AR and different concentration of TMEM9-YFP or not and treated with the proteasome inhibitor lactacystin (B) or the lysosome inhibitor chloroquin (C) for 6 hours and the receptor was detected as described above.

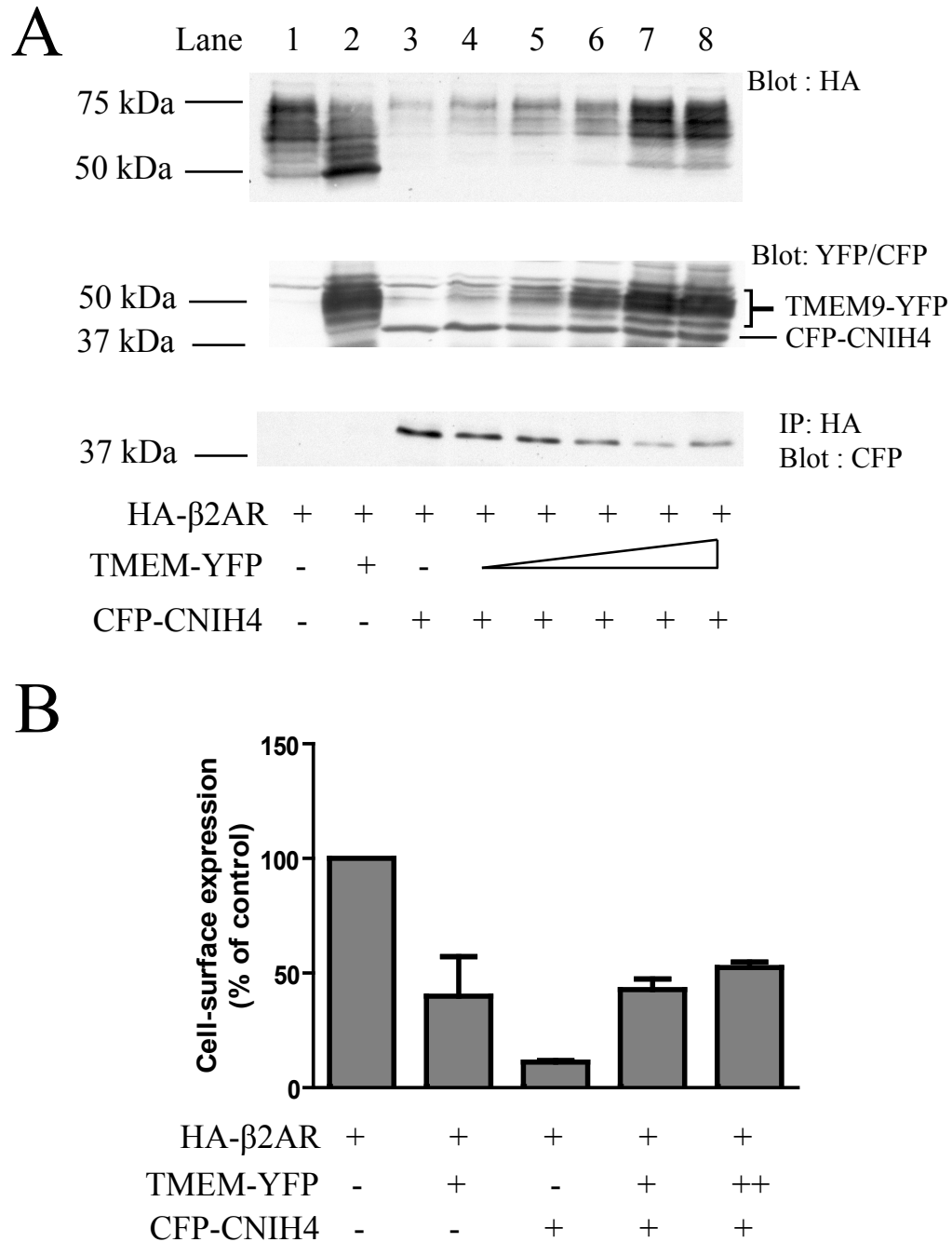


Figure 7. TMEM9 restores β2AR maturation and trafficking in presence of overexpressed CNIH4. A) HEK 293 cells were co-transfected with HA-β2AR, CFP-CNIH4 and increasing concentration of TMEM9-YFP or not. The receptor was detected by western blot using a rat anti-HA antibody (higher panel) and TMEM9 and CNIH4 were detected using a rabbit anti-GFP antibody (middle panel). The association between the β2AR and CNIH4 was assessed by immunoprecipitating the receptor and blotting for CNIH4 using an anti-GFP antibody (lower panel). B) The cell-surface expression of the β2AR was measured by ELISA in HEK 293 cells co-expressing the receptor, TMEM9-YFP, CFP-CNIH4 or both proteins.

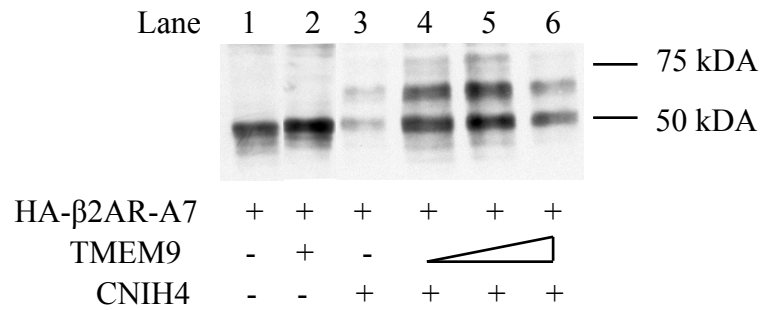


Figure 8. TMEM9 potentializes CNIH4 ability to increase the maturation of a ER-retained β 2AR mutant. HEK 293 cells were co-transfected with HA- β 2AR-A7, CNIH4 and increasing concentrations of TMEM9 or not and the receptor was immunoprecipitated using a mouse anti-HA antibody and detected by western blot using a rat anti-HA antibody.

Discussion

Les interactions protéine-protéine sont essentielles au contrôle du fonctionnement cellulaire. L'association d'une protéine à une autre peut inhiber ou potentialiser son activité ou même générer une nouvelle fonction que les deux protéines ne peuvent effectuées lorsqu'elles sont isolées. Les interactions protéines-protéines représentent un mécanisme très flexible du contrôle de l'activité cellulaire puisqu'elles peuvent être influencées de différentes façons. Tout d'abord, le niveau d'expression cellulaire des protéines est contrôlé au niveau de l'expression des gènes, de la stabilité des ARNm, de la traduction des ARNm et de la stabilité des protéines une fois synthétisées. Le niveau d'expression des différentes protéines peut donc varier énormément d'un type cellulaire à l'autre et également changer au cours du développement d'un organisme ou en fonction des conditions physiologiques. Plusieurs pathologies telles que certains cancers peuvent avoir pour causes des variations dans l'expression de certaines protéines. Les interactions protéines-protéines peuvent également être contrôlées par diverses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, palmylation, ubiquitination...) ainsi que par la localisation des protéines dans un compartiment cellulaire particulier.

L'identification des partenaires protéiques des RCPGs et la caractérisation de leurs fonctions dans la régulation de l'activité des récepteurs sont donc essentielles afin d'obtenir une meilleure compréhension de la complexité des signaux engendrés par cette importante classe de cibles pharmacologiques. Au cours des 30 dernières années, des dizaines de protéines interagissant avec les récepteurs couplés aux protéines G et contrôlant leurs mécanismes de transmission des signaux, de désensibilisation, d'internalisation et de dégradation à partir de la membrane plasmique, ont été identifiées. Ceci démontre l'importance primordiale des partenaires protéiques des RCPGs dans la régulation de leur activité. Les mécanismes contrôlant la synthèse des récepteurs dans le reticulum endoplasmique et leur transport jusqu'à la membrane plasmique représentent un aspect méconnu des processus de régulation des fonctions des RCPGs. L'acheminement des récepteurs à la surface cellulaire est sans aucun doute contrôlé par diverses protéines et l'objectif principal de cette thèse consistait à l'identification de nouveaux partenaires protéiques des RCPGs impliqués dans la maturation des récepteurs à 7 TM.

Les résultats présentés dans le premier article de cette thèse démontrent de quelle façon la technologie de BRET a été employée afin de développer une nouvelle méthode de criblage d'interactions protéines-protéines pour identifier de nouveaux partenaires potentiels des RCPGs localisés dans la voie de sécrétion. Nous avons ensuite démontré qu'une des protéines identifiées dans le crible, l'homologue de cornichon humain 4 (CNIH4), interagit sélectivement avec les RCPGs et influence positivement l'export des récepteurs à partir du RE, possiblement grâce à sa capacité de lier les protéines de l'enveloppe des vésicules COPII. L'observation que la déplétion de l'expression endogène de CNIH4 ainsi que la surexpression de cette protéine provoque la rétention des récepteurs à l'intérieur de la cellule, suggère que l'augmentation des niveaux de CNIH4 provoque un effet dominant négatif sur le transport des RCPGs qui pourrait être causé par la titration d'un autre facteur d'export des récepteurs.

Dans le deuxième article de cette thèse, nous avons donc appliqué une stratégie de criblage similaire afin d'identifier des protéines interagissant avec CNIH4 et les RCPGs. Nous avons ainsi été en mesure de démontrer que la protéine transmembranaire 9 (TMEM9) est un nouveau partenaire des RCPGs qui collabore avec CNIH4 dans le contrôle de la maturation des récepteurs. Je vais maintenant discuter du choix des techniques et contrôles employés lors de ces études, de l'interprétation des différents résultats et lorsque possible proposer des expériences qui permettraient de mieux définir les mécanismes d'action de ces protéines, dont les fonctions demeurent pour l'instant que partiellement caractérisées. Je vais terminer par une brève discussion sur le potentiel thérapeutique des recherches effectuées au cours de cette thèse.

Utilisation du BRET comme méthode de criblage d'interactions protéines-protéines

Les principes à la base de l'utilisation des techniques basées sur le transfert d'énergie de résonance pour l'étude d'interactions protéiques ainsi que les avantages du BRET sur le FRET ont déjà été décrits dans la section 3.4 de l'introduction. Par rapport aux techniques biochimiques classiques telles que la co-immunoprécipitation et le GST-pull down, le BRET permet de mesurer l'interaction entre deux protéines en temps réel dans des cellules vivantes. De plus, dans le cas des protéines transmembranaires comme les RCPGs, les techniques de co-immunoprécipitation et de GST-pull down nécessitent l'utilisation de détergents et d'agents chaotropiques afin de solubiliser les récepteurs. Ces traitements

peuvent affecter leur interaction avec plusieurs protéines particulièrement dans le cas d'interactions faibles ou temporaires. Étant donné leur faible niveau d'expression endogène et leur haut niveau d'hydrophobicité, les RCPGs sont particulièrement difficiles à purifier et nécessitent souvent d'être surexprimés à des niveaux élevés pour les études de co-immunoprécipitation. Ces hauts niveaux d'expression pourraient causer la formation de complexes qui ne seraient pas observés à des niveaux endogènes. Le signal de BRET en contraste peut être mesuré à des niveaux très faibles d'expression de chaque partenaire, qui sont aisément mesurables en quantifiant les niveaux de luminescence et de fluorescence totaux. Le BRET nécessite cependant la transfection de partenaires fusionnés à une protéine fluorescente et luminescente et se limite donc à des systèmes reconstitués. De plus, la présence d'une protéine de fusion volumineuse pourrait affecter l'interaction entre les partenaires.

La technique de deux-hybrides chez la levure, où l'interaction entre deux protéines permet de reconstituer un facteur de transcription fonctionnel menant à l'expression d'un gène rapporteur, a longtemps été l'outil privilégié pour le criblage à grande échelle d'interactions protéines-protéines. Par contre, cette technique ne peut être employée pour détecter l'interaction entre deux protéines transmembranaires. Par conséquent, l'application du deux-hybrides aux RCPGs est limitée à l'étude d'interaction entre des domaines solubles isolés (queue cytoplasmique et boucles intracellulaires) des récepteurs et des protéines solubles. Un autre problème associé à l'étude d'interaction protéine-protéine dans la levure est le contexte cellulaire radicalement différent de celui des cellules de mammifères. L'interaction entre deux protéines nécessitant la présence d'un autre facteur qui n'est pas exprimé chez la levure ne serait pas détectée dans ce contexte. Le développement d'une nouvelle technique de deux-hybrides dans la levure, basée sur la reconstitution d'une molécule de pseudoubiquitin, permet maintenant le criblage d'interactions entre des protéines transmembranaires, mais n'élimine pas le problème du contexte cellulaire particulier de la levure [534]. Une autre technique permettant l'identification de partenaires protéiques est la purification par affinité d'une protéine suivie de l'identification de ses partenaires par spectrométrie de masse. Cependant, cette méthodologie n'est également pas très bien adaptée à l'étude de protéines transmembranaires, car elle nécessite leur solubilisation et leur purification. Comme 20 à 30 % du génome humain est constitué de protéines transmembranaires, incluant les RCPGs, le développement de techniques telles

que le BRET permettant l'étude d'interaction entre ce type de protéines s'avère fondamental [535]. En conséquence et pour les autres raisons citées ci-haut, nous avons décidé d'utiliser le BRET comme méthode d'identification de nouveaux partenaires protéiques des RCPGs.

Choix des partenaires BRET pour le crible

La production d'un signal de BRET nécessite la fusion génétique d'une protéine avec une molécule de luciférase et la fusion de l'autre partenaire avec une protéine fluorescente acceptrice, la protéine fluorescente jaune (YFP), suivi de la co-transfection de ces constructions dans des cellules de mammifères. Cette technique n'est donc pas facilement adaptable pour un criblage à haut débit d'interaction protéines-protéines puisqu'elle demande la création de bibliothèques de protéines fusionnées à la YFP, puis la transfection et la détection du signal de BRET pour chaque partenaire potentiel. Il était donc essentiel de limiter les protéines à tester dans le crible à une question précise à laquelle nous désirions répondre. Pour les diverses raisons énumérées lors de l'introduction, nous voulions identifier de nouveaux partenaires protéiques des récepteurs couplés aux protéines G localisés dans la voie de sécrétion qui pourraient être impliqués dans le processus de maturation des récepteurs dans le RE et leur transport jusqu'à la membrane plasmique. Nous devions donc soit créer une bibliothèque de protéines de la voie de sécrétion fusionnée à la YFP ou utiliser une bibliothèque déjà existante. Heureusement, vers la fin des années 1990, le groupe de Wiemann en Allemagne a entrepris le clonage des phases ouvertes de lecture du génome humain (ORFs) fusionnées à leur extrémité C-terminale à la YFP ou à leur extrémité N-terminale par la protéine fluorescente cyan (CFP), afin d'exprimer ces protéines de fusion et de déterminer leur localisation cellulaire par microscopie de fluorescence [533]. Si la localisation des fusions YFP et CFP étaient identiques, ils en concluaient que la présence d'une protéine fluorescente en N- ou en C-terminus n'affectait probablement pas la localisation cellulaire de la protéine et que la localisation observée était probablement la bonne. Ces protéines étant majoritairement non-caractérisées, la détermination du ou des compartiments cellulaires dans lesquels elles sont localisées permettrait de déduire une fonction probable pour ces nouvelles protéines. Plus de 1000 ORFs ont ainsi été fusionnées à la YFP à ce jour [536]. Pour les besoins du crible, nous avons donc sélectionné 109 protéines localisées dans la voie de sécrétion,

principalement dans le reticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et quelques-unes également retrouvées à la membrane plasmique. Un autre avantage de l'utilisation de cette librairie est lié au fait que ces protéines étant non-caractérisées, la majorité des interacteurs identifiés dans le crible représenteraient probablement des protéines qui n'ont pas été préalablement décrites comme interagissant avec les RCPGs. Nous devons ensuite choisir un récepteur fusionné à la *Renilla* luciférase pour les besoins du crible. Étant donné son importance thérapeutique potentielle pour la prévention de l'infection par le VIH (voir introduction, section 1.7), nous avons utilisé le récepteur chemokine CCR5. Des personnes présentant une mutation empêchant l'expression de ce récepteur à la surface sont immunisées contre l'infection par le VIH et ne présentent pas de problèmes de santé majeurs. L'inhibition du transport à la membrane plasmique du CCR5 représenterait donc une approche thérapeutique très intéressante pour le traitement du VIH. Les ORFs-YFP et la fusion CCR5-Rluc furent donc co-transfectées dans les cellules immortalisées HEK 293 (Human embryonic kidney cells) afin de mesurer le signal BRET. Un des principaux avantages de cette lignée cellulaire est qu'elle est aisément transfectable, ce qui était particulièrement important pour le crible où l'on devait effectuer plus d'une centaine de co-transfection. De plus, il avait été démontré que le récepteur fusionné CCR5-Rluc est transporté normalement et est fonctionnel à la membrane plasmique de ces cellules [56]. Ceci est important car l'encombrement stérique causé par la fusion de grandes molécules comme la Rluc (~ 35 kDa) ou la YFP (~ 27 kDa) peut affecter la fonctionnalité, la localisation cellulaire et l'interaction avec d'autres protéines.

Analyse du crible

Sur les 109 protéines testées dans le crible, 18 donnent un signal de BRET supérieur à celui observé lorsque la YFP soluble non-fusionnée est co-exprimée avec le récepteur CCR5-Rluc (article 1, figure 1A). Nous avons utilisé ce seuil afin d'éliminer les signaux de BRET provenant de collisions aléatoires entre les protéines fusionnées à la YFP et le récepteur fusionné à la Rluc. Nous obtenons donc un pourcentage de candidats potentiels de 17 % des protéines testées. Ce chiffre peut paraître élevé, mais n'est pas vraiment surprenant car contrairement à un criblage à grande échelle, la librairie que nous avons utilisée est enrichie en protéines localisées dans les mêmes compartiments cellulaires que le récepteur. On augmente donc la probabilité d'obtenir des protéines interagissant avec le

récepteur. Compte tenu des nombreuses étapes nécessaires pour la synthèse, le repliement et le transport des protéines jusqu'à la membrane plasmique, il n'est pas surprenant de constater que plusieurs protéines puissent interagir avec les RCPGs et contribuer à ces processus. L'analyse bio-informatique des séquences des 18 protéines révèle qu'un peu plus de la moitié d'entre elles posséderaient un ou plusieurs TM, ce qui semble démontrer l'efficacité du BRET pour mesurer l'interaction entre des protéines intégrales de la membrane. Par contre, un des problèmes associés à l'utilisation du BRET dans le contexte de ce crible est la possibilité que les deux fluorophores se retrouvent du côté opposé de la membrane bilipidique. En effet, la Rluc est fusionnée à la queue C-terminale du récepteur et se trouve donc du côté cytoplasmique. Dans le cas de protéines solubles fusionnées à la YFP et localisées dans la lumière du RE et/ou du Golgi qui interagiraient avec le récepteur, les deux fluorophores seraient au minimum séparés par l'épaisseur de la membrane bilipidique qui peut varier de 70 à 100 Å [537], à la limite de la détection du signal de BRET. La possibilité de faux négatifs n'est donc pas négligeable. Ceci est également vrai pour les protéines transmembranaires dont la queue C-Terminale, où la YFP est fusionnée, serait localisée dans la lumière du RE ou de l'AG. Un bon exemple est fourni par cette étude. En effet, les clones 1746 et 2059 représentent des formes variables d'épissage du gène codant pour la protéine CNIH4. Le clone 2059 code pour une protéine à 3 TM dont le domaine C-terminal serait localisé dans la lumière du RE alors que le clone 1746 donne une protéine à 2 TM avec une région C-terminale cytoplasmique (Figure 10). Comme on peut l'observer sur la figure 1A de l'article 1, le signal de BRET mesuré avec le clone 1746 est beaucoup plus élevé que celui observé pour le clone 2059. Malgré tout, il semble possible de détecter un signal de BRET à travers la membrane lipidique. Dans ce cas précis, la région C-terminale de CNIH4 (clone 2059) est très courte, 1 acide aminé, permettant ainsi à la YFP d'être adjacente à la membrane ce qui explique probablement pourquoi nous pouvons mesurer ce signal de part et d'autres de la membrane du RE.

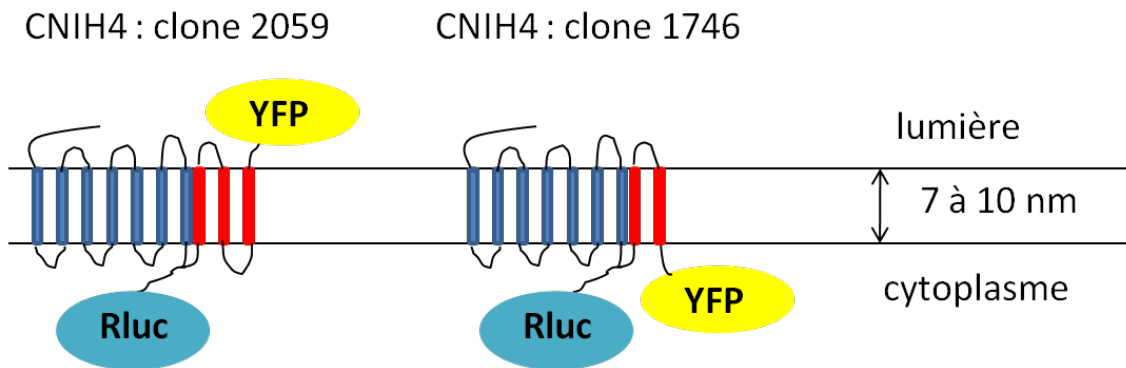


Figure 10. Localisation des fluorophores pour le BRET entre CCR5 et les deux formes d'épissages de CNIH4.

Certains des signaux BRET observés pourraient également représenter des faux positifs. En effet, un signal BRET peut dans certains cas être généré par des collisions aléatoires favorisées par une haute concentration des deux partenaires dans un compartiment cellulaire donné. Par exemple, le récepteur pourrait être incorporé et enrichi dans les mêmes vésicules de transport qu'une autre protéine ce qui pourrait causer l'apparition d'un signal de BRET ne provenant pas d'une interaction sélective (directe ou par l'intermédiaire d'une autre protéine) entre les deux partenaires. Nous avons donc validé les 18 candidats par co-immunoprécipitation (coIP) et 6 d'entre eux ont donné des signaux forts dans ces essais (article, figure 1B). Cela ne signifie pas nécessairement que le BRET observé pour les 12 autres protéines provient d'interactions non-sélectives, car il est possible que la solubilisation du récepteur dans l'expérience de coIP provoque la dissociation du complexe. Éventuellement, une caractérisation individuelle de chaque candidat serait nécessaire pour déterminer si l'interaction est sélective ou non. Je vais discuter plus loin des différentes façons de distinguer entre une interaction sélective et un signal de BRET provenant de collisions aléatoires. Nous avons également incorporé 8 protéines donnant un signal de BRET très faible ou nul comme contrôle négatif pour les essais de coIP. Surprenamment, deux d'entre elles (clones 399 et 1984) donnent un signal significatif, quoique plus faible que les 6 protéines mentionnées précédemment. Ceci pourrait être causé par la contamination de l'essai de coIP, mais pourrait aussi être expliqué par le fait que dans le cas de ces deux protéines, la YFP se retrouverait localisée du côté opposé de la membrane lipidique, comme discuté auparavant. Bien que n'ayant pas donné

un signal de BRET dans le crible, ces deux protéines pourraient donc être également intéressantes à caractériser. Malgré les quelques désavantages liés à l'utilisation du BRET comme technique de criblage, l'identification de 18 partenaires potentiels des RCPGs et la confirmation subséquente de l'interaction pour 6 de ces protéines par co-immunoprécipitation, démontrent l'efficacité de cette technique pour l'identification de protéines interagissant avec les RCPGs.

Sélection de CNIH4 comme première protéine à caractériser

Nous avons donc réussi à identifier plusieurs nouvelles protéines interagissant avec un RCPG, mais ceci n'était que la première étape vers notre objectif de découvrir des protéines contrôlant le repliement et/ou le transport des récepteurs à la membrane plasmique. Si l'utilisation de protéines non-caractérisées pour le crible nous permettait d'identifier presque automatiquement des nouveaux interacteurs des RCPGs, elle représentait maintenant un obstacle car peu d'informations fonctionnelles étaient disponibles sur ces protéines. Nous aurions pu sur-exprimer ou supprimer l'expression de chacune des 18 protéines et mesurer l'effet sur le transport des récepteurs à la membrane plasmique afin de déterminer quelle(s) protéine(s) serai(ent) la ou les plus intéressantes à caractériser en premier. L'autre option, que nous avons employée, était d'examiner d'abord les caractéristiques des différents candidats afin de déterminer si certains d'entre eux démontraient un potentiel plus élevé d'être impliqués dans la maturation des RCPGs. Nous avons d'abord laissé de côté les 12 protéines ne donnant pas de signal dans l'essai de coIP. Parmi les six protéines restantes (les 2 formes épissées de CNIH4, TMEM9, TMEM47, TMEM130 et Nicalin), aucune appartenait ou possédait de similarités avec les familles de protéines impliqués dans les processus généraux de maturation dans le RE décrites dans le chapitre II de l'introduction ou avec les facteurs d'export potentiellement spécifiques des RCPGs décrits dans le chapitre III. Ces protéines ne possèdent également pas de domaines fonctionnels connus qui auraient pu nous éclairer sur leurs fonctions potentielles et aucune étude sur ces protéines chez les mammifères n'existait à l'époque où le crible a été effectué. Heureusement, CNIH4 appartient à une famille de protéines conservées de la levure à l'homme et à l'époque où nous avons fait le crible, il avait été démontré qu'un homologue de CNIH4 chez *Drosophila melanogaster* (dCni) est nécessaire pour le transport à la membrane plasmique de l'homologue de TGF α chez la drosophile [511, 512]. De façon

similaire, un homologue de CNIH4 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, nommé Erv14, était nécessaire pour le transport d'une protéine transmembranaire nommé Axl2p. Il avait également été suggéré qu'Erv14 interagit avec les protéines des vésicules COPII et recrute Axl2p dans ces vésicules de transport [398, 518]. Ces études suggéraient fortement que CNIH4 pourrait avoir une fonction dans le transport antérograde des protéines dans les cellules de mammifères et nous avons décidé de déterminer le rôle potentiel de cette protéine dans la maturation des RCPGs. Le fait que deux formes d'épissage aient été identifiées augmentait également la confiance en une interaction spécifique.

Interaction entre CNIH4 et différents RCPGs ou autres protéines transmembranaires.

Nous avons d'abord voulu déterminer si CNIH4 interagit sélectivement avec CCR5 ou s'il peut interagir avec d'autres RCPGs ou mêmes d'autres classes de protéines transmembranaires qui empruntent la voie de sécrétion. Tous les RCPGs testés, appartenant aux 3 principales familles (A, B et C), donnent des signaux de BRET très élevés alors que les signaux sont très faibles pour d'autres protéines transmembranaires telles que le récepteur tyrosine kinase EGFR, les récepteurs de cellules T CD4 et CD8 et l'enzyme adénylate cyclase de type II (article 1, figure 3A). Il est important de mentionner que les signaux ont été mesurés à des niveaux similaires d'expression de chaque partenaire et que l'écart significatif observé entre les RCPGs et les autres protéines transmembranaires ne peut être expliqué par une expression plus forte ou plus faible de certaines protéines. Un autre facteur qui aurait pu expliquer la différence de l'intensité du signal BRET est que la Rluc se retrouverait plus éloignée de la YFP dans le cas des protéines transmembranaires non-RCPGs, par exemple si leur queue C-terminale était beaucoup plus longue que celle des récepteurs. Cependant, ce n'est pas le cas pour CD4 (C-term-40 aa) ou CD8 (C-term-30 aa) qui possèdent des régions C-terminales très courtes. Celle de l'adénylate cyclase 2 (~270 aa) est un peu plus longue, mais comparable à celle du récepteur GABA_BR2 (~200 aa). Par contre, la queue C-terminale de l'EGFR possède 542 aa alors nous avons essayé de le co-immunoprécipiter avec CNIH4 au cas où ils pourraient former un complexe que l'on ne peut détecter en BRET. Aucune association entre l'EGFR et CNIH4 n'a pu être détectée par co-immunoprécipitation confirmant le résultat de BRET (résultat non-montré).

Un signal de BRET élevé ne signifie pas nécessairement une interaction sélective. Comme mentionné précédemment, une concentration élevée de ces protéines pourrait favoriser des collisions aléatoires entre ces molécules. Comme les études de BRET nécessitent la surexpression des deux partenaires, il était essentiel de discriminer entre ces deux possibilités. Nous avons donc effectué des courbes de titration où une faible quantité de récepteur fusionné à la Rluc est co-transfecté avec des quantités croissantes de CNIH4-YFP. Si le BRET provient de collisions aléatoires, le signal devrait augmenter de façon linéaire et ne devrait pas être saturable à de faibles ratios accepteur/donneur, alors que si CNIH4 et les récepteurs font partis d'un complexe, la courbe devrait être hyperbolique [538]. La figure supplémentaire de l'article 1 démontre clairement que le BRET entre différents RCPGs et CNIH4 augmente de façon hyperbolique. Une autre manière de déterminer si le BRET provient d'une interaction sélective est d'ajouter des quantités croissantes d'un des partenaires non-fusionné dans le système et de mesurer sa capacité à compétitionner l'interaction entre les protéines fusionnées à la Rluc et à la YFP et ainsi diminuer le signal de BRET.

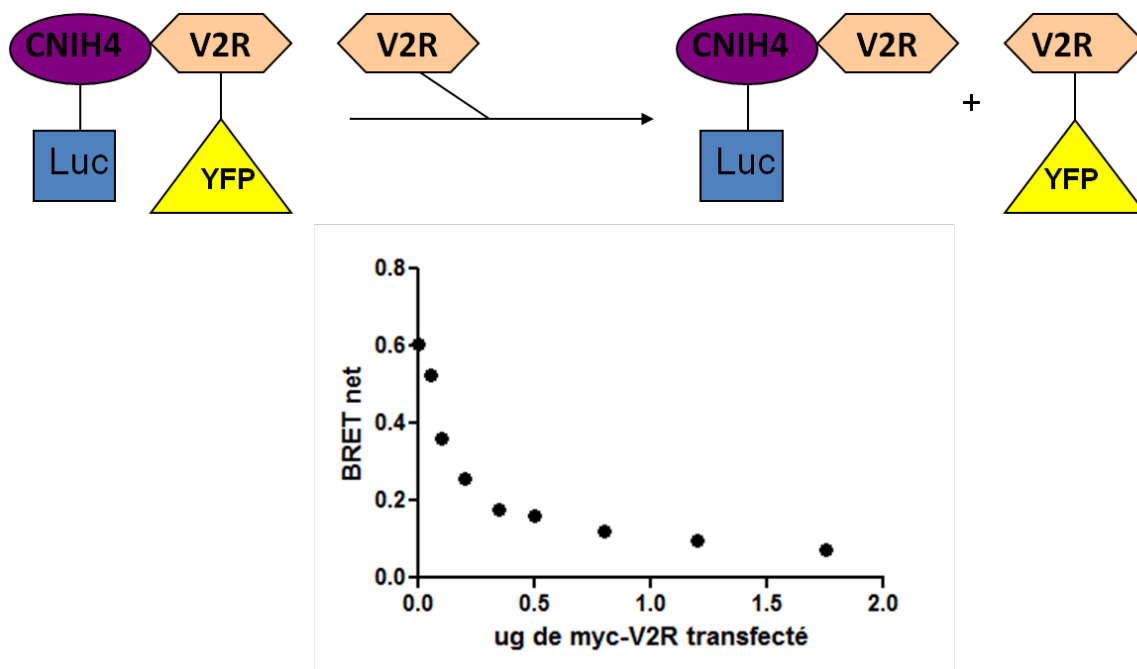


Figure 11. Courbe de compétition du BRET entre le V2R et CNIH4. Des cellules HEK 293 ont été transfectées avec une quantité constante de Rluc-CNIH4 et de V2R-YFP et en présence de concentration croissantes de V2R non-fusionné. Les signaux de fluorescence et de BRET furent mesurés en parallèle.

Comme on peut le voir dans la (Figure 11), l'ajout de récepteur V2R non-fusionné diminue le BRET entre Luc-CNIH4 et V2R-YFP indiquant encore une fois que le BRET observé n'est pas produit par des collisions aléatoires. L'ensemble de ces résultats suggère donc très fortement que CNIH4 interagit directement ou fait parti d'un complexe avec les RCPGs.

Ces études indiquent également qu'il existe un certain niveau de sélectivité pour l'interaction de CNIH4 avec les RCPGs, quoiqu'un échantillonnage beaucoup plus grand soit nécessaire afin de déterminer si CNIH4 peut interagir avec d'autres protéines transportées dans la voie de sécrétion. Pendant la réalisation de cette thèse, d'autres études sur les homologues de CNIH4 chez l'homme (CNIH1, 2, 3) et la levure (Erv14), ont également suggéré que ces protéines interagissent de façon sélective avec certains partenaires (voir introduction, section 3.2). Il n'est donc pas surprenant de constater cette sélectivité d'interaction dans le cas de CNIH4. Curieusement, CNIH1 possède une homologie très élevée avec l'homologue de cornichon chez la drosophile (*dCni*) qui interagit avec l'homologue de TGF α (*gurken*). Au contraire, CNIH4 possède une homologie beaucoup plus faible avec *dCni*, mais plus élevée avec l'autre homologue de cornichon chez la drosophile (*Cnir*) qui lui n'interagit pas avec *gurken* [514], suggérant qu'il pourrait exister une sélectivité d'interaction différente entre CNIH1 et CNIH4. Il serait très intéressant de tester l'interaction entre les RCPGs et les autres homologues humains de CNIH4. Afin de déterminer les mécanismes sous-jacents à une telle sélectivité d'interaction, il serait nécessaire d'identifier les domaines impliqués dans l'interaction entre CNIH4 et les RCPGs, une question à laquelle nous n'avons pas répondu dans cette étude. Les domaines N-terminal (4 aa) et C-terminal (1 aa) de CNIH4 sont très courts et il est donc peu probable qu'ils soient impliqués dans l'interaction avec les récepteurs. Il serait possible que l'interaction se fasse entre la boucle cytoplasmique ou luminale de CNIH4 et les régions N-terminale ou C-terminale des récepteurs. Cependant, ces régions sont très variables d'un récepteur à l'autre et entre les familles de récepteurs. Nous nous serions donc attendus à ce que seulement un certain nombre de RCPGs partageant des similarités de séquence dans ces régions puissent interagir de façon sélective avec CNIH4 si ces domaines étaient impliqués dans la formation du complexe. C'est d'ailleurs ce qui est observé pour plusieurs facteurs d'export qui interagissent spécifiquement avec la queue C-terminale de certains récepteurs (voir introduction, section 3.1). Il est donc probable que

l'interaction entre les RCPGs et CNIH4, si elle est directe, s'effectue entre un ou plusieurs domaines transmembranaires de chaque protéine. Il n'est pas aisé d'identifier les TMs impliqués dans l'interaction entre deux protéines transmembranaires. Il serait possible d'utiliser la technique de formation de ponts croisés entre des résidus cystéines introduits dans les domaines transmembranaires, utilisée avec succès par le groupe de Javitch pour identifier les TMs formant les interfaces d'oligomérisation du récepteur D2 de la dopamine [539, 540]. L'utilisation de cette technique aurait également pour avantage de démontrer une interaction directe entre CNIH4 et les RCPGs. Normalement, l'interaction directe entre deux protéines peut être mesurée en purifiant chacune des protéines séparément dans des systèmes d'expression artificiels (*E. coli*) puis en regardant la formation d'un complexe in vitro par un essai de pull-down. Cependant, les protéines transmembranaires sont très difficiles à purifier de cette façon et l'utilisation de détergent pour leur solubilisation peut affecter leur conformation et leur interaction avec d'autres protéines. On ne pourrait donc pas utiliser cette technique pour démontrer une interaction directe entre CNIH4 et les RCPGs si l'interface d'interaction est constituée par les TMs de ces protéines.

Localisation de l'interaction RCPG-CNIH4

La protéine de fusion CNIH4-YFP était décrite comme étant localisée dans le RE. Comme la fusion d'un polypeptide volumineux comme la YFP pourrait perturber la localisation cellulaire de CNIH4, nous avons fait une construction de CNIH4 avec seulement un petit épitope Xpress en N-terminus afin d'examiner la localisation cellulaire de CNIH4. Malheureusement, il n'existe pas d'anticorps possédant une bonne affinité pour CNIH4 et nos efforts pour en produire un n'ont pas fonctionné jusqu'à maintenant. Nous ne pouvons donc pas détecter la localisation de la protéine endogène. Comme on peut l'observer dans la figure 2 de l'article 1, CNIH4 est fortement colocalisée avec la calnexine suggérant qu'elle est principalement située dans le RE. Une certaine proportion de CNIH4 n'est pas colocalisée avec la calnexine suggérant qu'une population de CNIH4 pourrait être située dans des régions du RE dont la calnexine est exclue. Comme nous le verrons plus loin, ces régions pourraient représenter les sites de sortie du RE. Les expériences de microscopie ont également révélé une colocalisation avec le marqueur du compartiment intermédiaire RE-Golgi, ERGIC-53, suggérant que CNIH4 peut quitter le RE. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été observé chez la drosophile et la levure où les homologues

de cornichon, en plus d'être présents dans le RE, sont également incorporés dans les vésicules COPII [398, 514]. Cette localisation de CNIH4 dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion (RE et ERGIC53) est également confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation qui révèlent que seules les formes immatures du récepteur β 2AR, celles qui n'ont pas été modifiées par les enzymes de glycosylation du Golgi, interagissent avec CNIH4 (article 1, figure 3). Donc, contrairement à certains facteurs d'export des RCPGs tels que RAMP et MRAP (voir introduction, section 3.1), CNIH4 n'accompagne pas le récepteur jusqu'à la membrane plasmique et s'en dissocie avant son passage dans l'appareil de Golgi. Des résultats similaires ont été observés pour CNIH1 qui interagit seulement avec les formes immatures de TGF α [522]. Par contre, il a été proposé que CNIH2/3 sont présents à la membrane plasmique en complexe avec les récepteurs du glutamate de type AMPA et influencent l'activité et la pharmacologie de ces canaux ioniques [524-526]. Est-ce que cette propriété est spécifique de CNIH2 et 3 ou serait-il possible pour CNIH1 et 4 d'accompagner certains de leurs partenaires jusqu'à la membrane plasmique? Nous avons également testé la co-immunoprécipitation de CNIH4 avec un autre RCPG, le V2R, et avons encore une fois observé une interaction limitée aux formes immatures du récepteur (résultat non-montré) ce qui suggère que de façon générale l'interaction CNIH4-RCPG est transitoire. On ne peut cependant exclure que CNIH4 reste associée plus longtemps à certains récepteurs spécifiques et que la longévité de l'interaction dépende du contexte cellulaire.

Quels sont les mécanismes permettant la dissociation du complexe CNIH4-récepteur pendant leur transport dans la voie de sécrétion? Plusieurs possibilités peuvent être envisagées. Si les domaines N-terminal ou C-terminal du récepteur sont impliqués dans la formation du complexe avec CNIH4, des modifications post-traductionnelles dans ces régions pourraient influencer l'association entre les deux protéines. Si l'interaction se fait par l'intermédiaire des TMs, il est moins probable qu'elle soit contrôlée directement par des modifications post-traductionnelles, quoique ces dernières puissent influencer la conformation des TMs ou permettre le recrutement d'une protéine au récepteur favorisant la dissociation de CNIH4. La glycosylation des récepteurs, qui est constamment modifiée pendant leur transport dans la voie de sécrétion, représente un mécanisme possible de régulation de l'interaction récepteur-CNIH4. Cependant, CNIH4 ne possède pas de domaine lectine pouvant lier les sucres et l'effet de la glycosylation serait donc

probablement indirect. On a vu que les différents membres de la famille cornichon, dont CNIH4, semble pouvoir quitter le RE et pourrait donc accompagner le récepteur jusqu'au compartiment ERGIC ou peut-être même jusqu'au début de l'AG. Le changement de compartiment cellulaire pourrait provoquer la dissociation du complexe. Alors que le pH est neutre dans le RE (pH 7.4), il s'acidifie légèrement dans le ERGIC pour atteindre un pH de 6.4 dans l'AG [541]. Ces différences de pH pourraient favoriser la dissociation du complexe récepteur-CNIH4. Ceci a été démontré pour le récepteur de cargo ERGIC-53 qui transporte l'enzyme lysosomale procathepsin Z du RE au ERGIC. La neutralisation du pH par la chloroquine empêche la dissociation de ces protéines dans le ERGIC [542]. Ensuite, il existe une importante variation dans la composition lipidique de la membrane des différents compartiments de la voie de sécrétion qui pourrait favoriser ou inhiber l'association entre CNIH4 et les récepteurs [543]. En effet, la nature des phospholipides formant la membrane ainsi que la longueur des chaînes d'acides gras et leur degré de saturation peuvent affecter le repliement et l'orientation des TMs dans la membrane. Enfin, la composition en protéines des différentes régions du RE, ERGIC et Golgi est différente et il est possible qu'une protéine localisée dans un compartiment donné interagisse avec le récepteur ou CNIH4 et favorise la dissociation du complexe.

Analyse de la fonction de CNIH4 dans le transport des RCPGs

Utilisant une combinaison de techniques telles que l'ELISA, la radioliation, l'immunobavardage et la microscopie de fluorescence, nous avons pu déterminer que la surexpression de CNIH4 provoque la rétention de différents RCPGs dans un compartiment intracellulaire et favorise leur dégradation par le protéasome (article 1, figure 4 et 5). Les expériences de microscopies révèlent une forte colocalisation entre les récepteurs et CNIH4 suggérant que les récepteurs sont retenus dans le RE. De plus, l'aspect diffus du marquage est consistant avec une rétention dans le RE puisque les autres compartiments où on pourrait retrouver CNIH4 (ERGIC, cis-Golgi) ne sont pas aussi diffus dans la cellule (article 1, figure 4C). Afin de déterminer si la surexpression de CNIH4 engendre une inhibition générale du transport des protéines du RE à la membrane plasmique, nous avons également étudié l'expression de CD8. Cette protéine a été choisie car nous avons déjà démontré qu'elle ne semble pas interagir avec CNIH4. Contrairement aux RCPGs testés, l'expression à la surface de CD8 n'est que modestement affectée et aucune colocalisation

n'est observée avec CNIH4 démontrant que cette protéine n'est pas retenue dans le RE par CNIH4. Ces résultats indiquent que la surexpression de CNIH4 inhibe spécifiquement le transport de certaines protéines. L'étendue de cette spécificité nécessiterait d'étudier le transport d'un large éventail de protéines empruntant la voie de sécrétion. Le fait que CNIH4 n'interagit pas avec CD8 et n'influence pas son transport alors qu'il interagit avec les récepteurs et bloque leur maturation, laisse croire que la formation du complexe CNIH4-récepteur est nécessaire pour empêcher l'acheminement à la surface des RCPGs. On ne peut cependant exclure que le mécanisme d'inhibition soit indirect. En effet, CNIH4 pourrait séquestrer une protéine nécessaire pour le repliement adéquat et/ou le transport des RCPGs, l'empêchant ainsi d'effectuer sa fonction sur la maturation des récepteurs.

Si on part du principe que l'inhibition du transport des récepteurs par la surexpression de CNIH4 nécessite la formation d'un complexe entre ces deux protéines, quels sont les mécanismes pouvant expliquer ce phénomène? En théorie, la surexpression de CNIH4 pourrait interférer avec n'importe laquelle des étapes de la synthèse et de l'intégration du récepteur dans la membrane du RE, son repliement assisté par diverses chaperones et enzymes jusqu'à sa sortie du RE dans les vésicules COPII. Il a été mentionné dans l'introduction (section 1.3) que la dimérisation des récepteurs pourrait être nécessaire pour leur export du RE. CNIH4 pourrait donc bloquer directement la formation de dimères surtout s'il interagit avec le ou les mêmes TMs qui forment l'interface de dimérisation. Nous avons donc déterminé l'effet de la surexpression de CNIH4 sur la dimérisation du β 2AR en effectuant des courbes de titrations de BRET. Comme on peut le constater sur la Figure 12, CNIH4 n'affecte pas la formation du dimère de β 2AR et on peut donc exclure cette possibilité.

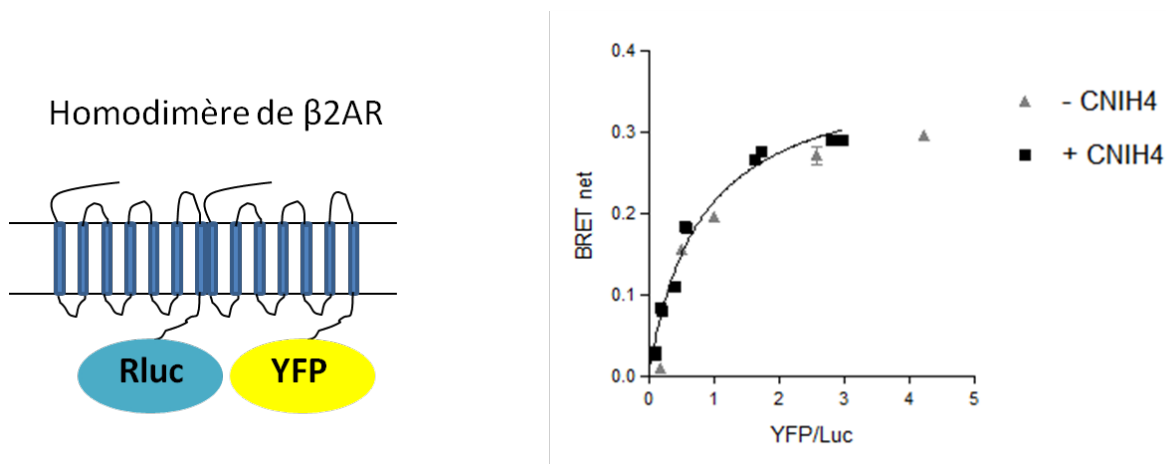
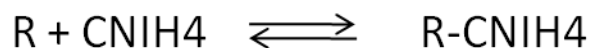


Figure 12. Courbes de titration de BRET de l'homodimère β 2AR en présence de CNIH4. Des cellules HEK 293 ont été transfectées avec une quantité constante de β 2AR-Rluc et des quantités croissantes de β 2AR-YFP en présence ou en absence de CNIH4, et les signaux de BRET ont été mesurés.

Un autre mécanisme possible serait qu'afin d'être exporté du RE et transporté à la membrane plasmique, le récepteur doit absolument se dissocier de CNIH4 et que la surexpression de ce dernier empêche la séparation de ces deux partenaires. Si on considère que la formation du complexe est une réaction à l'équilibre:



On peut constater aisément que l'augmentation de la concentration de CNIH4 dans le système diminuerait la quantité de récepteur sous forme libre. Ensuite, il serait possible que CNIH4 interagisse rapidement avec le récepteur pendant ou peu après sa synthèse et empêche l'interaction d'une chaperone ou d'un enzyme de repliement avec le récepteur. Les récepteurs mal repliés seraient alors reconnus par le système de contrôle de qualité du RE et retenu dans ce compartiment avant d'être envoyés à la dégradation. Le fait que l'on observe une dégradation des formes immatures du récepteur par le protéasome lorsque CNIH4 est surexprimé (article 1, figure 5A) pourrait suggérer que le récepteur est mal replié dans ces conditions. La calnexin, qui joue un rôle important dans le repliement protéique dans le RE et dont l'interaction avec plusieurs RCPGs avaient déjà été rapportée, représenterait un candidat très probable. De plus, la calnexin étant une protéine transmembranaire, son interaction avec les récepteurs seraient probablement plus

susceptible d'être compétitionnée par CNIH4. Cependant, comme on peut le voir dans la Figure 13, la surexpression de CNIH4 ne diminue pas le BRET observé entre le récepteur V2R et la calnexin et n'inhibe donc pas l'interaction entre cette chaperone et le récepteur. Au contraire, on observe une augmentation du BRET et la courbe de titration passe d'une forme hyperbolique à une forme linéaire qui n'a pas atteint la saturation aux concentrations de calnexin testées.

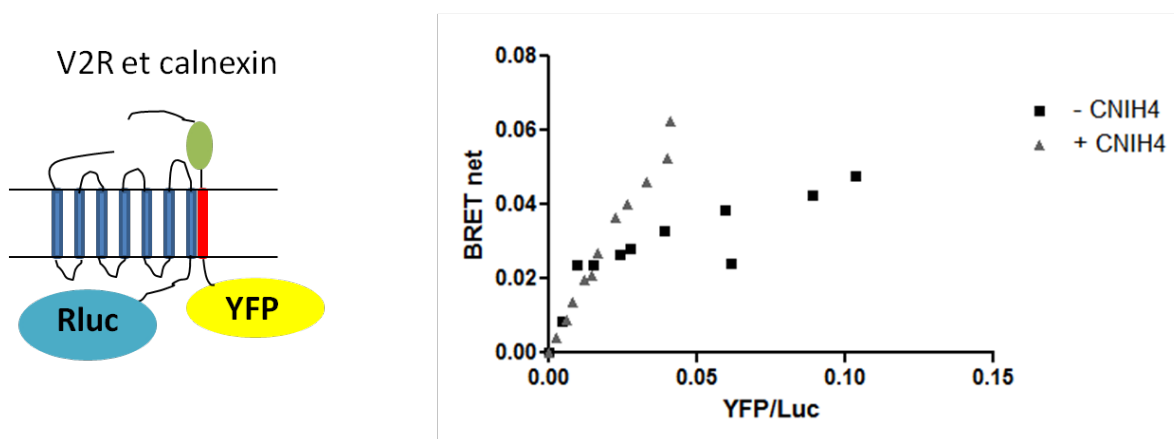


Figure 13. Courbes de titration de BRET de l'interaction β 2AR en présence de CNIH4. Des cellules HEK 293 ont été transfectées avec une quantité constante de V2R-Rluc et des quantités croissantes de Calnexin-YFP en présence ou en absence de CNIH4, et les signaux de BRET ont été mesurés.

Cette linéarisation de la courbe de titration suggère que l'augmentation du BRET observée n'est pas causée par une hausse des complexes calnexin-récepteur, mais plutôt par la fréquence plus élevée des collisions aléatoires provoquées par la rétention du récepteur et l'accroissement de sa concentration dans le RE en présence de CNIH4. En plus de suggérer encore plus fortement que le récepteur est retenu dans le RE par la surexpression de CNIH4, ce résultat démontre que la rétention du récepteur n'est probablement pas causée par une modification de son interaction avec la calnexin. Nous ne pouvons cependant pas exclure que CNIH4 diminue la capacité de la calnexin à favoriser le repliement du récepteur sans affecter leur interaction ou qu'il interfère avec les fonctions d'autres chaperones ou enzymes de repliement du RE.

Une autre hypothèse à envisager est que CNIH4 fait partie d'un complexe avec une ou plusieurs autres protéines et que les fonctions normales sur la maturation et/ou le

transport des récepteurs de ce complexe nécessiteraient une expression relative adéquate de chaque partenaire. Les résultats du deuxième article où la co-expression de la protéine TMEM9 avec CNIH4 rétablit le transport des récepteurs laisse croire que cette hypothèse explique au moins en partie leur rétention lors de la surexpression de CNIH4. Je vais discuter plus en détail de ces résultats plus loin. Il serait également possible que CNIH4 permette l'interaction des récepteurs avec une autre protéine nécessaire pour l'export du RE des RCPGs. Lorsque la concentration de CNIH4 est normale, il pourrait interagir avec le récepteur et l'acheminer au facteur d'export (Figure 14). Par contre, une concentration trop élevée de CNIH4 provoquerait la formation de complexes séparés empêchant le transport des récepteurs.

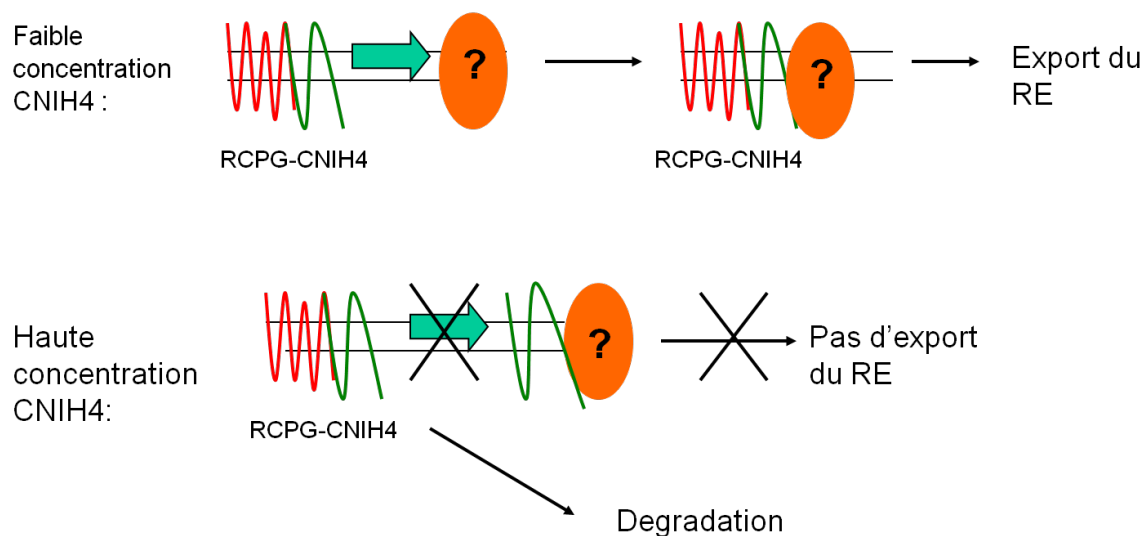


Figure 14. Mécanisme possible expliquant la rétention des RCPGs par la surexpression de CNIH4.

Les deux derniers mécanismes proposés impliquent que des niveaux endogènes ou normaux de CNIH4 auraient une action positive sur la maturation des RCPGs et que la rétention provoquée par la surexpression de CNIH4 résulte d'un effet dominant négatif. Nous avons donc étudié l'effet de la suppression de l'expression endogène de CNIH4 dans les cellules HEK 293 sur le transport du récepteur β 2-adrénergique et confirmé qu'un niveau minimum d'expression de cette protéine est nécessaire pour le repliement et/ou le transport efficace du récepteur à la membrane plasmique (article 1, figure 6). Le rôle positif de CNIH4 dans la maturation des RCPGs est également supporté par les expériences

effectuées sur un récepteur mutant retenu dans le RE. Ce mutant a été créé par l'ajout de 7 résidus alanines à l'intérieur de l'hélice 8 située entre le 7^e TM et le site de palmylation du récepteur β 2AR. Comme il a été mentionné dans l'introduction, la palmylation des récepteurs influence fréquemment leur expression à la membrane plasmique et il avait été démontré que des mutations dans cette région affectent la maturation du β 2AR [544]. Des expériences où des quantités faibles de surexpression de CNIH4 peuvent favoriser la maturation de ce récepteur mutant, mais que cet effet disparaît à des concentrations plus élevées de CNIH4 (article 1, Figure 7A), illustrent parfaitement que CNIH4 a un effet positif sur le transport des récepteurs à des concentrations peu élevées mais agit comme dominant négatif lorsque largement surexprimé. Ces résultats peuvent être expliqués par un ou l'autre des deux mécanismes proposés précédemment et sont consistants avec l'existence d'un ou plusieurs facteurs d'export collaborant avec CNIH4 pour favoriser la maturation des récepteurs. L'identification de protéines interagissant avec CNIH4 et influençant le transport des récepteurs représentait donc l'étape suivante afin de comprendre le ou les mécanismes par lesquels ce membre de la famille cornichon contrôle l'export des RCPGs.

Interaction entre CNIH4 et les vésicules COPII

Il a été mentionné ci-dessus que les homologues de cornichon chez la drosophile et la levure favorisent le transport à la membrane plasmique de protéines transmembranaires, probablement en agissant comme récepteur-cargo pour le recrutement de ces protéines dans les vésicules COPII (introduction, section 3.2). De plus, des mutations situées dans une séquence conservée de la boucle cytoplasmique d'erv14p inhibent son interaction avec les composantes des vésicules COPII et la surexpression de ce mutant retient la protéine Axl2p dans le RE [398]. Cette séquence semble également conservée chez CNIH4 (voir Figure 15) suggérant que cette protéine pourrait favoriser le recrutement des RCPGs dans les vésicules COPII.

Erv14p COPII binding sequence: **I- FR -TL**
 CNIH4 corresponding sequence: **IHNRGQL**

Figure 15. Séquence nécessaire pour l'interaction d'Erv14p avec COPII et séquence correspondant chez CNIH4.

Nous avons donc vérifié si CNIH4 peut former un complexe avec l'hétérodimère des protéines Sec23/Sec24 qui forment l'enveloppe interne des vésicules COPII et qui interagissent avec les protéines localisées dans la membrane du RE permettant ainsi leur incorporation dans ces vésicules de transport. Nous avons observé que CNIH4 est co-immunoprécipité avec Sec23 suggérant que ces protéines interagissent de façon directe ou indirecte (article 1, figure 8). De plus, une forme différentiellement épissée de CNIH4 (CNIH4S) qui ne possède pas le 3^e domaine transmembranaire et la région correspondante au domaine de liaison aux protéines de COPII chez la levure, n'est pas co-immunoprécipité avec Sec23 (Figure 16).

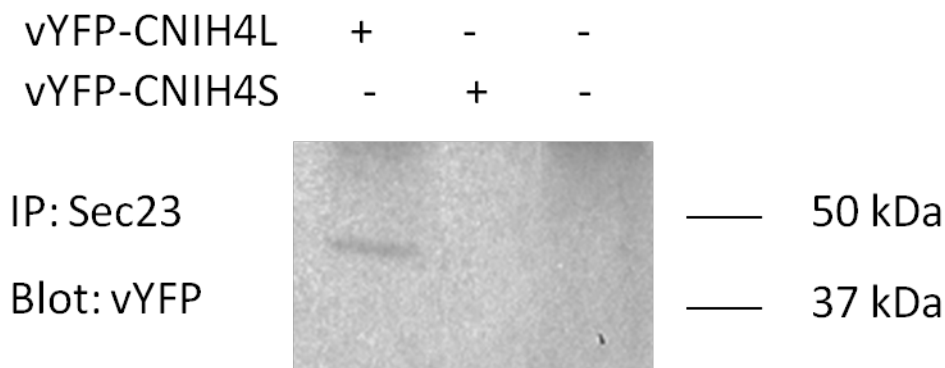


Figure 16. Interaction des différentes formes d'épissages de CNIH4 avec Sec23. Des lysats de cellules HEK 293 exprimant YFP-CNIH4L ou YFP-CNIH4S de façon transitoire furent incubés avec un anticorps reconnaissant la protéine Sec23 afin de l'immunoprécipiter, puis l'association de CNIH4 fut révélée par immunobuvardage.

En plus de servir d'excellent contrôle négatif pour l'expérience de co-immunoprécipitation entre Sec23 et CNIH4, ce résultat suggère une conservation de la fonction de la boucle cytoplasmique de CNIH4 et de son rôle potentiel de récepteur-cargo chez l'homme. Il serait intéressant de répéter cette expérience en utilisant des mutants de CNIH4 où seulement des résidus situés dans cette région ont été modifiés afin de déterminer si la présence du troisième TM peut également influencer l'interaction avec Sec23/24. Plusieurs protéines transmembranaires semblent pouvoir interagir directement par leur(s) domaine(s) cytoplasmique(s) avec les protéines de l'enveloppe de COPII et ne nécessiteraient donc pas la participation de récepteur-cargo comme CNIH4. Par contre, aucune interaction directe avec les composantes de COPII n'a été répertoriée pour plusieurs

protéines transmembranaires, dont les RCPGs, qui nécessitent d'être incorporées dans ces vésicules pour leur export du RE [77, 386]. De plus, la présence de l'homologue de cornichon chez la levure *Erv14p*, semble être spécifiquement requise pour le transport de certaines protéines transmembranaires [520]. Il serait donc possible que CNIH4 agisse comme récepteur-cargo permettant de favoriser le recrutement des RCPGs dans les vésicules COPII (Figure 17). Ce modèle expliquerait pourquoi la déplétion de CNIH4 diminue le transport des récepteurs à la membrane plasmique.

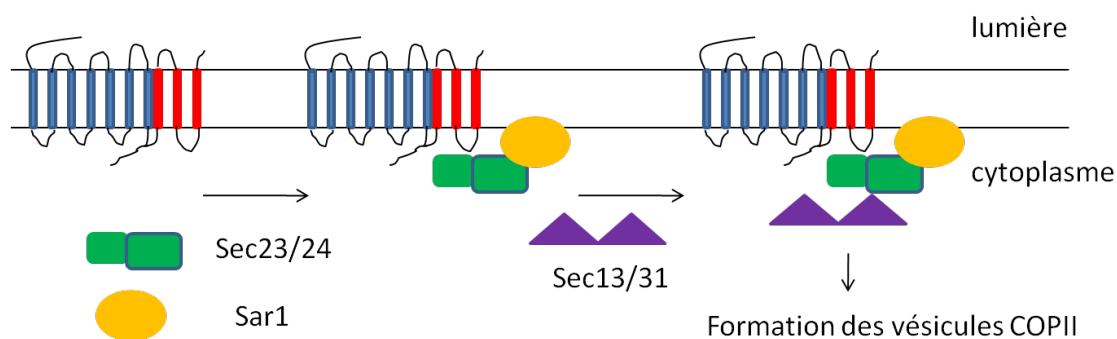


Figure 17. Rôle de CNIH4 comme récepteur-cargo pour le recrutement des RCPGs dans les vésicules COPII

Une étude très récente a identifié un motif di-acidique située dans la région distale de la queue C-terminale du récepteur II de l'angiotensine (AT2R) qui est nécessaire pour le transport de ce RCPG à la membrane plasmique [405]. Les séquences di-acidiques font partis des motifs d'interaction avec Sec24 fréquemment rencontrés suggérant que ce récepteur pourrait interagir directement avec les composantes de COPII et n'aurait pas besoin d'un récepteur cargo comme CNIH4. Cependant, aucune co-immunoprécipitation ou interaction directe *in vitro* n'a été observée entre l'AT2R et Sec24, laissant croire que ce motif di-acidique ne serait pas nécessairement impliqué dans une interaction avec Sec24. De plus, bien que conservé chez les récepteurs adrénergiques, dont le β 2AR, ce motif n'est pas nécessaire pour leur export du RE [405]. Ces résultats, bien que préliminaires, laissent planer la possibilité que certains récepteurs puissent interagir directement avec les vésicules COPII. Ces récepteurs seraient potentiellement moins dépendants de l'expression de CNIH4 pour leur transport à la membrane plasmique. Il serait intéressant de tester l'effet de la déplétion de CNIH4 sur l'expression à la surface du récepteur AT2R en comparaison

avec le β 2AR. Cependant, CNIH4 pourrait également contribuer au transport des récepteurs interagissant directement avec les protéines de l'enveloppe COPII. En effet, chez la levure, Erv14p est nécessaire pour le transport à la membrane plasmique de la protéine transmembranaire Gap1p, même si celle-ci possède un motif di-acidique dans sa queue C-Terminale qui favorise son enrichissement dans les vésicules COPII [520, 521]. Bien que certains récepteurs puissent interagir directement avec Sec23/24, CNIH4 pourrait donc également favoriser leur incorporation dans les vésicules COPII possiblement en augmentant la stabilité du complexe récepteur-CNIH4-Sec23/24. Quelques expériences pourraient être effectuées afin de renforcer le rôle possible de CNIH4 comme récepteur-cargo recrutant les RCPGs dans les vésicules COPII. Lorsque nous avons étudié la localisation cellulaire de CNIH4, nous avons observé qu'une proportion significative de cette protéine ne semblait pas colocaliser avec la calnexin. Étant donné que cette dernière est exclue des sites de sorties du RE et que CNIH4 interagit avec les protéines de COPII, il est possible que CNIH4 soit largement localisée au niveau de ces sites de sortie. Ceci pourrait être confirmé par colocalisation avec la protéine Sec16 qui est principalement localisée dans les sites de sortie du RE [545]. Nous pourrions également tenter de démontrer que CNIH4 interagit directement avec les composantes de COPII par des expériences de GST-pull-down in vitro entre les protéines purifiées Sec23/Sec24 et la boucle cytoplasmique de CNIH4. La caractérisation de l'importance de l'interaction CNIH4-Sec23/24 sur le transport des RCPGs demandera des études plus poussées. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action de CNIH4 nécessite également l'identification d'autres partenaires protéiques de ce facteur d'export des RCPGs.

J'ai présenté deux mécanismes permettant d'expliquer l'effet dominant négatif de la surexpression de CNIH4 dont un impliquant la titration d'un facteur d'export des RCPGs (Figure 14). Les protéines Sec23/24 pourraient donc représenter ce facteur d'export. Cependant, l'inhibition des fonctions des vésicules COPII devraient vraisemblablement provoquer un arrêt du transport de la majorité des protéines empruntant la voie de sécrétion, car ces vésicules sont responsables du transport de presque toutes les protéines du RE au Golgi [546]. Or, nous avons constaté que le transport à la membrane plasmique de la protéine transmembranaire CD8 n'est que très peu affecté par la surexpression de CNIH4 en comparaison des RCPGs (article 1, figure 4). Ceci suggère que la protéine titrée par CNIH4 devrait être plus spécifique au transport des RCPGs. Je vais maintenant discuter de

l'identification de la protéine transmembranaire 9 (TMEM9) qui interagit sélectivement avec les RCPGs et CNIH4 et collabore avec cette dernière pour influencer la maturation des récepteurs.

Identification de TMEM9 comme nouvel interacteur des RCPGs et de CNIH4

La grande majorité des protéines cellulaires interagissent avec d'autres protéines afin d'accomplir leurs fonctions. Nous avons déjà identifié les protéines de l'enveloppe COPII comme étant des partenaires probables de CNIH4 participant au contrôle du transport des RCPGs. Cependant, nous désirions approfondir notre compréhension de cette protéine très peu caractérisée en identifiant d'autres protéines localisées dans la voie de sécrétion qui interagissent avec CNIH4. Jusqu'à maintenant, à part les protéines de COPII et certains cargos qui dépendent des membres de la famille cornichon pour leur transport à la surface, aucune autre protéine de la voie de sécrétion n'a été décrite comme interagissant avec l'un ou l'autre des membres de la famille cornichon. De préférence, nous voulions identifier des protéines qui formeraient un complexe avec CNIH4 et participeraient également au contrôle de la maturation des RCPGs. Nous avons donc effectué un crible en utilisant la même librairie de phases ouvertes de lectures fusionnées à la YFP que nous avons utilisée pour le crible menant à l'identification de CNIH4, mais en employant cette fois-ci CNIH4 fusionné à la luciférase comme appât. Ceci nous permettait évidemment d'identifier plusieurs partenaires potentiels de CNIH4, mais aussi, en comparant les résultats des deux cribles, nous pourrions obtenir des protéines qui pourraient interagir à la fois avec les RCPGs et CNIH4. Ces protéines possèderaient donc une probabilité accrue de faire partie d'un complexe avec CNIH4 régulant la maturation des récepteurs.

Les résultats du crible, présentés à la figure 1 de l'article 2, révèlent 19 protéines interagissant potentiellement avec CNIH4. Douze d'entre elles n'avaient pas donné de signal de BRET avec le récepteur CCR5 dans le crible décrit dans le premier article. Similairement, neuf protéines identifiées dans le crible initial avec CCR5 ne sont pas retrouvées dans les partenaires potentiels de CNIH4. Ces résultats sont intéressants pour différentes raisons. Premièrement, ils démontrent encore davantage que la surexpression de protéines localisées dans la voie de sécrétion ne résulte pas automatiquement en un signal de BRET dû à la concentration élevée en protéines, validant ainsi l'utilisation de cette technique pour l'étude d'interaction protéine-protéine dans ces compartiments cellulaires.

De plus, ils suggèrent que les RCPGs et CNIH4 possèdent des partenaires localisés dans la voie de sécrétion qui leur sont spécifiques. Dans le cas des récepteurs, certaines de ces protéines pourraient participer à leur maturation avant la formation d'un complexe avec CNIH4 ou après leur dissociation de CNIH4. Les partenaires spécifiques de CNIH4 quand à eux, pourraient être des protéines participant à l'intégration et à la maturation dans la membrane du RE de cet homologue de cornichon ou des protéines nécessitant l'action de CNIH4 pour leur propre maturation et transport. Éventuellement, une caractérisation individuelle de toutes ces protéines sera nécessaire afin de répondre à ces questions.

Cependant, pour les raisons mentionnées précédemment, nous étions davantage intéressés par les protéines communes aux deux cribles, qui sont au nombre de sept (clones 282, 377, 607, 664, 1141, 1790, 2087). L'interaction de quatre de ces protéines (clones 282, 1141, 1790 et 2087) avec le récepteur n'avait pu être confirmée par co-immunoprécipitation (article 1, figure 1B) et nous avons décidé de laisser ces protéines de côté. Le clone 664 code pour une protéine de fonction inconnue qui est principalement exprimée dans le cerveau [547]. Puisque CNIH4 est exprimée de façon ubiquitaire et que les RCPGs sont retrouvés dans les différents tissus de l'organisme, nous avons également éliminés cette protéine pour l'instant. Le clone 607 code pour la protéine nicalin qui fait partie d'un complexe avec NOMO qui antagonise la signalisation nodale, une voie de signalisation activée par des ligands de la famille TGF β qui est requise lors de l'embryogénèse chez les vertébrés pour l'induction du mésoderme et de l'endoderme ainsi que pour la formation de l'asymétrie droite-gauche [548-550]. Il est tout à fait possible que cette protéine puisse également interagir avec CNIH4 et ainsi avoir d'autres fonctions dans la cellule, mais nous avons décidé de concentrer nos efforts sur le dernier clone restant (clone 377). Celui-ci correspond à une protéine transmembranaire de fonction inconnue connue sous le nom de TMEM9 et qui appartient à une nouvelle famille de protéines conservées de *C.elegans* à l'homme décrite dans l'introduction (section 3.3). À l'image de CNIH4, l'ARNm de TMEM9 est largement distribué dans différents tissus humains et cette protéine donne un signal de BRET élevé avec le récepteur CCR5 et avec CNIH4. Nous avons donc décidé de caractériser davantage l'interaction entre cette protéine, les RCPGs et CNIH4 ainsi que son rôle potentiel dans la maturation des récepteurs et la coopération possible entre TMEM9 et CNIH4 dans cette fonction.

Interaction TMEM9-CNIH4 et TMEM9-RCPGs

Comme lors de la première étude, nous avons d'abord confirmé l'interaction TMEM9-CNIH4 par co-immunoprécipitation ainsi qu'en effectuant des courbes de titration de BRET démontrant un signal élevé qui sature très rapidement (article 2, figure 2). Des courbes de titrations entre TMEM9 et différents RCPGs ainsi que certaines protéines transmembranaires (CD4 et EGFR) qui n'interagissent pas avec CNIH4 ont également été effectuées (article 2, figure 3A). TMEM9 démontre une sélectivité d'interaction envers les RCPGs, en comparaison avec d'autres types de protéines transmembranaires, qui est remarquablement similaire à celle observée pour CNIH4, supportant l'hypothèse que ces deux protéines puissent faire partie d'un complexe interagissant avec les récepteurs. On ne peut cependant pas exclure à ce moment que ces protéines puissent interagir avec les RCPGs de façon indépendante ou même compétitionner l'une avec l'autre pour l'interaction avec les récepteurs.

Nous avons ensuite effectué des expériences de co-immunoprécipitation afin de déterminer les formes de récepteurs (immatures ou matures) interagissant avec TMEM9. Comme on peut le constater à la figure 3B et 3C de l'article 2, les formes immatures des récepteurs β 2AR et V2R sont fortement co-immunoprécipitées avec TMEM9 suggérant que ces protéines interagissent principalement dans un compartiment précoce de la voie de sécrétion (RE ou ERGIC). La colocalisation observée entre TMEM9 et le β 2AR est majoritairement diffuse (article 2, figure 5C) suggérant que ce compartiment est le RE. Ceci est semblable à ce qui était observé pour l'interaction CNIH4-RCPG. Par contre, contrairement à ce qui était observé pour CNIH4 où seulement les formes immatures des récepteurs interagissaient avec cette protéine, on observe une co-immunoprécipitation partielle des formes matures du β 2AR et du V2R avec TMEM9 (article 2, figure 3B et 3C). En comparaison avec les formes immatures, la proportion de formes matures co-immunoprécipitée est beaucoup plus faible suggérant que la majorité des récepteurs ayant traversés l'AG se sont dissociés de TMEM9. De plus, si ces protéines se dissocient lors de leur passage dans l'AG, il est fort possible que l'affinité de leur liaison soit affaiblie par rapport aux compartiments précédents (RE, ERGIC), et que nous perdions une partie des complexes lors de la solubilisation de ces protéines pour la co-immunoprécipitation. On peut également observer que les formes de poids moléculaires plus élevées faisant partie de

la bande diffuse des formes matures ne semblent pas du tout être co-immunoprécipitées avec TMEM9 (article 2, figure 3B et 3C). Ceci est particulièrement évident dans le cas du récepteur V2R. Malheureusement, nous ne savons pas pour l'instant à quoi correspondent exactement ces formes matures de plus haut poids moléculaires. La diffusion des formes matures est probablement causée par l'hétérogénéité des sucres retrouvés sur les récepteurs. J'ai mentionné dans l'introduction (section 2.6) que les différents compartiments de l'AG possèdent des enzymes de glycosylation qui leur sont spécifiques. Compte tenu des résultats précédents qui suggèrent que TMEM9 et les récepteurs se dissocient pendant leur passage dans l'AG, il serait logique de penser que les formes matures de récepteurs n'interagissant pas avec TMEM9, représentent des formes glycosylées par des enzymes situés dans les compartiments tardifs du Golgi (citerne *trans* et réseau *trans*-Golgien (TGN)). Les enzymes β 1.4-galactosyltransferase et α 2.6-sialyltransferase, par exemple, sont particulièrement enrichis dans le TGN et les citernes *trans* [441]. Des inhibiteurs supposément spécifiques de ces enzymes ont été décrits dans la littérature [551, 552] et pourraient être utilisés afin de déterminer si les formes matures de poids moléculaires élevés représentent des récepteurs modifiés par ces enzymes. Ceci permettrait de confirmer que les récepteurs se dissocient de TMEM9 dans l'AG avant d'atteindre les citernes *trans* ou le TGN. TMEM9 et son homologue TMEM9B ont été décrits comme étant également localisés dans les lysosomes et les endosomes tardifs [528, 530]. Les protéines lysosomales sont généralement synthétisées dans le RE avant d'être transportées dans l'AG puis redirigées vers ce compartiment cellulaire. Cependant, nous n'avons pas observé de localisation lysosomale de TMEM9 par microscopie confocale dans les cellules HEK293. La localisation cellulaire de cette protéine pourrait donc dépendre du contexte cellulaire et/ou de son niveau d'expression. Par contre, nous avons pu démontrer par microscopie confocale qu'une certaine proportion de TMEM9 est colocalisée avec GM130, un marqueur du Golgi (article 2, figure 4). Ceci est consistant avec la possibilité que TMEM9 puisse accompagner les récepteurs dans l'appareil de Golgi et pourrait potentiellement influencer le transport des récepteurs dans cette organelle.

Analyse de la fonction possible de TMEM9 dans le transport des RCPGs

Nous avons ensuite déterminé si TMEM9 peut influencer le transport des récepteurs en observant par immunobavardage l'effet de la surexpression de TMEM9 sur la

glycosylation des RCPGs. Comme on peut l'observer à la figure 5A de l'article 2, l'augmentation de la concentration cellulaire de TMEM9 provoque une diminution dépendante de la dose des formes matures des récepteurs β 2AR et PAFR, accompagnée d'une augmentation de leurs formes immatures suggérant que ces récepteurs sont retenus dans un compartiment cellulaire précédant leur passage dans l'AG. Afin de s'assurer que la glycosylation des récepteurs n'est pas affectée indirectement par la surexpression de TMEM9 sans influencer leur transport, nous avons également effectué des ELISA de surface démontrant la diminution de l'expression à la membrane plasmique de ces récepteurs (article 2, figure 5B). La rétention intracellulaire du récepteur β 2AR a également été confirmée par microscopie confocale qui démontre également une colocalisation très forte entre le récepteur et TMEM9 à l'intérieur de la cellule (article 2, figure 5C). La superposition des images de TMEM9 et du récepteur dévoile également une population de β 2AR située en périphérie de la cellule et qui ne semble être colocalisé avec TMEM9 (article 2, figure 5C). Cette population représente potentiellement des récepteurs qui ont réussi à atteindre la membrane plasmique et ne seraient plus en complexe avec TMEM9. Ces résultats suggèrent encore une fois qu'il y a dissociation des récepteurs de TMEM9 durant leur transport dans la voie de sécrétion. Comme c'était le cas pour CNIH4, l'ARNm de TMEM9 est exprimé dans les cellules HEK 293 (Figure 18). Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de supprimer l'expression endogène de cette protéine afin de mesurer les conséquences sur la maturation et le transport des récepteurs. On ne sait donc pas pour l'instant si à l'image de CNIH4, un niveau relativement normal d'expression de TMEM9 va favoriser la maturation des récepteurs et que sa surexpression aurait un effet dominant négatif possiblement via la titration d'un autre facteur important pour l'export des récepteurs. La déplétion de l'expression endogène de TMEM9 sera essentielle afin de bien comprendre les mécanismes d'action de cette protéine sur le transport des RCPGs.

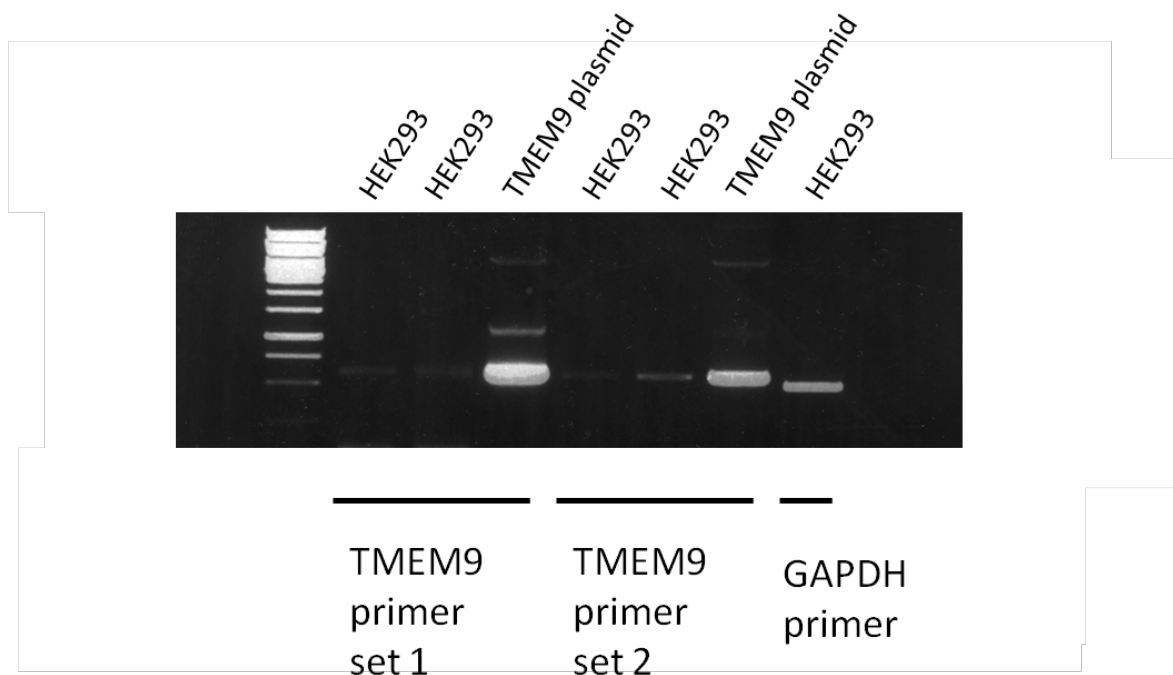


Figure 18. Expression endogène de l'ARNm de TMEM9 dans les cellules HEK 293.

Malgré cette limitation, nous avons tout de même essayé de déterminer le mécanisme par lequel la surexpression de TMEM9 retient les récepteurs dans la cellule. Comme dans le cas de CNIH4 pratiquement rien n'est connu sur les fonctions de TMEM9 ou ses partenaires protéiques dans la cellule. De plus, contrairement aux protéines cornichons, les homologues de TMEM9 chez des organismes inférieurs tels que *C.elegans* et *drosophila melanogaster*, n'ont pas été caractérisés et ne peuvent donc pas pour l'instant nous donner d'indices sur les fonctions de TMEM9 chez l'homme. La possibilité que la surexpression de TMEM9 interfère avec le repliement adéquat du récepteur β 2AR a d'abord été étudiée en déterminant l'efficacité d'une chaperone pharmacologique à rétablir la maturation normale du récepteur en présence de TMEM9. Comme mentionné dans l'introduction (section 1.7), les chaperones pharmacologiques sont des ligands lipophiles spécifiques qui ont la capacité de lier des récepteurs retenus à l'intérieur de la cellule par des défauts de repliement et de promouvoir leur maturation. Comme on peut le voir dans la figure 6A, le propranolol, dont la capacité d'agir comme chaperone pharmacologique est démontré sur le mutant β 2AR-A7, ne permet pas de rétablir la maturation du récepteur en

présence de TMEM9 (article 2, figure 6A). Comme il serait possible que TMEM9 provoque un défaut de maturation trop important pour permettre l'action de la chaperone pharmacologique, nous avons également mesuré l'effet d'un inhibiteur du protéasome sur l'expression du récepteur, car les protéines mal repliées dans le RE sont généralement dirigées vers le protéasome pour être dégradées. L'inhibition de ce complexe de dégradation ne provoque pas l'accumulation de récepteurs en présence de TMEM9 confirmant que la rétention du β 2AR n'est probablement pas due à un problème de repliement. Comme TMEM9 a été localisée dans les lysosomes par d'autres chercheurs [528], nous avons également étudié la possibilité que la surexpression de TMEM9 redirige les récepteurs vers ces organelles où ils seraient vraisemblablement dégradés. Cependant, l'inhibition des lysosomes ne provoque pas l'accumulation de récepteur suggérant que cette hypothèse est peu probable (article 2, figure 6C). De plus, l'augmentation des formes immatures de récepteurs et leur distribution relativement diffuse en présence de TMEM9 suggèrent qu'ils sont vraisemblablement retenus dans le RE. Comme les récepteurs ne semblent pas présenter de défaut de repliement, il est probable que la rétention soit provoquée par une défectuosité dans l'acheminement des récepteurs aux sites de sortie du RE et/ou de leur incorporation dans les vésicules de transport. Ceci correspond également au rôle proposé pour CNIH4 qui servirait de récepteur-cargo afin de favoriser le recrutement des RCPGs dans les vésicules COPII. Ces deux protéines pourraient donc agir à la même étape du transport des récepteurs. De plus, nous avons vu qu'elles interagissent ensembles et semblent posséder une sélectivité d'interaction similaire envers les RCPGs. CNIH4 et TMEM9 sont exprimés de façon ubiquitaire et pourraient vraisemblablement collaborer sur le transport des RCPGs dans divers tissus de l'organisme. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces deux protéines forment un complexe contrôlant l'export des récepteurs du RE.

Selon cette hypothèse, les niveaux relatifs d'expression de chaque protéines seraient probablement importants afin d'obtenir la stoechiométrie adéquate du complexe. Une telle nécessité d'interaction stoechiométrique pourrait expliquer pourquoi on observe une rétention des récepteurs dans le RE lorsque l'un ou l'autre des partenaires est surexprimé. Si cette théorie s'avérait exacte, alors la surexpression combinée de CNIH4 et TMEM9 devrait rétablir le transport normal des récepteurs à la membrane plasmique. Nous avons donc co-exprimé le récepteur β 2AR avec une concentration suffisante de CNIH4 afin de

retenir le récepteur à l'intérieur de la cellule et provoquer sa dégradation, en présence de concentrations croissantes de TMEM9 et nous avons détecté la maturation du β 2AR par immunobavardage. On peut clairement observer sur le panneau du haut de la figure 7A de l'article 2 que la co-expression de TMEM9 en présence de CNIH4 permet de restaurer l'expression totale du récepteur et surtout des formes matures indiquant que l'export du β 2AR du RE est rétabli dans les cellules surexprimant TMEM9 et CNIH4. Des ELISA de surface ont également confirmé que le récepteur est transporté à la membrane plasmique. Les niveaux d'expression de CNIH4 ne sont pas influencés par la présence de TMEM9 permettant d'exclure que la restauration de la maturation des récepteurs ne soit due à une simple inhibition de l'expression de CNIH4. Ce résultat pourrait être expliqué de deux façons. Premièrement, TMEM9 et CNIH4 pourraient former un complexe dans lequel ces deux protéines ne sont plus en mesure d'interagir avec le récepteur permettant ainsi de le libérer et permettre son transport à la membrane plasmique. Lors de la même expérience, nous avons mesuré l'association β 2AR-CNIH4 par co-immunoprécipitation et on peut observer que bien que TMEM9 augmente la quantité de récepteur dans la cellule, la quantité de CNIH4 associée au β 2AR est diminuée. Ceci pourrait suggérer que la présence de TMEM9 inhibe la capacité de CNIH4 d'interagir avec le récepteur ce qui irait dans le même sens que le premier mécanisme proposé. Celui-ci impliquerait alors que TMEM9 et CNIH4 ne peuvent interagir simultanément avec le récepteur et il serait alors moins probable qu'ils forment un complexe contrôlant la maturation des RCPGs.

L'autre possibilité est que comme mentionné précédemment, TMEM9 et CNIH4 font partie d'un complexe dont la stoechiométrie de chacun des partenaires est importante pour ses fonctions dans le transport des RCPGs. À ce moment, la diminution de l'association CNIH4-récepteur en présence de TMEM9 ne serait pas provoquée par une compétition directe de l'interaction, mais serait plutôt une conséquence indirecte du rétablissement de la maturation des récepteurs. En effet, lorsque ces derniers sont transportés normalement dans la voie de sécrétion, ils n'interagissent que de façon transitoire avec CNIH4 et la majorité des récepteurs dans la cellule ne sont donc pas en complexe avec CNIH4. Afin de distinguer entre ces deux possibilités, nous avons voulu tirer avantage du fait que l'expression exogène de CNIH4 à basse concentration favorise la maturation d'un récepteur β 2AR mutant (β 2AR-A7) normalement retenu dans le RE et nous avons co-exprimé TMEM9 avec CNIH4 pour mesurer l'effet sur la maturation de ce

mutant. Si TMEM9 empêchait simplement l'interaction de CNIH4 avec le récepteur, on devrait s'attendre à une inhibition de la maturation du β 2AR-A7 favorisée par CNIH4. Au contraire, bien que TMEM9 exprimé seul n'ait aucun effet sur la maturation du β 2AR-A7 (article 2, figure 8, lane 2), lorsqu'il est co-exprimé avec CNIH4, on observe une augmentation des formes matures et immatures du récepteur mutant par rapport à l'expression de CNIH4 seul (article 2, figure 8, lane 3, 4, 5). De plus, une concentration plus élevée de TMEM9 démontre une efficacité de potentialisation moindre (article 2, figure 8, lane 6) démontrant encore une fois l'importance des niveaux relatifs d'expression de ces protéines sur leurs fonctions. Ces résultats ne peuvent s'expliquer par un simple mécanisme où TMEM9 compétitionne directement l'interaction récepteur-CNIH4 et suggèrent encore plus fortement que TMEM9 et CNIH4 forment un complexe contrôlant la maturation des récepteurs. Afin d'appuyer davantage ce modèle, il serait très intéressant de démontrer que ces 3 protéines (TMEM9, CNIH4 et récepteur) peuvent interagir simultanément dans des cellules vivantes. Afin de mesurer l'interaction de trois différents partenaires, nous pourrions combiner l'essai de BRET à celui de complémentation de protéines (PCA). Ce dernier permet également de détecter la proximité entre deux protéines et repose sur la reconstitution d'un enzyme ou d'un fluorophore fonctionnel, par exemple la YFP, à partir de deux fragments de cette protéine fluorescente qui ont été fusionnés à deux partenaires protéiques, A et B dans l'exemple [553](Figure 19).

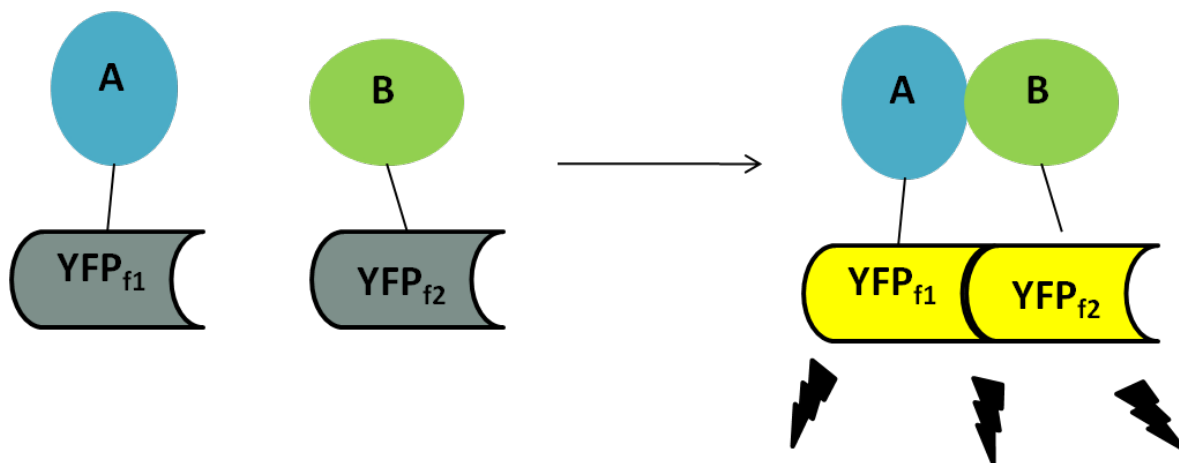


Figure 19. Représentation schématique de l'essai de complémentation protéique (PCA). L'interaction entre les protéines A et B permet de reconstituer une YFP fluorescente à partir des deux fragments non-fonctionnels de la YFP (YFP_{f1} et YFP_{f2}).

En ayant une troisième partenaire qui est fusionné à la luciférase, il est donc possible de mesurer un signal de BRET seulement si les trois protéines interagissent simultanément. Cette technique a été utilisée avec succès afin démontrer que la protéine d'export RAMP1 interagit avec un homodimère du récepteur CRLR [477] et pourrait donc être employée pour détecter l'existence d'un complexe TMEM9-CNIH4-RCPG (Figure 20).

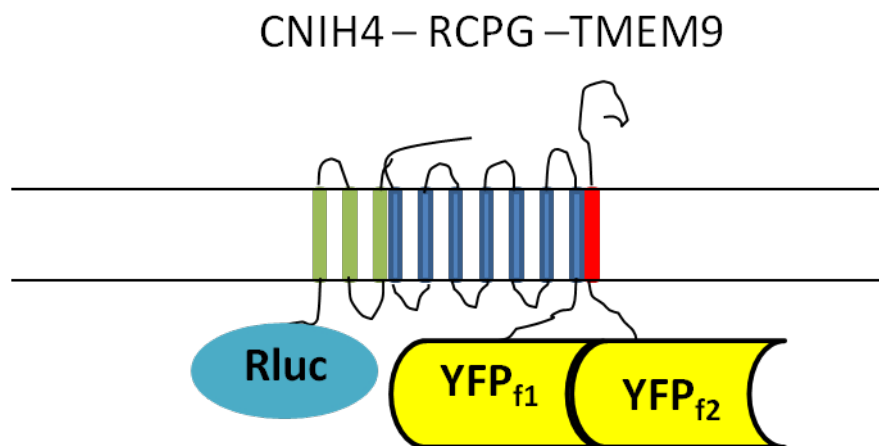


Figure 20. Combinaison BRET-PCA pour la détection de l'interaction entre trois partenaires

Mécanismes d'action concertés de CNIH4 et TMEM9

Étant donné que les fonctions cellulaires de CNIH4 et TMEM9 sont encore très mal définies, il est assez difficile d'émettre un modèle permettant d'expliquer la coopération de ces deux protéines dans la maturation des RCPGs. Malgré tout, certains résultats obtenus au cours de ces études permettent d'énoncer quelques hypothèses pouvant expliquer ce phénomène et qui seraient intéressantes à explorer dans le futur. Je voudrais d'abord revenir sur l'observation que la surexpression de CNIH4 provoque non seulement la rétention du récepteur dans le RE, mais également sa dégradation par le protéasome. Cette dégradation ne semble pas être une simple conséquence indirecte de l'accumulation de récepteur dans le RE puisque bien que la suppression de l'expression de CNIH4 provoque la rétention du β 2AR à l'intérieur de la cellule, on n'observe pas d'augmentation de la dégradation du récepteur par le protéasome. Au contraire, l'expression totale du récepteur augmente légèrement lorsque les niveaux cellulaires de CNIH4 sont diminués (résultat non-montré).

Ceci suggère qu'en plus de sa fonction potentielle comme récepteur-cargo pour le recrutement des RCPGs dans les vésicules COPII, CNIH4 joue également un rôle actif dans la dégradation des récepteurs à partir du RE. CNIH4 pourrait donc avoir une fonction positive ou négative dans le processus de maturation des RCPGs. Ceci rappelle le double rôle de plusieurs chaperones, telles que BiP, GRP94 et certaines PDI, qui favorisent le repliement des protéines dans le RE mais participent également à leur dégradation [317, 324, 333-335]. L'équilibre entre ces deux fonctions pourrait être influencé par le niveau d'expression de CNIH4 mais probablement aussi par son interaction avec d'autres protéines dans le RE. Il serait intéressant de déterminer si CNIH4 peut interagir avec une ou plusieurs des protéines impliquées dans la voie de dégradation associée au RE qui ont été décrites dans l'introduction (section 2.3). Il est possible que la présence de TMEM9 en complexe avec CNIH4 favorise la capacité de ce dernier à augmenter l'export des récepteurs du RE aux dépens de leur dégradation. Par exemple, l'interaction entre CNIH4 et les protéines de l'enveloppe des vésicules COPII pourrait être facilitée par la présence de TMEM9. Nous pourrions essayer de mesurer par co-immunoprécipitation l'influence de TMEM9 sur l'association CNIH4-Sec23/24. On pourrait aussi tenter de mesurer l'interaction entre CNIH4, TMEM9, les récepteurs et les protéines de l'enveloppe COPII en BRET en utilisant une protéine Sec23 fusionnée à la YFP [554].

TMEM9 pourrait également inhiber la fonction de dégradation de CNIH4. Cette hypothèse semble supportée par les différents résultats obtenus avec le mutant β 2AR-A7 normalement retenu dans le RE. Nous avons observé que la surexpression de CNIH4 provoque l'apparition de formes matures de ce récepteur mais également de formes de poids moléculaires inférieurs qui représentent probablement des intermédiaires déglycosylés de dégradation (article 1, figure 8A). Ces résultats concordent avec l'hypothèse que CNIH4 puissent favoriser à la fois l'export du RE ou la dégradation des récepteurs. Par contre, la co-expression de TMEM9 avec CNIH4 augmente l'expression des formes matures et immatures du récepteur mutant β 2AR-A7 (article 2, figure 8), sans augmenter les formes intermédiaires de dégradation. Comme TMEM9 seul n'influence pas l'expression et la maturation de ce récepteur, bien qu'il puisse interagir avec le β 2AR-A7 (Figure 21), cet effet dépend de la présence de CNIH4 et suggère que la co-expression de TMEM9 inhibe la dégradation du récepteur induite par CNIH4.

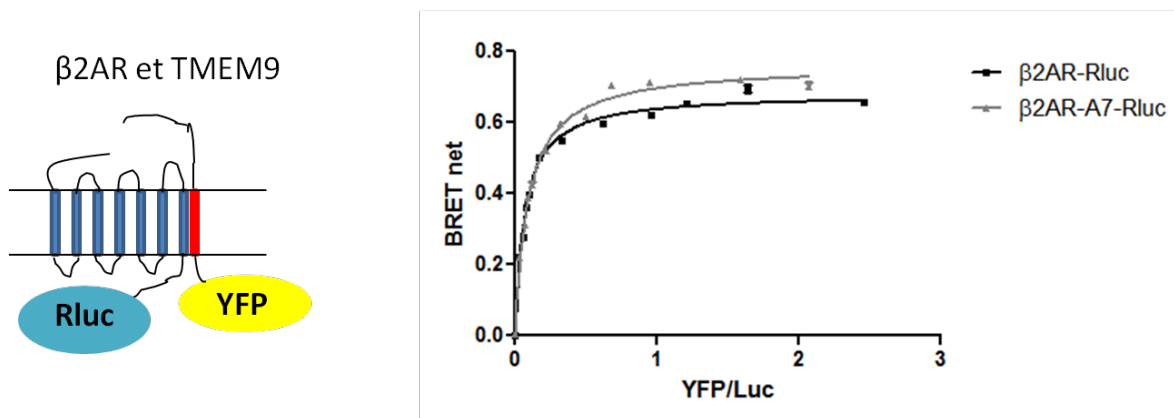


Figure 21 Courbes de titration de BRET entre TMEM9 et $\beta 2AR$ ou $\beta 2AR$ -A7. Des cellules HEK 293 ont été transfectées avec une quantité constante de $\beta 2AR$ -Rluc ou $\beta 2AR$ -A7-Rluc et des quantités croissantes de TMEM9-YFP, et les signaux de BRET ont été mesurés.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous pourrions mesurer l'influence de CNIH4 et de TMEM9 sur la cinétique de dégradation du récepteur $\beta 2AR$ -A7 en effectuant des études de marquage métabolique pulsé suivi de chasse. Pour ce faire, les récepteurs nouvellement synthétisés sont d'abord radio-marqués avec un mélange de ^{35}S -méthionine/cystéine introduit dans le milieu de culture cellulaire, puis le milieu de marquage est substitué par un milieu sans radioactivité pour différentes périodes de temps et la dégradation du récepteur est mesurée par la disparition du signal radioactif détecté par autoradiographie suite à l'immunoprécipitation du récepteur et sa migration sur gel SDS-PAGE. Si cette hypothèse s'avérait exacte, il serait ensuite intéressant de déterminer de quelle façon TMEM9 peut inhiber la dégradation induite par CNIH4. Nous avons vu que la surexpression de TMEM9 provoque la rétention de récepteurs mais ne provoque pas une augmentation de leur dégradation suggérant que cette protéine n'est pas liée à la machinerie de dégradation des protéines cellulaires. Il serait possible que la présence de TMEM9 associé à CNIH4 empêche la liaison à ce dernier de facteur(s) impliqué(s) dans la dégradation des récepteurs. Il a été proposé que la surexpression de la protéine EDEM1 favorise simultanément la dégradation et l'expression à la membrane plasmique d'un mutant de la rhodopsine retenu dans le RE [356], ce qui rappelle étrangement les résultats obtenus avec CNIH4 dans cette thèse. Il serait intéressant d'étudier s'il peut y avoir un lien entre CNIH4, TMEM9 et

EDEM1. De toute évidence, beaucoup de travail reste à accomplir afin d'élucider les mécanismes précis par lesquels ces protéines influencent la maturation des RCPGs.

Perspectives

Plusieurs expériences liées aux résultats présentés dans cette thèse ont été proposées afin de raffiner notre compréhension des mécanismes d'action de TMEM9 et CNIH4 dans le transport des RCPGs. J'aimerais maintenant proposer brièvement divers projets à plus long terme qui pourraient permettre d'élucider les fonctions précises de ces protéines. Comme très peu d'information est disponible sur ces deux protéines, l'identification des autres partenaires protéiques de CNIH4 et de TMEM9 sera bien sûr essentielle afin de déterminer quelle(s) étape(s) de la maturation des RCPGs sont contrôlées par ces protéines. Le crible présenté dans le deuxième article présente plusieurs protéines interagissant potentiellement avec CNIH4, cependant ces protéines sont également peu caractérisées et demanderont beaucoup de recherche pour identifier leurs fonctions. Il serait donc intéressant d'identifier des partenaires de CNIH4 et TMEM9 dont les fonctions sont déjà connues. Pour ce faire, la purification en tandem avec la technique de spectrométrie de masse pourrait être employée afin d'identifier des protéines en complexe avec CNIH4 et TMEM9 [555]. Ensuite, la queue C-terminale de TMEM9 est très bien conservée dans l'évolution ce qui suggère que cette région est très importante pour les fonctions de cette protéine. Un criblage utilisant la technique de deux-hybrides dans la levure et ciblant la queue C-Terminale de TMEM9 permettrait d'identifier des protéines interagissant avec cette région. Cette région de TMEM9 contient également un site de phosphorylation (S137) [556, 557] qui pourrait être important pour ses fonctions et influencer la maturation des RCPGs. Ce site pourrait être muté afin d'empêcher la phosphorylation ou au contraire d'imiter la présence d'un groupement phosphate et étudier l'influence de la phosphorylation de ce site dans les fonctions de TMEM9 sur la maturation des RCPGs.

En plus du contrôle du transport antérograde des RCPGs, TMEM9 pourrait également réguler d'autres aspects de l'activité des récepteurs. En effet, il a été proposé que cette protéine serait présente dans les endosomes et les lysosomes [528]. Elle pourrait donc influencer la destinée des récepteurs suite à leur internalisation à partir de la membrane plasmique. Nous avons vu dans l'introduction que suite à leur internalisation, les RCPGs peuvent être recyclés à la surface ou diriger vers les lysosomes où ils seront dégradés.

Comme cela a été observé pour certaines protéines interagissant avec les RCPGs telles que les β -arrestin, EBP50/NHERF et GASP [91, 93, 94], l'interaction de TMEM9 avec les RCPGs dans les compartiments post-endocytiques pourrait être impliquée dans le processus de décision menant au recyclage ou à la dégradation des récepteurs.

Enfin, TMEM9 pourrait également être impliquée dans la signalisation induite par les RCPGs. En effet, il a été démontré que la protéine TMEM9B, un homologue de TMEM9, est essentielle pour l'activation de plusieurs MAPK et de la voie NF- κ B en réponse à divers stimuli inflammatoires. Ces voies de signalisation sont induites par de multiples RCPGs [558-561] et il serait intéressant de déterminer si TMEM9 peut influencer le comportement cellulaire suite à l'activation des récepteurs.

Approches thérapeutiques

L'importance des récepteurs couplés aux protéines G dans le contrôle des diverses fonctions cellulaires est reflétée par le très grand nombre de médicaments ciblant cette classe de protéines. Les travaux décrits dans cette thèse avaient pour objectif une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de régulation de l'expression à la membrane plasmique des RCPGs et non le développement immédiat de nouvelles approches thérapeutiques. On peut cependant imaginer diverses façons dont les fonctions de CNIH4 et TMEM9 dans le transport des récepteurs à 7TM pourraient éventuellement être exploitées afin de développer de nouveaux composés pour le traitement de diverses maladies. Par exemple, la découverte de molécules inhibant l'interaction entre CNIH4 et les récepteurs, qui provoqueraient la rétention intracellulaire des RCPGs, pourraient représenter une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de maladies qui sont causées par la surexpression ou l'expression d'un récepteur constitutivement actif. Ces molécules pourraient également être utilisées pour prévenir l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dont certaines souches nécessitent l'expression à la surface du récepteur des chemokines CCR5 [142, 143]. Des molécules liant directement le récepteur et bloquant l'interaction avec CNIH4, pourraient permettre un certain niveau de sélectivité entre les différents RCPGs et diminuer le risque d'effets secondaires. Nous avons vu que le niveau d'expression relatif de CNIH4 et TMEM9 est très important pour leurs fonction dans le transport des récepteurs. Le développement rapide des techniques d'interférence de l'ARN pour des fins thérapeutiques au cours des dernières années [562],

pourraient éventuellement permettre de supprimer l'expression de ces protéines et affecter le transport des RCPGs. Une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant l'expression des gènes de CNIH4 et TMEM9 pourraient aussi permettre le développement de composés contrôlant l'expression de ces protéines.

Nous avons également vu que l'expression de CNIH4 et de TMEM9 peut influencer la maturation d'un récepteur β 2AR mutant normalement retenu dans le RE. Des résultats préliminaires suggèrent que CNIH4 peut également favoriser la maturation de certains récepteurs de la vasopressin 2 mutants qui causent le diabète insipide néphrogénique. Ceci suggère que les fonctions de CNIH4 et TMEM9 dans la maturation des RCPGs pourraient éventuellement être exploitées pour le développement de traitement ciblant les nombreuses maladies conformationnelles causées par des mutations dans les récepteurs qui provoquent leur rétention intracellulaire (introduction, section 1.7). Il serait intéressant de déterminer si l'utilisation de chaperones pharmacologiques puisse être combinée au contrôle de l'expression de CNIH4 et TMEM9 afin d'optimiser la restauration de l'expression à la membrane plasmique des récepteurs mutants.

Comme CNIH4 et TMEM9 sont potentiellement impliqués dans le transport de la majorité des RCPGs, le développement d'approches thérapeutiques ciblant les fonctions de ces protéines auraient probablement pour conséquence négative la présence de nombreux effets secondaires. Par contre, la multiplicité des récepteurs affectés par ces protéines implique qu'un traitement basé sur le contrôle de leur expression ou de leur interaction avec les RCPGs, pourrait être appliqué à diverses maladies causées par différents récepteurs.

Conclusion

Le contrôle des différents aspects de l'activité des protéines cellulaires nécessitent la formation d'interaction avec d'autres protéines. Dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G, plusieurs partenaires protéiques sont nécessaires afin de permettre l'activation des diverses voies de signalisation induites par les récepteurs. Plusieurs classes de protéines sont responsables, au contraire, d'inhiber l'activité des RCPGs. Enfin, les RCPGs doivent être transportés du compartiment cellulaire où ils sont synthétisés, le reticulum endoplasmique, jusqu'à la membrane plasmique afin de pouvoir accomplir leurs fonctions. La maturation des RCPGs implique également la participation de nombreuses protéines. L'identification des protéines interagissant avec les RCPGs est donc essentielle à une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant l'activité de cette importante classe de cibles pharmacologiques, et pourrait mener au développement d'approches thérapeutiques basées sur la modulation de ces interactions.

Lors de cette thèse, le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) a été utilisé afin d'effectuer un crible protéomique qui a mené à l'identification de plusieurs nouveaux partenaires potentiels des RCPGs localisés dans la voie de sécrétion. Bien que différentes techniques permettant l'étude d'interactions protéines-protéines telles que la co-immunoprécipitation, le pull-down de protéines *in vitro* et le deux-hybrides en levure sont utilisées depuis plusieurs années, le BRET permet l'étude d'interactions à l'intérieur de cellules de mammifères vivantes et est mieux adapté pour l'étude de protéines transmembranaires. Considérant la multitude et la diversité des protéines interagissant avec les RCPGs, le développement et l'utilisation de différentes techniques de détection d'interactions, chacune possédant ses avantages et inconvénients, est nécessaire pour l'identification de toutes les protéines associées aux récepteurs.

La caractérisation fonctionnelle de deux des protéines identifiées dans le crible a permis de démontrer que CNIH4 et TMEM9 interagissent sélectivement avec les RCPGs et forment un complexe contrôlant la maturation des récepteurs. Ces deux protéines sont exprimées de façon ubiquitaire et interagissent avec un grand nombre de récepteurs, suggérant qu'elles ont le potentiel de contrôler l'expression à la membrane plasmique de plusieurs RCPGs dans divers tissus. Les études décrites dans cette thèse représentent les

premières évidences de la fonction de TMEM9 et CNIH4 dans les cellules. De plus, le rôle potentiel de CNIH4 comme récepteur-cargo permettant le recrutement des RCPGs dans les vésicules COPII constitue un nouveau mécanisme d'export des récepteurs.

CNIH4 et TMEM9 viennent s'ajouter à une liste grandissante de facteurs cellulaires identifiés au cours des dernières années, qui influencent le transport à la membrane plasmique de certains récepteurs précis ou d'une plus large variété de RCPGs, ouvrant la voie à l'élucidation des mécanismes contrôlant l'expression à la surface cellulaire des récepteurs.

Bibliographie de l'introduction et de la discussion

1. Luttrell, L.M., *Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors*. Mol Biotechnol, 2008. **39**(3): p. 239-64.
2. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
3. Schoneberg, T., et al., *Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases*. Pharmacol Ther, 2004. **104**(3): p. 173-206.
4. Panetta, R. and M.T. Greenwood, *Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery*. Drug Discov Today, 2008. **13**(23-24): p. 1059-66.
5. Rao, V.R., G.B. Cohen, and D.D. Oprian, *Rhodopsin mutation G90D and a molecular mechanism for congenital night blindness*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 639-42.
6. Parma, J., et al., *Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 649-51.
7. Baron, J., et al., *Mutations in the Ca(2+)-sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(5): p. 601-6.
8. Schipani, E., K. Kruse, and H. Juppner, *A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia*. Science, 1995. **268**(5207): p. 98-100.
9. Shenker, A., et al., *A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 652-4.
10. Arvanitakis, L., et al., *Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation*. Nature, 1997. **385**(6614): p. 347-50.
11. Xie, J., et al., *Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 90-2.
12. Swords, F.M., et al., *Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(12): p. 2746-53.
13. Smits, G., et al., *Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor*. N Engl J Med, 2003. **349**(8): p. 760-6.
14. Bassi, M.T., et al., *Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome*. Nat Genet, 1995. **10**(1): p. 13-9.
15. Hollopeter, G., et al., *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 202-7.
16. Hirata, T., et al., *Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A2 receptor in a dominantly inherited bleeding disorder*. J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1662-7.
17. Jobert, A.S., et al., *Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 34-40.
18. Gorlov, I.P., et al., *Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(19): p. 2309-18.
19. Rosenthal, W., et al., *Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus*. Nature, 1992. **359**(6392): p. 233-5.
20. Aittomaki, K., et al., *Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure*. Cell, 1995. **82**(6): p. 959-68.
21. Pollak, M.R., et al., *Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1297-303.
22. de Roux, N., et al., *A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor*. N Engl J Med, 1997. **337**(22): p. 1597-602.

23. de Roux, N., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10972-6.
24. Collu, R., et al., *A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(5): p. 1561-5.
25. Biebermann, H., et al., *Congenital hypothyroidism caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene*. N Engl J Med, 1997. **336**(19): p. 1390-1.
26. Puffenberger, E.G., et al., *A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1257-66.
27. Wajnrajch, M.P., et al., *Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse*. Nat Genet, 1996. **12**(1): p. 88-90.
28. Vaisse, C., et al., *A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 113-4.
29. Gwinn, M.R., A. Sharma, and E. De Nardin, *Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis*. J Periodontol, 1999. **70**(10): p. 1194-201.
30. Piao, X., et al., *G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2033-6.
31. Kremer, H., et al., *Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene*. Nat Genet, 1995. **9**(2): p. 160-4.
32. Vervoort, V.S., et al., *AGTR2 mutations in X-linked mental retardation*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2401-3.
33. Dryja, T.P., et al., *A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa*. Nature, 1990. **343**(6256): p. 364-6.
34. Valverde, P., et al., *Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans*. Nat Genet, 1995. **11**(3): p. 328-30.
35. Clark, A.J., L. McLoughlin, and A. Grossman, *Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor*. Lancet, 1993. **341**(8843): p. 461-2.
36. Weston, M.D., et al., *Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(2): p. 357-66.
37. Robitaille, J., et al., *Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy*. Nat Genet, 2002. **32**(2): p. 326-30.
38. Dixon, R.A., et al., *Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin*. Nature, 1986. **321**(6065): p. 75-9.
39. Lefkowitz, R.J., *The superfamily of heptahelical receptors*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(7): p. E133-6.
40. Vogel, R., et al., *Functional role of the "ionic lock"--an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors*. J Mol Biol, 2008. **380**(4): p. 648-55.
41. Rosenbaum, D.M., S.G. Rasmussen, and B.K. Kobilka, *The structure and function of G-protein-coupled receptors*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 356-63.
42. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
43. Huang, H.C. and P.S. Klein, *The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways*. Genome Biol, 2004. **5**(7): p. 234.
44. Palczewski, K., et al., *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science, 2000. **289**(5480): p. 739-45.

45. Rasmussen, S.G., et al., *Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 2007. **450**(7168): p. 383-7.
46. Xu, F., et al., *Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor*. Science, 2011. **332**(6027): p. 322-7.
47. Rosenbaum, D.M., et al., *Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex*. Nature, 2011. **469**(7329): p. 236-40.
48. Cherezov, V., et al., *High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor*. Science, 2007. **318**(5854): p. 1258-65.
49. Chien, E.Y., et al., *Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist*. Science, 2010. **330**(6007): p. 1091-5.
50. Wu, B., et al., *Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists*. Science, 2010. **330**(6007): p. 1066-71.
51. Scheerer, P., et al., *Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation*. Nature, 2008. **455**(7212): p. 497-502.
52. Warne, T., et al., *Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 486-91.
53. Bond, R.A. and A.P. Ijzerman, *Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(2): p. 92-6.
54. Scheerer, P., et al., *Structural and kinetic modeling of an activating helix switch in the rhodopsin-transducin interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(26): p. 10660-5.
55. Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization*. Neuron, 2000. **27**(1): p. 97-106.
56. Issafras, H., et al., *Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 34666-73.
57. Terrillon, S., et al., *Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(4): p. 677-91.
58. Salahpour, A., et al., *Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33390-7.
59. Kobayashi, H., et al., *Functional rescue of beta-adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones*. Traffic, 2009. **10**(8): p. 1019-33.
60. Minneman, K.P., *Heterodimerization and surface localization of G protein coupled receptors*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(8): p. 1043-50.
61. Hague, C., et al., *Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15541-9.
62. Han, C., T.A. Esbenshade, and K.P. Minneman, *Subtypes of alpha 1-adrenoceptors in DDT1 MF-2 and BC3H-1 clonal cell lines*. Eur J Pharmacol, 1992. **226**(2): p. 141-8.
63. Hague, C., et al., *Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13672-6.
64. Gales, C., et al., *Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 778-86.
65. Nobles, M., A. Benians, and A. Tinker, *Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18706-11.
66. Downes, G.B. and N. Gautam, *The G protein subunit gene families*. Genomics, 1999. **62**(3): p. 544-52.
67. Albert, P.R. and L. Robillard, *G protein specificity: traffic direction required*. Cell Signal, 2002. **14**(5): p. 407-18.

68. Morris, A.J. and S. Scarlata, *Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes.* Biochem Pharmacol, 1997. **54**(4): p. 429-35.
69. Kurose, H., *Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction.* Life Sci, 2003. **74**(2-3): p. 155-61.
70. Gao, X., et al., *Conditional stimulation of type V and VI adenylyl cyclases by G protein betagamma subunits.* J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 294-302.
71. Boyer, J., A. Paterson, and T.K. Harden, *G-protein-mediated regulation of phospholipase C Involvement of betagamma subunits.* Trends Cardiovasc Med, 1994. **4**(2): p. 88-95.
72. Wickman, K.D., et al., *Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel.* Nature, 1994. **368**(6468): p. 255-7.
73. Meir, A., et al., *Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of alpha 1 B by G beta gamma.* Biophys J, 2000. **79**(2): p. 731-46.
74. Jernigan, K.K., et al., *Gbetagamma activates GSK3 to promote LRP6-mediated beta-catenin transcriptional activity.* Sci Signal, 2010. **3**(121): p. ra37.
75. Ahmed, S.M., et al., *G protein betagamma subunits regulate cell adhesion through Rap1a and its effector Radil.* J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6538-51.
76. Stoffel, R.H., 3rd, J.A. Pitcher, and R.J. Lefkowitz, *Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates.* J Membr Biol, 1997. **157**(1): p. 1-8.
77. Dupre, D.J., et al., *Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking.* J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34561-73.
78. Jamora, C., et al., *Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D.* Cell, 1999. **98**(1): p. 59-68.
79. Irannejad, R. and P.B. Wedegaertner, *Regulation of constitutive cargo transport from the trans-Golgi network to plasma membrane by Golgi-localized G protein betagamma subunits.* J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32393-404.
80. Saini, D.K., et al., *Regulation of Golgi structure and secretion by receptor-induced G protein betagamma complex translocation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(25): p. 11417-22.
81. Perry, S.J., et al., *Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins.* Science, 2002. **298**(5594): p. 834-6.
82. Berstein, G., et al., *Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator.* Cell, 1992. **70**(3): p. 411-8.
83. Ross, E.M. and T.M. Wilkie, *GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins.* Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 795-827.
84. Ross, E.M., *G protein GTPase-activating proteins: regulation of speed, amplitude, and signaling selectivity.* Recent Prog Horm Res, 1995. **50**: p. 207-21.
85. Pitcher, J., et al., *Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms.* Biochemistry, 1992. **31**(12): p. 3193-7.
86. Lohse, M.J., et al., *Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems.* J Biol Chem, 1992. **267**(12): p. 8558-64.
87. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals.* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 3): p. 455-65.
88. Goodman, O.B., Jr., et al., *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor.* Nature, 1996. **383**(6599): p. 447-50.
89. Laporte, S.A., et al., *The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3712-7.

90. Oakley, R.H., et al., *Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis**. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19452-60.
91. Oakley, R.H., et al., *Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17201-10.
92. Oakley, R.H., et al., *Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32248-57.
93. Cao, T.T., et al., *A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor*. Nature, 1999. **401**(6750): p. 286-90.
94. Whistler, J.L., et al., *Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors*. Science, 2002. **297**(5581): p. 615-20.
95. Okamoto, Y. and S. Shikano, *Phosphorylation-dependent C-terminal binding of 14-3-3 proteins promotes cell surface expression of HIV co-receptor GPR15*. J Biol Chem, 2011. **286**(9): p. 7171-81.
96. Qanbar, R. and M. Bouvier, *Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function*. Pharmacol Ther, 2003. **97**(1): p. 1-33.
97. Mitchell, D.A., et al., *Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases*. J Lipid Res, 2006. **47**(6): p. 1118-27.
98. Fukata, M., et al., *Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes*. Neuron, 2004. **44**(6): p. 987-96.
99. O'Brien, P.J. and M. Zatz, *Acylation of bovine rhodopsin by [3H]palmitic acid*. J Biol Chem, 1984. **259**(8): p. 5054-7.
100. O'Dowd, B.F., et al., *Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7564-9.
101. Petaja-Repo, U.E., et al., *Distinct subcellular localization for constitutive and agonist-modulated palmitoylation of the human delta opioid receptor*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15780-9.
102. Ng, G.Y., et al., *Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor*. Eur J Pharmacol, 1994. **267**(1): p. 7-19.
103. Schulein, R., et al., *Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site*. Biochem J, 1996. **313** (Pt 2): p. 611-6.
104. Tanaka, K., et al., *Palmitoylation of human thyrotropin receptor: slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant*. Endocrinology, 1998. **139**(2): p. 803-6.
105. Percherancier, Y., et al., *Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31936-44.
106. Fukushima, Y., et al., *Palmitoylation of the canine histamine H2 receptor occurs at Cys(305) and is important for cell surface targeting*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1539**(3): p. 181-91.
107. Shenoy, S.K., et al., *Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1307-13.
108. Hislop, J.N. and M. von Zastrow, *Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors*. Traffic, 2011. **12**(2): p. 137-48.
109. Maginnis, M.S., et al., *Role of N-linked glycosylation of the 5-HT2A receptor in JC virus infection*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9677-84.
110. Dutton, A.C., et al., *Identification and functional significance of N-glycosylation of the 5-ht5A receptor*. Neurochem Int, 2008. **52**(3): p. 419-25.

111. Monk, S.A., et al., *Identification and importance of N-glycosylation of the human 5-hydroxytryptamine_{3A} receptor subunit*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(9): p. 1787-96.
112. Soto, A.G. and J. Trejo, *N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 second extracellular loop: a critical determinant for ligand-induced receptor activation and internalization*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(24): p. 18781-93.
113. Huang, Y., G.F. Wilkinson, and G.B. Willars, *Role of the signal peptide in the synthesis and processing of the glucagon-like peptide-1 receptor*. *Br J Pharmacol*, 2010. **159**(1): p. 237-51.
114. Tam, B.M. and O.L. Moritz, *The role of rhodopsin glycosylation in protein folding, trafficking, and light-sensitive retinal degeneration*. *J Neurosci*, 2009. **29**(48): p. 15145-54.
115. Yan, Y., et al., *Identification of the N-linked glycosylation sites of the human relaxin receptor and effect of glycosylation on receptor function*. *Biochemistry*, 2008. **47**(26): p. 6953-68.
116. Quirk, P.L., et al., *Three putative N-glycosylation sites within the murine 5-HT_{3A} receptor sequence affect plasma membrane targeting, ligand binding, and calcium influx in heterologous mammalian cells*. *J Neurosci Res*, 2004. **77**(4): p. 498-506.
117. Lenertz, L.Y., et al., *Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X₇ reveals a key residue important for receptor function*. *Biochemistry*, 2010. **49**(22): p. 4611-9.
118. Togawa, S., et al., *Importance of asparagine residues at positions 13 and 26 on the amino-terminal domain of human somatostatin receptor subtype-5 in signalling*. *J Biochem*, 2010. **147**(6): p. 867-73.
119. Rands, E., et al., *Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(18): p. 10759-64.
120. Mialet-Perez, J., et al., *A primate-dominant third glycosylation site of the beta₂-adrenergic receptor routes receptors to degradation during agonist regulation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(37): p. 38603-7.
121. Inglehearn, C.F., et al., *A 3-bp deletion in the rhodopsin gene in a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. *Am J Hum Genet*, 1991. **48**(1): p. 26-30.
122. Abdulaev, N.G., *Building a stage for interhelical play in rhodopsin*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(8): p. 399-402.
123. Knoers, N.V. and P.M. Deen, *Molecular and cellular defects in nephrogenic diabetes insipidus*. *Pediatr Nephrol*, 2001. **16**(12): p. 1146-52.
124. Wang, Y., et al., *Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants*. *Biochem J*, 2007. **406**(2): p. 257-63.
125. Leanos-Miranda, A., J.A. Janovick, and P.M. Conn, *Receptor-misrouting: an unexpectedly prevalent and rescuable etiology in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated hypogonadotropic hypogonadism*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(10): p. 4825-8.
126. Latronico, A.C. and D.L. Segaloff, *Naturally occurring mutations of the luteinizing-hormone receptor: lessons learned about reproductive physiology and G protein-coupled receptors*. *Am J Hum Genet*, 1999. **65**(4): p. 949-58.
127. Cangul, H., et al., *Novel TSHR mutations in consanguineous families with congenital nongoitrous hypothyroidism*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010. **73**(5): p. 671-7.
128. Doherty, E., et al., *A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(3): p. 1151-5.
129. White, E., et al., *Pharmacochaperone-mediated rescue of calcium-sensing receptor loss-of-function mutants*. *Mol Endocrinol*, 2009. **23**(7): p. 1115-23.
130. Rene, P., et al., *Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. **335**(3): p. 520-32.

131. Fuchs, S., et al., *Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease: evidence for selective loss of Gi coupling*. Mol Med, 2001. **7**(2): p. 115-24.
132. Sanchez-Laorden, B.L., et al., *Aberrant trafficking of human melanocortin 1 receptor variants associated with red hair and skin cancer: Steady-state retention of mutant forms in the proximal golgi*. J Cell Physiol, 2009. **220**(3): p. 640-54.
133. Morello, J.P., et al., *Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 887-95.
134. Bernier, V., et al., *Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 232-43.
135. Leskela, T.T., et al., *Opioid receptor pharmacological chaperones act by binding and stabilizing newly synthesized receptors in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23171-83.
136. Malaga-Diequez, L., et al., *Pharmacochaperoning of the A1 adenosine receptor is contingent on the endoplasmic reticulum*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(6): p. 940-52.
137. Noorwez, S.M., et al., *Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14442-50.
138. Janovick, J.A., et al., *Structure-activity relations of successful pharmacologic chaperones for rescue of naturally occurring and manufactured mutants of the gonadotropin-releasing hormone receptor*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **305**(2): p. 608-14.
139. Petaja-Repo, U.E., et al., *Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation*. EMBO J, 2002. **21**(7): p. 1628-37.
140. Vassart, G. and S. Costagliola, *G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(6): p. 362-72.
141. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
142. Dean, M., et al., *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study*. Science, 1996. **273**(5283): p. 1856-62.
143. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. Cell, 1996. **86**(3): p. 367-77.
144. Achour, L., et al., *An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(10): p. 528-35.
145. Higy, M., T. Junne, and M. Spiess, *Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum*. Biochemistry, 2004. **43**(40): p. 12716-22.
146. Martoglio, B. and B. Dobberstein, *Signal sequences: more than just greasy peptides*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(10): p. 410-5.
147. Zopf, D., et al., *The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence*. EMBO J, 1990. **9**(13): p. 4511-7.
148. Pool, M.R., et al., *Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome*. Science, 2002. **297**(5585): p. 1345-8.
149. Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel, *Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein*. J Cell Biol, 1981. **91**(2 Pt 1): p. 545-50.
150. Halic, M. and R. Beckmann, *The signal recognition particle and its interactions during protein targeting*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(1): p. 116-25.

151. Nagai, K., et al., *Structure, function and evolution of the signal recognition particle*. EMBO J, 2003. **22**(14): p. 3479-85.
152. Bacher, G., et al., *Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting*. Nature, 1996. **381**(6579): p. 248-51.
153. Rapiejko, P.J. and R. Gilmore, *Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum*. Cell, 1997. **89**(5): p. 703-13.
154. Gilmore, R. and G. Blobel, *Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation*. Cell, 1983. **35**(3 Pt 2): p. 677-85.
155. Kellaris, K.V., S. Bowen, and R. Gilmore, *ER translocation intermediates are adjacent to a nonglycosylated 34-kD integral membrane protein*. J Cell Biol, 1991. **114**(1): p. 21-33.
156. Connolly, T. and R. Gilmore, *The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide*. Cell, 1989. **57**(4): p. 599-610.
157. Connolly, T., P. Rapiejko, and R. Gilmore, *Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor*. Science, 1991. **252**(5009): p. 1171-3.
158. Wild, K., K.R. Rosendal, and I. Sinning, *A structural step into the SRP cycle*. Mol Microbiol, 2004. **53**(2): p. 357-63.
159. Sakaguchi, M., et al., *Functions of signal and signal-anchor sequences are determined by the balance between the hydrophobic segment and the N-terminal charge*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 16-9.
160. Sipos, L. and G. von Heijne, *Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins*. Eur J Biochem, 1993. **213**(3): p. 1333-40.
161. Wahlberg, J.M. and M. Spiess, *Multiple determinants direct the orientation of signal-anchor proteins: the topogenic role of the hydrophobic signal domain*. J Cell Biol, 1997. **137**(3): p. 555-62.
162. Audigier, Y., M. Friedlander, and G. Blobel, *Multiple topogenic sequences in bovine opsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5783-7.
163. Wallin, E. and G. von Heijne, *Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study*. Protein Eng, 1995. **8**(7): p. 693-8.
164. Schulein, R., et al., *Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors*. Eur J Cell Biol, 2011.
165. Kochl, R., et al., *The signal peptide of the G protein-coupled human endothelin B receptor is necessary for translocation of the N-terminal tail across the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 16131-8.
166. Andersson, H., et al., *Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(3): p. 570-7.
167. Alken, M., et al., *The signal peptide of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 2): p. 455-64.
168. Guan, X.M., T.S. Kobilka, and B.K. Kobilka, *Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 21995-8.
169. Grisshammer, R., R. Duckworth, and R. Henderson, *Expression of a rat neurotensin receptor in Escherichia coli*. Biochem J, 1993. **295** (Pt 2): p. 571-6.
170. Kempf, J., et al., *Expression of the human mu opioid receptor in a stable Sf9 cell line*. J Biotechnol, 2002. **95**(2): p. 181-7.
171. Besemer, J., et al., *Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1*. Nature, 2005. **436**(7048): p. 290-3.

172. Osborne, A.R., T.A. Rapoport, and B. van den Berg, *Protein translocation by the Sec61/SecY channel*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 529-50.
173. Johnson, A.E. and M.A. van Waas, *The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 799-842.
174. Gorlich, D. and T.A. Rapoport, *Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane*. Cell, 1993. **75**(4): p. 615-30.
175. Oliver, J., et al., *The Sec61 complex is essential for the insertion of proteins into the membrane of the endoplasmic reticulum*. FEBS Lett, 1995. **362**(2): p. 126-30.
176. Voigt, S., et al., *Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 25-35.
177. Alder, N.N. and A.E. Johnson, *Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 22787-90.
178. Fons, R.D., B.A. Bogert, and R.S. Hegde, *Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane*. J Cell Biol, 2003. **160**(4): p. 529-39.
179. Gorlich, D., et al., *A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation*. Nature, 1992. **357**(6373): p. 47-52.
180. Shibatani, T., et al., *Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits*. Biochemistry, 2005. **44**(16): p. 5982-92.
181. Chavan, M., A. Yan, and W.J. Lennarz, *Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 22917-24.
182. Ou, W.J., et al., *Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation*. Nature, 1993. **364**(6440): p. 771-6.
183. Boisrame, A., et al., *Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast Yarrowia lipolytica*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 24): p. 4947-56.
184. Haigh, N.G. and A.E. Johnson, *A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane*. J Cell Biol, 2002. **156**(2): p. 261-70.
185. Hamman, B.D., L.M. Hendershot, and A.E. Johnson, *BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation*. Cell, 1998. **92**(6): p. 747-58.
186. Brodsky, J.L., J. Goeckeler, and R. Schekman, *BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9643-6.
187. Beckmann, R., et al., *Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2123-6.
188. Menetret, J.F., et al., *The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation*. Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1219-32.
189. Beckmann, R., et al., *Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome*. Cell, 2001. **107**(3): p. 361-72.
190. Morgan, D.G., et al., *Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17A resolution*. J Mol Biol, 2002. **324**(4): p. 871-86.
191. Crowley, K.S., et al., *Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore*. Cell, 1994. **78**(3): p. 461-71.
192. Van den Berg, B., et al., *X-ray structure of a protein-conducting channel*. Nature, 2004. **427**(6969): p. 36-44.

193. Crowley, K.S., G.D. Reinhart, and A.E. Johnson, *The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1101-15.
194. Mothes, W., S. Prehn, and T.A. Rapoport, *Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane*. EMBO J, 1994. **13**(17): p. 3973-82.
195. Wilkinson, B.M., A.J. Critchley, and C.J. Stirling, *Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex*. J Biol Chem, 1996. **271**(41): p. 25590-7.
196. Plath, K., et al., *Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane*. Cell, 1998. **94**(6): p. 795-807.
197. Do, H., et al., *The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process*. Cell, 1996. **85**(3): p. 369-78.
198. Mothes, W., et al., *Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane*. J Cell Biol, 1998. **142**(2): p. 355-64.
199. Hessa, T., et al., *Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon*. Nature, 2005. **433**(7024): p. 377-81.
200. Heinrich, S.U., et al., *The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain*. Cell, 2000. **102**(2): p. 233-44.
201. Liao, S., et al., *Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration*. Cell, 1997. **90**(1): p. 31-41.
202. Skach, W.R., *Cellular mechanisms of membrane protein folding*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 606-12.
203. Shi, L.B., et al., *Distinct biogenesis mechanisms for the water channels MIWC and CHIP28 at the endoplasmic reticulum*. Biochemistry, 1995. **34**(26): p. 8250-6.
204. Sadlish, H., et al., *Sequential triage of transmembrane segments by Sec61alpha during biogenesis of a native multispanning membrane protein*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(10): p. 870-8.
205. Skach, W.R., et al., *Biogenesis and transmembrane topology of the CHIP28 water channel at the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 1994. **125**(4): p. 803-15.
206. Foster, W., et al., *Identification of sequence determinants that direct different intracellular folding pathways for aquaporin-1 and aquaporin-4*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34157-65.
207. Lu, Y., et al., *Reorientation of aquaporin-1 topology during maturation in the endoplasmic reticulum*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(9): p. 2973-85.
208. Tu, L., et al., *Transmembrane biogenesis of Kv1.3*. Biochemistry, 2000. **39**(4): p. 824-36.
209. Lu, Y., et al., *Co- and posttranslational translocation mechanisms direct cystic fibrosis transmembrane conductance regulator N terminus transmembrane assembly*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 568-76.
210. Bogdanov, M., et al., *To flip or not to flip: lipid-protein charge interactions are a determinant of final membrane protein topology*. J Cell Biol, 2008. **182**(5): p. 925-35.
211. Brambillasca, S., et al., *Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers*. J Cell Biol, 2006. **175**(5): p. 767-77.
212. McCormick, P.J., et al., *Cotranslational protein integration into the ER membrane is mediated by the binding of nascent chains to translocon proteins*. Mol Cell, 2003. **12**(2): p. 329-41.
213. Ismail, N., et al., *Specific transmembrane segments are selectively delayed at the ER translocon during opsin biogenesis*. Biochem J, 2008. **411**(3): p. 495-506.

214. Meacock, S.L., et al., *Different transmembrane domains associate with distinct endoplasmic reticulum components during membrane integration of a polytopic protein.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4114-29.
215. Ismail, N., S.G. Crawshaw, and S. High, *Active and passive displacement of transmembrane domains both occur during opsin biogenesis at the Sec61 translocon.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 13): p. 2826-36.
216. Hanein, D., et al., *Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation.* Cell, 1996. **87**(4): p. 721-32.
217. Pitonzo, D., et al., *Sequence-specific retention and regulated integration of a nascent membrane protein by the endoplasmic reticulum Sec61 translocon.* Mol Biol Cell, 2009. **20**(2): p. 685-98.
218. Oberdorf, J., D. Pitonzo, and W.R. Skach, *An energy-dependent maturation step is required for release of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from early endoplasmic reticulum biosynthetic machinery.* J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38193-202.
219. Hebert, D.N. and M. Molinari, *In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases.* Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1377-408.
220. White, F.H., Jr., *Regeneration of native secondary and tertiary structures by air oxidation of reduced ribonuclease.* J Biol Chem, 1961. **236**: p. 1353-60.
221. Anfinsen, C.B., et al., *The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1961. **47**: p. 1309-14.
222. Anfinsen, C.B. and E. Haber, *Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds.* J Biol Chem, 1961. **236**: p. 1361-3.
223. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains.* Science, 1973. **181**(96): p. 223-30.
224. Pace, C.N., et al., *Forces contributing to the conformational stability of proteins.* FASEB J, 1996. **10**(1): p. 75-83.
225. Rose, G.D., et al., *A backbone-based theory of protein folding.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16623-33.
226. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding.* Nature, 1996. **381**(6583): p. 571-9.
227. Brockwell, D.J. and S.E. Radford, *Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes?* Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(1): p. 30-7.
228. Netzer, W.J. and F.U. Hartl, *Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes.* Nature, 1997. **388**(6640): p. 343-9.
229. Wright, C.F., et al., *The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins.* Nature, 2005. **438**(7069): p. 878-81.
230. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo.* Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 574-81.
231. Ellis, R.J. and A.P. Minton, *Protein aggregation in crowded environments.* Biol Chem, 2006. **387**(5): p. 485-97.
232. Hendrick, J.P. and F.U. Hartl, *Molecular chaperone functions of heat-shock proteins.* Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 349-84.
233. Chang, H.C., et al., *SnapShot: molecular chaperones, Part I.* Cell, 2007. **128**(1): p. 212.
234. Tang, Y.C., et al., *SnapShot: molecular chaperones, Part II.* Cell, 2007. **128**(2): p. 412.
235. Kim, P.S., D. Bole, and P. Arvan, *Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP.* J Cell Biol, 1992. **118**(3): p. 541-9.
236. Jansens, A., E. van Duijn, and I. Braakman, *Coordinated nonvectorial folding in a newly synthesized multidomain protein.* Science, 2002. **298**(5602): p. 2401-3.

237. Land, A., D. Zonneveld, and I. Braakman, *Folding of HIV-1 envelope glycoprotein involves extensive isomerization of disulfide bonds and conformation-dependent leader peptide cleavage*. *FASEB J*, 2003. **17**(9): p. 1058-67.
238. Kleizen, B. and I. Braakman, *Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(4): p. 343-9.
239. Matlack, K.E., et al., *BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane*. *Cell*, 1999. **97**(5): p. 553-64.
240. Haas, I.G. and M. Wabl, *Immunoglobulin heavy chain binding protein*. *Nature*, 1983. **306**(5941): p. 387-9.
241. Lievremont, J.P., et al., *BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(49): p. 30873-9.
242. Kabani, M., et al., *Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(8): p. 3437-48.
243. Siffroi-Fernandez, S., et al., *Association of the thyrotropin receptor with calnexin, calreticulin and BiP. Effects on the maturation of the receptor*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(20): p. 4930-7.
244. Mizrachi, D. and D.L. Segaloff, *Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors*. *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(7): p. 1768-77.
245. Langer, I., et al., *Cell surface targeting of VPAC1 receptors: evidence for implication of a quality control system and the proteasome*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(9): p. 1663-72.
246. Tuusa, J.T., et al., *The endoplasmic reticulum Ca²⁺-pump SERCA2b interacts with G protein-coupled receptors and enhances their expression at the cell surface*. *J Mol Biol*, 2007. **371**(3): p. 622-38.
247. Gething, M.J., *Role and regulation of the ER chaperone BiP*. *Semin Cell Dev Biol*, 1999. **10**(5): p. 465-72.
248. Laufen, T., et al., *Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(10): p. 5452-7.
249. Suh, W.C., et al., *Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15223-8.
250. Johnson, J.L. and E.A. Craig, *An essential role for the substrate-binding region of Hsp40s in Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(4): p. 851-6.
251. Dudek, J., et al., *Functions and pathologies of BiP and its interaction partners*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(9): p. 1556-69.
252. Chung, K.T., Y. Shen, and L.M. Hendershot, *BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(49): p. 47557-63.
253. Weitzmann, A., J. Volkmer, and R. Zimmermann, *The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sil1 function in man and mouse*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(22): p. 5237-40.
254. Randow, F. and B. Seed, *Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(10): p. 891-6.
255. Melnick, J., J.L. Dul, and Y. Argon, *Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum*. *Nature*, 1994. **370**(6488): p. 373-5.
256. Eletto, D., D. Dersh, and Y. Argon, *GRP94 in ER quality control and stress responses*. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(5): p. 479-85.

257. Morales, C., et al., *Drosophila glycoprotein 93 Is an ortholog of mammalian heat shock protein gp96 (grp94, HSP90b1, HSPC4) and retains disulfide bond-independent chaperone function for TLRs and integrins.* J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5121-8.
258. Ostrovsky, O., et al., *An essential role for ATP binding and hydrolysis in the chaperone activity of GRP94 in cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11600-5.
259. Biswas, C., et al., *The peptide-binding activity of GRP94 is regulated by calcium.* Biochem J, 2007. **405**(2): p. 233-41.
260. Di Jeso, B., et al., *Folding of thyroglobulin in the calnexin/calreticulin pathway and its alteration by loss of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum.* Biochem J, 2003. **370**(Pt 2): p. 449-58.
261. Obermoeller, L.M., et al., *Ca²⁺ and receptor-associated protein are independently required for proper folding and disulfide bond formation of the low density lipoprotein receptor-related protein.* J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22374-81.
262. Helenius, A. and M. Aebi, *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum.* Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 1019-49.
263. Nilsson, I.M. and G. von Heijne, *Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane.* J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5798-801.
264. Schallus, T., et al., *Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3404-14.
265. Barile, M., et al., *Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct.* Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(8): p. 1095-106.
266. Hammond, C., I. Braakman, and A. Helenius, *Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(3): p. 913-7.
267. Hebert, D.N., B. Foellmer, and A. Helenius, *Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum.* Cell, 1995. **81**(3): p. 425-33.
268. Schrag, J.D., et al., *The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding.* Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 633-44.
269. Frickel, E.M., et al., *TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 1954-9.
270. Leach, M.R., et al., *Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin.* J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29686-97.
271. Pollock, S., et al., *Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system.* EMBO J, 2004. **23**(5): p. 1020-9.
272. Snapp, E.L., et al., *The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells.* J Cell Biol, 2004. **164**(7): p. 997-1007.
273. Chevet, E., et al., *Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes.* EMBO J, 1999. **18**(13): p. 3655-66.
274. Chen, W., et al., *Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(14): p. 6229-33.
275. Oliver, J.D., et al., *The glut 1 glucose transporter interacts with calnexin and calreticulin.* J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13691-6.
276. Mirazimi, A., M. Nilsson, and L. Svensson, *The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro.* J Virol, 1998. **72**(11): p. 8705-9.
277. Caramelo, J.J., et al., *UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 86-91.

278. Taylor, S.C., et al., *Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein:glucosyltransferase*. EMBO Rep, 2003. **4**(4): p. 405-11.
279. Rajagopalan, S., Y. Xu, and M.B. Brenner, *Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin*. Science, 1994. **263**(5145): p. 387-90.
280. Arunachalam, B. and P. Cresswell, *Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin*. J Biol Chem, 1995. **270**(6): p. 2784-90.
281. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 21839-44.
282. Cannon, K.S., D.N. Hebert, and A. Helenius, *Glycan-dependent and -independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14280-4.
283. Cannon, K.S. and P. Cresswell, *Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82*. EMBO J, 2001. **20**(10): p. 2443-53.
284. Swanton, E., S. High, and P. Woodman, *Role of calnexin in the glycan-independent quality control of proteolipid protein*. EMBO J, 2003. **22**(12): p. 2948-58.
285. Rozell, T.G., et al., *Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin*. Endocrinology, 1998. **139**(4): p. 1588-93.
286. Morello, J.P., et al., *Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus*. Biochemistry, 2001. **40**(23): p. 6766-75.
287. Lanctot, P.M., et al., *Role of N-glycan-dependent quality control in the cell-surface expression of the AT1 receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(2): p. 395-402.
288. Rosenbaum, E.E., R.C. Hardie, and N.J. Colley, *Calnexin is essential for rhodopsin maturation, Ca²⁺ regulation, and photoreceptor cell survival*. Neuron, 2006. **49**(2): p. 229-41.
289. Lu, M., F. Echeverri, and B.D. Moyer, *Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors*. Traffic, 2003. **4**(6): p. 416-33.
290. Fan, J., et al., *A point mutation in the human melanin concentrating hormone receptor 1 reveals an important domain for cellular trafficking*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(10): p. 2579-90.
291. Appenzeller-Herzog, C. and L. Ellgaard, *The human PDI family: versatility packed into a single fold*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(4): p. 535-48.
292. Rutkevich, L.A. and D.B. Williams, *Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(2): p. 157-66.
293. Tu, B.P. and J.S. Weissman, *Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences*. J Cell Biol, 2004. **164**(3): p. 341-6.
294. Tian, G., et al., *The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites*. Cell, 2006. **124**(1): p. 61-73.
295. Cai, H., C.C. Wang, and C.L. Tsou, *Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 24550-2.
296. Quan, H., G. Fan, and C.C. Wang, *Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17078-80.
297. Oliver, J.D., et al., *Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins*. Science, 1997. **275**(5296): p. 86-8.
298. Van der Wal, F.J., J.D. Oliver, and S. High, *The transient association of ERp57 with N-glycosylated proteins is regulated by glucose trimming*. Eur J Biochem, 1998. **256**(1): p. 51-9.

299. Ayala Yanez, R. and P.M. Conn, *Protein disulfide isomerase chaperone ERP-57 decreases plasma membrane expression of the human GnRH receptor*. *Cell Biochem Funct*, 2010. **28**(1): p. 66-73.
300. Lucca-Junior, W., J.A. Janovick, and P.M. Conn, *Participation of the endoplasmic reticulum protein chaperone thio-oxidoreductase in gonadotropin-releasing hormone receptor expression at the plasma membrane*. *Braz J Med Biol Res*, 2009. **42**(2): p. 164-7.
301. Hammad, M.M. and D.J. Dupre, *Chaperones contribute to G protein coupled receptor oligomerization, but do not participate in assembly of the G protein with the receptor signaling complex*. *J Mol Signal*, 2010. **5**: p. 16.
302. Kiefhaber, T., et al., *Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions*. *Biochemistry*, 1990. **29**(12): p. 3061-70.
303. Fischer, G., et al., *Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins*. *Nature*, 1989. **337**(6206): p. 476-8.
304. Kozlov, G., et al., *Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(46): p. 35551-7.
305. Meunier, L., et al., *A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4456-69.
306. Wang, Y., et al., *The binding of FKBP23 to BiP modulates BiP's ATPase activity with its PPIase activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **354**(1): p. 315-20.
307. Davis, E.C., et al., *Identification of tropoelastin as a ligand for the 65-kD FK506-binding protein, FKBP65, in the secretory pathway*. *J Cell Biol*, 1998. **140**(2): p. 295-303.
308. Braakman, I., et al., *Folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum*. *J Cell Biol*, 1991. **114**(3): p. 401-11.
309. Ward, C.L. and R.R. Kopito, *Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(41): p. 25710-8.
310. Vabulas, R.M. and F.U. Hartl, *Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function*. *Science*, 2005. **310**(5756): p. 1960-3.
311. Schubert, U., et al., *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes*. *Nature*, 2000. **404**(6779): p. 770-4.
312. Eriksson, K.K., et al., *EDEM contributes to maintenance of protein folding efficiency and secretory capacity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(43): p. 44600-5.
313. Hebert, D.N., S.C. Garman, and M. Molinari, *The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags*. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(7): p. 364-70.
314. Turner, G.C. and A. Varshavsky, *Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo*. *Science*, 2000. **289**(5487): p. 2117-20.
315. Su, K., et al., *Pre-Golgi degradation of yeast prepro-alpha-factor expressed in a mammalian cell. Influence of cell type-specific oligosaccharide processing on intracellular fate*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(19): p. 14301-9.
316. Liu, Y., et al., *Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(9): p. 5861-7.
317. Molinari, M., et al., *Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER*. *J Cell Biol*, 2002. **158**(2): p. 247-57.
318. Molinari, M., et al., *Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle*. *Science*, 2003. **299**(5611): p. 1397-400.

319. Oda, Y., et al., *EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin*. Science, 2003. **299**(5611): p. 1394-7.
320. Gong, Q., et al., *Degradation of trafficking-defective long QT syndrome type II mutant channels by the ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19419-25.
321. Olivari, S., et al., *EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(4): p. 1278-84.
322. Hirao, K., et al., *EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9650-8.
323. Bernasconi, R., et al., *A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16446-54.
324. Christianson, J.C., et al., *OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 272-82.
325. Hosokawa, N., et al., *Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans*. J Biol Chem, 2009. **284**(25): p. 17061-8.
326. Cormier, J.H., et al., *EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex*. Mol Cell, 2009. **34**(5): p. 627-33.
327. Mueller, B., B.N. Lilley, and H.L. Ploegh, *SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER*. J Cell Biol, 2006. **175**(2): p. 261-70.
328. Lilley, B.N. and H.L. Ploegh, *Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14296-301.
329. Mueller, B., et al., *SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12325-30.
330. Carvalho, P., A.M. Stanley, and T.A. Rapoport, *Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p*. Cell, 2010. **143**(4): p. 579-91.
331. Petaja-Repo, U.E., et al., *Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4416-23.
332. Ploegh, H.L., *A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 435-8.
333. Tsai, B., et al., *Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin*. Cell, 2001. **104**(6): p. 937-48.
334. Riemer, J., et al., *A luminal flavoprotein in endoplasmic reticulum-associated degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(35): p. 14831-6.
335. Ushioda, R., et al., *ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER*. Science, 2008. **321**(5888): p. 569-72.
336. Wiertz, E.J., et al., *Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 432-8.
337. Pilon, M., R. Schekman, and K. Romisch, *Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation*. EMBO J, 1997. **16**(15): p. 4540-8.
338. Plemper, R.K., et al., *Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 891-5.
339. Scott, D.C. and R. Schekman, *Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins*. J Cell Biol, 2008. **181**(7): p. 1095-105.

340. Loureiro, J., et al., *Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum*. *Nature*, 2006. **441**(7095): p. 894-7.
341. Fang, S., et al., *The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(25): p. 14422-7.
342. Hassink, G., et al., *TEB4 is a C4HC3 RING finger-containing ubiquitin ligase of the endoplasmic reticulum*. *Biochem J*, 2005. **388**(Pt 2): p. 647-55.
343. Lerner, M., et al., *The RBCC gene RFP2 (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(5): p. 1670-82.
344. Morito, D., et al., *Gp78 cooperates with RMA1 in endoplasmic reticulum-associated degradation of CFTRDeltaF508*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(4): p. 1328-36.
345. Stagg, H.R., et al., *The TRC8 E3 ligase ubiquitinates MHC class I molecules before dislocation from the ER*. *J Cell Biol*, 2009. **186**(5): p. 685-92.
346. Hirsch, C., D. Blom, and H.L. Ploegh, *A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins*. *EMBO J*, 2003. **22**(5): p. 1036-46.
347. Misaghi, S., et al., *Using a small molecule inhibitor of peptide: N-glycanase to probe its role in glycoprotein turnover*. *Chem Biol*, 2004. **11**(12): p. 1677-87.
348. Gallastegui, N. and M. Groll, *The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(11): p. 634-42.
349. Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister, *The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 1015-68.
350. Geier, E., et al., *A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome*. *Science*, 1999. **283**(5404): p. 978-81.
351. Kamimoto, T., et al., *Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(7): p. 4467-76.
352. Kruse, K.B., J.L. Brodsky, and A.A. McCracken, *Characterization of an ERAD gene as VPS30/ATG6 reveals two alternative and functionally distinct protein quality control pathways: one for soluble Z variant of human alpha-1 proteinase inhibitor (A1PiZ) and another for aggregates of A1PiZ*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(1): p. 203-12.
353. Kruse, K.B., et al., *Mutant fibrinogen cleared from the endoplasmic reticulum via endoplasmic reticulum-associated protein degradation and autophagy: an explanation for liver disease*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(4): p. 1299-308; quiz 1404-5.
354. Robben, J.H., N.V. Knoers, and P.M. Deen, *Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **289**(2): p. F265-72.
355. Granell, S., et al., *Obesity-linked variants of melanocortin-4 receptor are misfolded in the endoplasmic reticulum and can be rescued to the cell surface by a chemical chaperone*. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(9): p. 1805-21.
356. Kosmaoglou, M., et al., *A dual role for EDEM1 in the processing of rod opsin*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 24): p. 4465-72.
357. Schwieger, I., et al., *Derlin-1 and p97/valosin-containing protein mediate the endoplasmic reticulum-associated degradation of human V2 vasopressin receptors*. *Mol Pharmacol*, 2008. **73**(3): p. 697-708.
358. Schroder, M., *Endoplasmic reticulum stress responses*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(6): p. 862-94.
359. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(7): p. 519-29.
360. Kozutsumi, Y., et al., *The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins*. *Nature*, 1988. **332**(6163): p. 462-4.

361. Travers, K.J., et al., *Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation*. Cell, 2000. **101**(3): p. 249-58.
362. Oda, Y., et al., *Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation*. J Cell Biol, 2006. **172**(3): p. 383-93.
363. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
364. Okada, T., et al., *Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 2): p. 585-94.
365. Yoshida, H., et al., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell, 2001. **107**(7): p. 881-91.
366. Calfon, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
367. Bertolotti, A., et al., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 326-32.
368. Okamura, K., et al., *Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 445-50.
369. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
370. Shen, J., et al., *ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 99-111.
371. Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron, *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase*. Nature, 1999. **397**(6716): p. 271-4.
372. Lee, M.C., et al., *Bi-directional protein transport between the ER and Golgi*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 87-123.
373. Kuge, O., et al., *Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments*. J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 51-65.
374. Orci, L., et al., *Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8611-5.
375. Mezzacasa, A. and A. Helenius, *The transitional ER defines a boundary for quality control in the secretion of tsO45 VSV glycoprotein*. Traffic, 2002. **3**(11): p. 833-49.
376. Barlowe, C. and R. Schekman, *SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER*. Nature, 1993. **365**(6444): p. 347-9.
377. Sato, M., K. Sato, and A. Nakano, *Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain*. J Cell Biol, 1996. **134**(2): p. 279-93.
378. Lee, M.C., et al., *Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle*. Cell, 2005. **122**(4): p. 605-17.
379. Matsuoka, K., et al., *COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes*. Cell, 1998. **93**(2): p. 263-75.
380. Yoshihisa, T., C. Barlowe, and R. Schekman, *Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum*. Science, 1993. **259**(5100): p. 1466-8.

381. Bi, X., R.A. Corpina, and J. Goldberg, *Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat*. Nature, 2002. **419**(6904): p. 271-7.
382. Antony, B., et al., *Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(6): p. 531-7.
383. Stagg, S.M., et al., *Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly*. Cell, 2008. **134**(3): p. 474-84.
384. Hughes, H., et al., *Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 16): p. 2924-34.
385. Ivan, V., et al., *Drosophila Sec16 mediates the biogenesis of tER sites upstream of Sar1 through an arginine-rich motif*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4352-65.
386. Dong, C., et al., *Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase*. Cell Signal, 2008. **20**(6): p. 1035-43.
387. Zhuang, X., et al., *Sar1-dependent trafficking of the human calcium receptor to the cell surface*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(4): p. 874-80.
388. Martinez-Menarguez, J.A., et al., *Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles*. Cell, 1999. **98**(1): p. 81-90.
389. Nakamura, N., et al., *Identification of potential regulatory elements for the transport of Emp24p*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(12): p. 3493-503.
390. Kappeler, F., et al., *The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31801-8.
391. Giraudo, C.G. and H.J. Maccioni, *Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(9): p. 3753-66.
392. Nishimura, N. and W.E. Balch, *A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum*. Science, 1997. **277**(5325): p. 556-8.
393. Votsmeier, C. and D. Gallwitz, *An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export*. EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6742-50.
394. Wang, X., et al., *COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code*. J Cell Biol, 2004. **167**(1): p. 65-74.
395. Miller, E.A., et al., *Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles*. Cell, 2003. **114**(4): p. 497-509.
396. Wendeler, M.W., J.P. Paccaud, and H.P. Hauri, *Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum*. EMBO Rep, 2007. **8**(3): p. 258-64.
397. Dancourt, J. and C. Barlowe, *Protein sorting receptors in the early secretory pathway*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 777-802.
398. Powers, J. and C. Barlowe, *Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 880-91.
399. Bue, C.A., C.M. Bentivoglio, and C. Barlowe, *Erv26p directs pro-alkaline phosphatase into endoplasmic reticulum-derived coat protein complex II transport vesicles*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(11): p. 4780-9.
400. Bue, C.A. and C. Barlowe, *Molecular dissection of Erv26p identifies separable cargo binding and coat protein sorting activities*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24049-60.
401. Schulein, R., et al., *A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(3): p. 525-35.
402. Bermak, J.C., et al., *Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 492-8.

403. Robert, J., et al., *A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane.* J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2300-8.
404. Duvernay, M.T., et al., *A single conserved leucine residue on the first intracellular loop regulates ER export of G protein-coupled receptors.* Traffic, 2009. **10**(5): p. 552-66.
405. Zhang, X., et al., *Di-acidic motifs in the membrane-distal C-termini modulate the transport of angiotensin II receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface.* J Biol Chem, 2011.
406. Appenzeller, C., et al., *The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins.* Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. 330-4.
407. Aridor, M., et al., *Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport.* J Cell Biol, 1995. **131**(4): p. 875-93.
408. Ben-Tekaya, H., et al., *Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 2): p. 357-67.
409. Klumperman, J., et al., *The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment.* J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 22): p. 3411-25.
410. Serafini, T., et al., *ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein.* Cell, 1991. **67**(2): p. 239-53.
411. Ostermann, J., et al., *Stepwise assembly of functionally active transport vesicles.* Cell, 1993. **75**(5): p. 1015-25.
412. Cosson, P. and F. Letourneur, *Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs.* Science, 1994. **263**(5153): p. 1629-31.
413. Massaad, M.J., A. Franzusoff, and A. Herscovics, *The processing alpha1,2-mannosidase of Saccharomyces cerevisiae depends on Rer1p for its localization in the endoplasmic reticulum.* Eur J Cell Biol, 1999. **78**(7): p. 435-40.
414. Kaether, C., et al., *Endoplasmic reticulum retention of the gamma-secretase complex component Pen2 by Rer1.* EMBO Rep, 2007. **8**(8): p. 743-8.
415. Pepperkok, R., et al., *Beta-COP is essential for biosynthetic membrane transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in vivo.* Cell, 1993. **74**(1): p. 71-82.
416. Presley, J.F., et al., *Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport.* Nature, 2002. **417**(6885): p. 187-93.
417. Stephens, D.J., et al., *COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites.* J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 12): p. 2177-85.
418. Farhan, H., et al., *Signal-dependent export of GABA transporter 1 from the ER-Golgi intermediate compartment is specified by a C-terminal motif.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 6): p. 753-61.
419. Volpicelli-Daley, L.A., et al., *Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4495-508.
420. Tisdale, E.J., *Rab2 interacts directly with atypical protein kinase C (aPKC) iota/lambda and inhibits aPKC_{iota/lambda}-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase phosphorylation.* J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52524-30.
421. Cao, X., N. Ballew, and C. Barlowe, *Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins.* EMBO J, 1998. **17**(8): p. 2156-65.
422. Allan, B.B., B.D. Moyer, and W.E. Balch, *Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion.* Science, 2000. **289**(5478): p. 444-8.
423. Wu, G., G. Zhao, and Y. He, *Distinct pathways for the trafficking of angiotensin II and adrenergic receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface: Rab1-independent transport of a G protein-coupled receptor.* J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 47062-9.

424. Breuza, L., et al., *Proteomics of endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) membranes from brefeldin A-treated HepG2 cells identifies ERGIC-32, a new cycling protein that interacts with human Erv46*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47242-53.
425. Zuber, C., et al., *Immunolocalization of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase indicates involvement of pre-Golgi intermediates in protein quality control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10710-5.
426. Hsu, V.W., et al., *A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for retention of unassembled MHC class I molecules*. Nature, 1991. **352**(6334): p. 441-4.
427. Moolenaar, C.E., et al., *A mutation in a highly conserved region in brush-border sucrase-isomaltase and lysosomal alpha-glucosidase results in Golgi retention*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 5): p. 557-67.
428. Gilbert, A., et al., *Delta F508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells*. Exp Cell Res, 1998. **242**(1): p. 144-52.
429. VanSlyke, J.K., S.M. Deschenes, and L.S. Musil, *Intracellular transport, assembly, and degradation of wild-type and disease-linked mutant gap junction proteins*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(6): p. 1933-46.
430. Hermosilla, R., et al., *Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway*. Traffic, 2004. **5**(12): p. 993-1005.
431. Wilson, C., et al., *The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions*. Biochem J, 2010. **433**(1): p. 1-9.
432. Lowe, M., *Structural organization of the Golgi apparatus*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(1): p. 85-93.
433. Pfeffer, S.R., *How the Golgi works: a cisternal progenitor model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(46): p. 19614-8.
434. Orci, L., et al., *Anterograde flow of cargo across the golgi stack potentially mediated via bidirectional "percolating" COPI vesicles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10400-5.
435. Trucco, A., et al., *Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1071-81.
436. Marsh, B.J., et al., *Direct continuities between cisternae at different levels of the Golgi complex in glucose-stimulated mouse islet beta cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5565-70.
437. Patterson, G.H., et al., *Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1055-67.
438. Glick, B.S. and A. Nakano, *Membrane traffic within the Golgi apparatus*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 113-32.
439. Dunphy, W.G., et al., *Early and late functions associated with the Golgi apparatus reside in distinct compartments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7453-7.
440. Dunphy, W.G. and J.E. Rothman, *Compartmentation of asparagine-linked oligosaccharide processing in the Golgi apparatus*. J Cell Biol, 1983. **97**(1): p. 270-5.
441. Rabouille, C., et al., *Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 4): p. 1617-27.
442. Tian, E. and K.G. Ten Hagen, *Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation*. Glycoconj J, 2009. **26**(3): p. 325-34.
443. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
444. Alfalah, M., et al., *O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts*. Curr Biol, 1999. **9**(11): p. 593-6.

445. Altschuler, Y., et al., *Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 819-31.
446. Yeaman, C., et al., *The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells*. J Cell Biol, 1997. **139**(4): p. 929-40.
447. Nakagawa, M., et al., *O-Glycosylation of G-protein-coupled receptor, octopus rhodopsin. Direct analysis by FAB mass spectrometry*. FEBS Lett, 2001. **496**(1): p. 19-24.
448. Hakalahti, A.E., et al., *Human beta1-adrenergic receptor is subject to constitutive and regulated N-terminal cleavage*. J Biol Chem, 2010. **285**(37): p. 28850-61.
449. Petaja-Repo, U.E., et al., *Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13727-36.
450. Li, J.G., C. Chen, and L.Y. Liu-Chen, *N-Glycosylation of the human kappa opioid receptor enhances its stability but slows its trafficking along the biosynthesis pathway*. Biochemistry, 2007. **46**(38): p. 10960-70.
451. Sadeghi, H. and M. Birnbaumer, *O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor*. Glycobiology, 1999. **9**(7): p. 731-7.
452. Farzan, M., et al., *Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry*. Cell, 1999. **96**(5): p. 667-76.
453. Michineau, S., F. Alhenc-Gelas, and R.M. Rajerison, *Human bradykinin B2 receptor sialylation and N-glycosylation participate with disulfide bonding in surface receptor dimerization*. Biochemistry, 2006. **45**(8): p. 2699-707.
454. Bard, F. and V. Malhotra, *The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 439-55.
455. Nishimura, N., et al., *The delta subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 6755-60.
456. Stockklauser, C. and N. Klocker, *Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17000-5.
457. Gut, A., et al., *Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins*. EMBO J, 1998. **17**(7): p. 1919-29.
458. Scheiffele, P., J. Peranen, and K. Simons, *N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 96-8.
459. Scheiffele, P., M.G. Roth, and K. Simons, *Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain*. EMBO J, 1997. **16**(18): p. 5501-8.
460. Dong, C. and G. Wu, *Regulation of anterograde transport of alpha2-adrenergic receptors by the N termini at multiple intracellular compartments*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38543-54.
461. Gimelbrant, A.A., S.L. Haley, and T.S. McClintock, *Olfactory receptor trafficking involves conserved regulatory steps*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7285-90.
462. Venkatesan, S., et al., *A membrane-proximal basic domain and cysteine cluster in the C-terminal tail of CCR5 constitute a bipartite motif critical for cell surface expression*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40133-45.
463. Zhu, L., et al., *Autosomal recessive retinitis pigmentosa and E150K mutation in the opsin gene*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 22289-98.
464. Letourneur, F. and P. Cosson, *Targeting to the endoplasmic reticulum in yeast cells by determinants present in transmembrane domains*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33273-8.
465. Hammond, C. and A. Helenius, *Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus*. J Cell Biol, 1994. **126**(1): p. 41-52.

466. Chang, A. and G.R. Fink, *Targeting of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase: a novel gene AST1 prevents mislocalization of mutant ATPase to the vacuole*. J Cell Biol, 1995. **128**(1-2): p. 39-49.
467. Armstrong, J., S. Patel, and P. Riddle, *Lysosomal sorting mutants of coronavirus E1 protein, a Golgi membrane protein*. J Cell Sci, 1990. **95 (Pt 2)**: p. 191-7.
468. Reggiori, F. and H.R. Pelham, *A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(2): p. 117-23.
469. Baker, E.K., N.J. Colley, and C.S. Zuker, *The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin*. EMBO J, 1994. **13**(20): p. 4886-95.
470. Ferreira, P.A., et al., *Cyclophilin-related protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin*. Nature, 1996. **383**(6601): p. 637-40.
471. Chapple, J.P. and M.E. Cheetham, *The chaperone environment at the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum can modulate rhodopsin processing and inclusion formation*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19087-94.
472. Leclerc, P.C., et al., *A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling*. Endocrinology, 2002. **143**(12): p. 4702-10.
473. Dupre, D.J., et al., *Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for Ggamma subunits before assembly with Gbeta*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13703-15.
474. Parent, A., et al., *ANKRD13C acts as a molecular chaperone for G protein-coupled receptors*. J Biol Chem, 2010. **285**(52): p. 40838-51.
475. McLatchie, L.M., et al., *RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 333-9.
476. Hilaiet, S., et al., *Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29575-81.
477. Heroux, M., et al., *Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31610-20.
478. Bouschet, T., S. Martin, and J.M. Henley, *Receptor-activity-modifying proteins are required for forward trafficking of the calcium-sensing receptor to the plasma membrane*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4709-20.
479. Parameswaran, N. and W.S. Spielman, *RAMPs: The past, present and future*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(11): p. 631-8.
480. Saito, H., et al., *RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors*. Cell, 2004. **119**(5): p. 679-91.
481. Dwyer, N.D., et al., *Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein*. Cell, 1998. **93**(3): p. 455-66.
482. Behrens, M., et al., *Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20650-9.
483. Decallot, F.M., et al., *Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(41): p. 16045-50.
484. Loconto, J., et al., *Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules*. Cell, 2003. **112**(5): p. 607-18.
485. Webb, T.R., et al., *Distinct melanocortin 2 receptor accessory protein domains are required for melanocortin 2 receptor interaction and promotion of receptor trafficking*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 720-6.

486. Metherell, L.A., et al., *Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2*. Nat Genet, 2005. **37**(2): p. 166-70.
487. Cooray, S.N., et al., *The melanocortin 2 receptor accessory protein exists as a homodimer and is essential for the function of the melanocortin 2 receptor in the mouse y1 cell line*. Endocrinology, 2008. **149**(4): p. 1935-41.
488. Sebag, J.A. and P.M. Hinkle, *Opposite effects of the melanocortin-2 (MC2) receptor accessory protein MRAP on MC2 and MC5 receptor dimerization and trafficking*. J Biol Chem, 2009. **284**(34): p. 22641-8.
489. Svenningsson, P., et al., *Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states*. Science, 2006. **311**(5757): p. 77-80.
490. Okuse, K., et al., *Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression*. Nature, 2002. **417**(6889): p. 653-6.
491. van de Graaf, S.F., et al., *Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex*. EMBO J, 2003. **22**(7): p. 1478-87.
492. Wruck, C.J., et al., *Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 57-64.
493. Parent, A., et al., *RACK1 regulates the cell surface expression of the G protein-coupled receptor for thromboxane A(2)*. Traffic, 2008. **9**(3): p. 394-407.
494. Chen, C., et al., *GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor*. J Biol Chem, 2006. **281**(12): p. 7983-93.
495. Chen, Y., et al., *GEC1-kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like effect*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1673-85.
496. Granier, S., et al., *The multifunctional protein GC1q-R interacts specifically with the i3 loop arginine cluster of the vasopressin V2 receptor*. Regul Pept, 2008. **148**(1-3): p. 76-87.
497. Xu, Z., et al., *Interaction of the alpha(1B)-adrenergic receptor with gC1q-R, a multifunctional protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21149-54.
498. Giguere, P., et al., *Peroxiredoxin-4 interacts with and regulates the thromboxane A(2) receptor*. FEBS Lett, 2007. **581**(20): p. 3863-8.
499. Ciruela, F., M.M. Soloviev, and R.A. Mcllhenny, *Co-expression of metabotropic glutamate receptor type 1alpha with homer-1a/Vesl-15 increases the cell surface expression of the receptor*. Biochem J, 1999. **341** (Pt 3): p. 795-803.
500. Roche, K.W., et al., *Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25953-7.
501. Ango, F., et al., *Homer-dependent cell surface expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in neurons*. Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(2): p. 323-9.
502. Brandstatter, J.H., O. Dick, and T.M. Boeckers, *The postsynaptic scaffold proteins ProSAP1/Shank2 and Homer1 are associated with glutamate receptor complexes at rat retinal synapses*. J Comp Neurol, 2004. **475**(4): p. 551-63.
503. Kim, O.J., et al., *Neurofilament-M interacts with the D1 dopamine receptor to regulate cell surface expression and desensitization*. J Neurosci, 2002. **22**(14): p. 5920-30.
504. Lu, D., et al., *Cytoskeletal protein 4.1G is a binding partner of the metabotropic glutamate receptor subtype 1 alpha*. J Neurosci Res, 2004. **78**(1): p. 49-55.
505. Binda, A.V., et al., *D2 and D3 dopamine receptor cell surface localization mediated by interaction with protein 4.1N*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(3): p. 507-13.
506. Saito, M., et al., *Increase in cell-surface localization of parathyroid hormone receptor by cytoskeletal protein 4.1G*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 1): p. 75-81.
507. Lin, R., et al., *Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5258-63.

508. Tai, A.W., et al., *Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1*. Cell, 1999. **97**(7): p. 877-87.
509. Gilchrist, A., et al., *Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1265-81.
510. Ashburner, M., et al., *The genetics of a small autosomal region of Drosophila melanogaster containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. VII. Characterization of the region around the snail and cactus loci*. Genetics, 1990. **126**(3): p. 679-94.
511. Roth, S., et al., *cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in Drosophila*. Cell, 1995. **81**(6): p. 967-78.
512. Neuman-Silberberg, F.S. and T. Schupbach, *The Drosophila TGF-alpha-like protein Gurken: expression and cellular localization during Drosophila oogenesis*. Mech Dev, 1996. **59**(2): p. 105-13.
513. Herpers, B. and C. Rabouille, *mRNA localization and ER-based protein sorting mechanisms dictate the use of transitional endoplasmic reticulum-golgi units involved in gurken transport in Drosophila oocytes*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5306-17.
514. Bokel, C., et al., *Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGFalpha-like growth factor Gurken*. Development, 2006. **133**(3): p. 459-70.
515. Queenan, A.M., et al., *The transmembrane region of Gurken is not required for biological activity, but is necessary for transport to the oocyte membrane in Drosophila*. Mech Dev, 1999. **89**(1-2): p. 35-42.
516. Rexach, M.F., M. Latterich, and R.W. Schekman, *Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles*. J Cell Biol, 1994. **126**(5): p. 1133-48.
517. Belden, W.J. and C. Barlowe, *Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26939-46.
518. Powers, J. and C. Barlowe, *Transport of axl2p depends on erv14p, an ER-vesicle protein related to the Drosophila cornichon gene product*. J Cell Biol, 1998. **142**(5): p. 1209-22.
519. Nakanishi, H., Y. Suda, and A.M. Neiman, *Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 5): p. 908-16.
520. Castillon, G.A., et al., *Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast*. Traffic, 2009. **10**(2): p. 186-200.
521. Malkus, P., F. Jiang, and R. Schekman, *Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles*. J Cell Biol, 2002. **159**(6): p. 915-21.
522. Castro, C.P., et al., *Cornichon regulates transport and secretion of TGFalpha-related proteins in metazoan cells*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 14): p. 2454-66.
523. Utku, N., et al., *The human homolog of Drosophila cornichon protein is differentially expressed in alloactivated T-cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1449**(3): p. 203-10.
524. Schwenk, J., et al., *Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors*. Science, 2009. **323**(5919): p. 1313-9.
525. Kato, A.S., et al., *Hippocampal AMPA receptor gating controlled by both TARP and cornichon proteins*. Neuron, 2010. **68**(6): p. 1082-96.
526. Schober, D.A., et al., *Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and cornichon-2 allosterically regulate AMPA receptor antagonists and potentiators*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 13134-42.
527. Su, A.I., et al., *A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6062-7.

528. Kveine, M., et al., *Characterization of the novel human transmembrane protein 9 (TMEM9) that localizes to lysosomes and late endosomes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **297**(4): p. 912-7.
529. Kurokawa, Y., et al., *PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2004. **23**(1): p. 135-41.
530. Dodeller, F., et al., *The lysosomal transmembrane protein 9B regulates the activity of inflammatory signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(31): p. 21487-94.
531. Wu, P. and L. Brand, *Resonance energy transfer: methods and applications*. *Anal Biochem*, 1994. **218**(1): p. 1-13.
532. Cardullo, R.A., *Theoretical principles and practical considerations for fluorescence resonance energy transfer microscopy*. *Methods Cell Biol*, 2007. **81**: p. 479-94.
533. Simpson, J.C., et al., *Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing*. *EMBO Rep*, 2000. **1**(3): p. 287-92.
534. Snider, J., et al., *Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast*. *Nat Protoc*, 2010. **5**(7): p. 1281-93.
535. Sanderson, C.M., *The Cartographers toolbox: building bigger and better human protein interaction networks*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2009. **8**(1): p. 1-11.
536. Mehrle, A., et al., *The LIFEdb database in 2006*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Database issue): p. D415-8.
537. Yamamoto, T., *On the thickness of the unit membrane*. *J Cell Biol*, 1963. **17**: p. 413-21.
538. Mercier, J.F., et al., *Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(47): p. 44925-31.
539. Guo, W., et al., *Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(48): p. 17495-500.
540. Guo, W., et al., *Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels*. *EMBO J*, 2008. **27**(17): p. 2293-304.
541. Appenzeller-Herzog, C. and H.P. Hauri, *The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 11): p. 2173-83.
542. Appenzeller-Herzog, C., et al., *pH-induced conversion of the transport lectin ERGIC-53 triggers glycoprotein release*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 12943-50.
543. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(2): p. 112-24.
544. Duvernay, M.T., et al., *Anterograde trafficking of G protein-coupled receptors: function of the C-terminal F(X)6LL motif in export from the endoplasmic reticulum*. *Mol Pharmacol*, 2009. **75**(4): p. 751-61.
545. Saito, K., et al., *TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites*. *Cell*, 2009. **136**(5): p. 891-902.
546. Russell, C. and S.M. Stagg, *New insights into the structural mechanisms of the COPII coat*. *Traffic*, 2010. **11**(3): p. 303-10.
547. Christophe-Hobertus, C., et al., *Identification of the gene encoding Brain Cell Membrane Protein 1 (BCMP1), a putative four-transmembrane protein distantly related to the Peripheral Myelin Protein 22 / Epithelial Membrane Proteins and the Claudins*. *BMC Genomics*, 2001. **2**: p. 3.
548. Schier, A.F., *Nodal signaling in vertebrate development*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003. **19**: p. 589-621.
549. Haffner, C., et al., *The Nicastrin-like protein Nicalin regulates assembly and stability of the Nicalin-nodal modulator (NOMO) membrane protein complex*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(14): p. 10632-8.

550. Haffner, C., et al., *Nicalin and its binding partner Nomo are novel Nodal signaling antagonists*. EMBO J, 2004. **23**(15): p. 3041-50.
551. Okazaki, K., et al., *Potent and specific sialyltransferase inhibitors: imino-linked 5a'-carbadiaccharides*. Org Biomol Chem, 2003. **1**(13): p. 2229-30.
552. Gao, Y., et al., *Specificity of beta1,4-galactosyltransferase inhibition by 2-naphthyl 2-butanamido-2-deoxy-1-thio-beta-D-glucopyranoside*. Glycoconj J, 2010. **27**(7-9): p. 673-84.
553. Hu, C.D., Y. Chinenov, and T.K. Kerppola, *Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation*. Mol Cell, 2002. **9**(4): p. 789-98.
554. Ronchi, P., et al., *Transmembrane domain-dependent partitioning of membrane proteins within the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2008. **181**(1): p. 105-18.
555. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
556. Wu, F., et al., *Studies of phosphoproteomic changes induced by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK) highlight deregulation of tumor necrosis factor (TNF)/Fas/TNF-related apoptosis-induced ligand signaling pathway in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(7): p. 1616-32.
557. Mayya, V., et al., *Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions*. Sci Signal, 2009. **2**(84): p. ra46.
558. Goldsmith, Z.G. and D.N. Dhanasekaran, *G protein regulation of MAPK networks*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3122-42.
559. Milne, G.R. and T.M. Palmer, *Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 320-39.
560. Bottero, V., et al., *Phosphorylation and polyubiquitination of transforming growth factor beta-activated kinase 1 are necessary for activation of NF-kappaB by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor*. J Virol, 2011. **85**(5): p. 1980-93.
561. Chandrasekar, B., et al., *Beta-adrenergic stimulation induces interleukin-18 expression via beta2-AR, PI3K, Akt, IKK, and NF-kappaB*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(2): p. 304-11.
562. Aagaard, L. and J.J. Rossi, *RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(2-3): p. 75-86.
528. Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York. Garland Science, 2002.

Annexes

Role of N-glycosylation on the maturation and trafficking of V2 vasopressin receptor mutants.

Eric Carpentier¹, Etienne Sauvageau¹, Yves Durocher², Daniel G. Bichet³ & Michel Bouvier¹

¹Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

²Animal Cell Technology Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, Québec, Canada.

³Department of Medicine and Physiology, Université de Montréal, and Unité de recherche clinique, Centre de recherche et Service de néphrologie, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract:

A number of inherited disorders have been traced to mutations within G-protein coupled receptors that sometimes compromise cell surface expression due to their retention by the endoplasmic reticulum quality control system (ERQCS). We thus examine the involvement of N-linked glycosylation and the lectin-based network on the ERQCS for two misfolded vasopressin type 2 receptors (V2Rs) mutants linked to the etiology of congenital nephrogenic diabetes insipidus (NDI) causing either a mild or severe phenotype in patients. Our results show that the N-linked glycans, although required for Cnx interaction, are not essential for the recognition and intracellular retention of both mutants. Abolishing N-glycosylation on the mild phenotype-associated mutant (Y128S-V2R) did not affect its cellular processing while it resulted in the synthesis of a truncated misfolded entity that accumulates heavily inside the cell for the severe phenotype-associated mutant W164S-V2R. Moreover, pharmacological chaperoning was not compromised in absence of N-linked sugars for Y128S-V2R but failed to rescue the N-glycan deficient W164S-V2R, indicating that the requirement for N-linked glycosylation is mutant-specific. The interaction time between Cnx and the different N-glycosylated mutants was found longer for W164S than Y128S, in relation with their folding efficiency. While pharmacological chaperone promoted the maturation of the two mutants studied, it decreased the duration of Cnx interaction for Y128S but

had no effect in the case of the W164S, suggesting that the chaperoning action of these compounds can occur at different steps in the maturation process, depending on the nature of the mutation. Taken together, these results show that the ER processing of mutant receptors is an elaborate and multi-step mechanism that does not solely rely on lectin-based interaction and is highly influenced by the mutant itself.

Introduction:

G-protein-coupled receptors (GPCR) are the largest family of cell surface receptors, converting external stimuli into intracellular responses. Surface trafficking of newly formed receptors, together with the endocytotic pathway, determine steady-state receptor expression levels and thereby dictate the magnitude of the cellular response (for review, see (1)). Numerous inherited disorders have been traced to mutations within GPCRs that sometimes affect their maturation, which result in a reduced cell surface expression (2-14). Congenital nephrogenic diabetes insipidus (NDI) is a hereditary disease associated with renal tubular resistance to arginine-vasopressin (AVP). Patients with NDI are unable to efficiently concentrate their urine, resulting in the excretion of large volumes of hypotonic urine leading to dehydration. In ~75% of all cases, the X-linked recessive form of the disease is caused by mutations in the gene encoding the type 2 vasopressin receptor (V2R) (15), a member of the GPCR family. More than 200 distinct NDI-causing V2R mutations have been identified in more than 250 unrelated affected families (16-18). Approximately 50% of the mutations in the coding region of the V2R are missense, leading to a single amino acid substitution, while the remainder are deletions or nonsense mutations that lead to frameshifts and premature termination of the coding sequence (16). The majority of missense mutations (75 out of 95 identified) were found to affect receptor cell surface expression levels, and in most cases, this was attributed to the recognition and intracellular retention of the mutant receptors by the endoplasmic reticulum (ER) quality control system (16). We and others have demonstrated previously that sustained exposition of ER-retained NDI-V2R mutants to cell permeable V2R antagonists, termed pharmacological chaperones (PC), could restore cell surface expression and rescue function of a subset of these mutant receptors (19-23). Although not fully understood, a PC is believed to act by binding to partially misfolded receptors, allowing them to adopt and/or restraining them in specific conformations that are compatible with the ER quality control system and forward trafficking (24, 25). PCs have been shown to improve maturation efficiency of multiple GPCRs and other classes of proteins and are thus a promising avenue to treat conformational diseases (26, 27). The therapeutic potential of PCs for patients with NDI was validated by a pilot clinical trial,

which led to a reduction in urine output and increase urine osmolality without affecting sodium, potassium, and creatinine excretion, or plasma sodium levels (28).

Studies on the ER quality control system have positioned asparagine-linked glycans (N-linked glycans) and a network of ER-resident lectins at the center of the recognition and retention processes of aberrant proteins. Asparagine glycosylation occurs co-translationally in a N-X-S/T amino acid context on most membrane proteins including all GPCRs. Glycans are bulky hydrophilic modifications that serve a variety of structural and functional roles within the cell. In the ER, N-linked glycans are the target of enzymes that continuously add and remove sugars from the core, and the resulting composition of the glycan moiety is the basis of systems that recognize the folding state of the protein (29). Central to the ER lectin network is the well known molecular chaperone calnexine (Cnx), a type I membrane protein that interacts with folding glycoproteins via lectin-oligosaccharide interactions as well as through polypeptide-based recognition of non-native conformers (30-34). Cnx has been shown to interact with many GPCRs (20, 35-39), suggesting a role for this lectin in the folding and quality control of this class of receptors. The human V2R was shown to contain one consensus N-linked glycosylation site at asparagine 22 in the N-terminal extracellular segment of the protein and although the wild-type (WT) V2R does not require N-linked glycans for proper processing (40), the interaction between Cnx and the V2R was longer for mutant forms compared to the WT receptor, suggesting a role for this molecular chaperone in the retention of NDI-causing V2R mutants (20).

The goal of the present study is thus to determine the role of N-glycosylation in the recognition, retention and pharmacological chaperoning of NDI-causing V2R mutants. For this purpose, the effect of mutating the receptor N-glycosylation site on the ER processing and cell surface targeting of W164S-, Y128S- (17) and WT-V2R was assessed. The W164S- and Y128S-V2R mutant forms were selected as they are representative of mutations leading to either mild (Y128S) or severe NDI clinical manifestations. Our results show that although the N-linked sugars are important for the interaction of the three receptor forms with calnexin, the impact on their processing and

response to the PC was mutations-specific. Our data show that, as is the case for the WT-V2R, N-glycosylation and calnexin binding does not play an essential role for the maturation or retention of Y128S by the quality control system. In contrast, N-glycosylation was found to play an essential role in the processing of W164S-V2R and the co-translational modification was found to be essential for the action of the PC on this highly compromised receptor mutant form. Our findings also indicate that although PC can modify the time of interaction between WT- and Y128S-V2R and calnexin, the influence of the compound on the cell surface targeting of the mutant receptor must involve another site of action in the quality control sequence of events.

Materials and Methods

Materials:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and phosphate-buffered saline (PBS) were all from Wisent (Qc, Canada). Cell culture plates and dishes were obtained from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Bovine serum albumine (BSA), poly-D-lysine, arginine-8 vasopressin (AVP), DDM (n-dodecyl-beta-D-maltoside), 2-mercaptoethanol, and PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) were purchased from Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO). Digitonin and Cycloheximide were obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). SR121463 was a generous gift from Sanofi-Aventis (Toulouse, France). The antibodies used were purchased from the following companies: rabbit anti-calnexin antibody was from Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA), HRP-conjugated rabbit anti-myc was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA), and HRP-coupled anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK). The mouse anti-myc antibody (9E10 clone) was produced by our core facility as ascite fluids. Sepharose-conjugated protein G was obtained from (GE Healthcare). EndoH and PNGase enzymes were obtained from Roche (Laval, Qc). The DeepBlueC coelenterazine and white Optiplate were from Perkin Elmer Life-Sciences (Waltham, MA) while Coelenterazine-*h* was from Prolume (Pinetop, AZ). The plate reader used to measure BRET was a Mithras LB940 from Berthold (Bad Wildbad, Germany). Absorbance readings at 405 nm in 96-well plates were done in a OASYS UVM340 microplate reader (Montreal Biotech inc. Montreal, Canada).

Cell Culture and Transfections

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM; Wisent) supplemented with 10% foetal bovine serum (Wisent) in a 37°C humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere. Transfections were performed with Fugene6 following the manufacturer's indications.

DNA constructs

The myc-tagged WT-V2R (19) and the WT-V2R-*Renilla*-luciferase (WT-V2R-*Rluc*) were already described elsewhere (21). The different V2R mutations were generated on these vectors by site-directed mutagenesis with the *Quick Change*TM mutation kit (Agilent Technologies, Santa-Clara, USA) using the manufacturer's protocol. The coding sequence of Calnexin (human transcript variant 1) was subcloned from pCMV6-XL5 and inserted in-frame in 5' of the Venus (YFP) fluorescent protein in the pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) protein-based bioluminescence resonance energy transfer (BRET) biosensor (EPAC-BRET²) was also already described (41). All DNA constructs and mutations were confirmed by direct sequencing.

Co-immunoprecipitation and Western blotting

For whole cell immunoprecipitations, the cells were lysed in immunoprecipitation buffer (25 mM Tris pH7.4, 10 mM CaCl₂, 0.5% Digitonin and 1 mM PMSF) and centrifuged for 30 min at 145 000 g to get rid of insoluble material. Ascite mouse anti-myc (2.5 μL) or rabbit anti-calnexin antibody (1 μg) was then added to the clarified lysate with protein-G-conjugated sepharose beads for 16 hours at 4°C. After washing the beads with immunoprecipitation buffer (3 washes), the immunopurified receptors or calnexin were subsequently resolved on a 10% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Perkin Elmer). Immunoblotting of the receptors or calnexin were performed using the HRP-conjugated anti-myc antibody or a rabbit anti-calnexin followed by incubation with a HRP-coupled goat anti-rabbit secondary antibody, respectively. Immune complexes were visualized by chemiluminescence using the Western LightningTM chemiluminescence substrate (Perkin Elmer, MA) using the LAS-3000 Imaging System (Fuji, Japan).

Cell surface ELISA.

Cell surface receptor expression was assessed by ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) as described previously (42). Briefly, HEK293T cells were seeded in 6-well plates

(4×10^5 cells/well) and transfected with the indicated receptors constructs the next day. 24h following transfection, cells were transferred into poly-D-lysine-coated 24 well plates and treated or not with the PC SR121463. Cells were fixed the next day with Tris-buffered saline (TBS; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.4) containing 3.7% formaldehyde for 5 min at room temperature, washed with TBS and incubated with 1% BSA-containing TBS (TBS-B) for blockage. The blocking buffer was then replaced with the 9E10 mouse monoclonal anti-myc antibody diluted in TBS-B (1:1000), incubated 1 hour, and washed again before being incubated with an alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse antibody (1:1000; BIO-RAD Mississauga, Ont.) in TBS-B. After washing, cell surface expression was determined by the colorimetric reaction initiated by the addition of the *Alkaline phosphatase conjugate substrate kit* (BIO-RAD) which was stopped by adding an equivalent volume of NaOH to the wells. The intensity of the reaction was quantified by spectrophotometry using the OASYS UVM340 microplate reader (Montreal Biotech inc. Montreal, Canada) at 405 nm. Net surface expression was determined by subtracting the absorbance values obtained for the mock transfected wells.

Deglycosylation of immunoprecipitated receptors

Cells were transfected with the indicated receptor construct 48 hours prior to solubilization. For PC treated samples, addition of SR121463 was done 18 hours before the harvest. Total receptors were immuno-precipitated as described above and eluted from the protein-G-conjugated sepharose beads with 1% (w/v) SDS, 50 mM sodium phosphate, pH 7.5. Before starting the enzymatic reactions, the eluates were diluted 10-fold with 0.5% (w/v) DDM in 50 mM sodium phosphate pH 5.5, 50 mM EDTA, 1% 2-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF for Endo H, or 50 mM Na-phosphate pH 7.5, 50 mM EDTA, 1% 2-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, for PNGase F. The enzymes were added at final concentrations of 25 milliunits/ml (Endo H) or 20 units/ml (PNGase F). The enzymatic reactions were left overnight at 37°C prior to SDS-PAGE and western blotting.

cAMP production measurement

An EPAC BRET²-based biosensor was used to semi-quantitatively assess cAMP production, as described (43). Briefly, HEK-293T cells were co-transfected with the EPAC BRET²-based sensor and either WT- or mutant V2R constructs. Following a 48-h incubation at 37°C, the cells were detached and transferred into 96-well plates at a density of 8 to 10x10⁴ cells/well in PBS. When cells were treated overnight with SR121463 (10 μM), three PBS washes (5 min interval between each wash) were performed prior to cell transfer into 96-well plates. Vehicle or AVP (10 μM) was then added and followed by a 15-min incubation at 37°C. After the addition of DeepBlueC coelenterazine (final concentration, 5 μM) to each well, the plate was read into a Mithras LB940 instrument (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using the MicroWin 2000 software (Berthold Technologies). The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted at 505 to 555 nm (YFP) to the light emitted at 465 to 505 nm (Luciferase). Since BRET values decrease upon cAMP binding to EPAC, the obtained values for AVP or SR+AVP treated cells were subtracted from basal BRET (BRET obtained with cells treated with vehicle) to yield positive numbers.

Calnexin/Receptors proximity assessment by BRET

The cells were transfected in 6-well plates with the calnexin-YFP (200ng) and receptor-Rluc (20 ng) constructs, or receptor-Rluc constructs alone (to obtain basal BRET values). SR121463 (10 μM) was added to the cells and BRET was measured every hour thereafter for 7 hours. At each time point, the cells were rinsed and resuspended in PBS, transferred into a white 96-well Optiplate (1 X 10⁴ cells/well), and coelenterazine-*h* was added (5μM final). After 5 min incubation, the plate was read using the Mithras LB940 instrument and data collected by the MicroWin 2000 software. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted at 505 to 555 nm (YFP) to the light emitted at 465 to 505 nm (Luciferase). BRET values were determined using the Net BRET which is calculated by subtracting basal BRET value (Luciferase construct alone) to the BRET value obtained with both interacting partners. Relative BRET was calculated by dividing net BRET at each time point by the net BRET value obtained for untreated samples.

Cycloheximide chase of V2R/calnexin interaction

Cells were transfected in 6-well plates with the indicated receptor constructs 24 hours prior to the chase. For SR121463 treated samples, the PC (10 μM) was added 3 hours after transfection. Cycloheximide (20 μM in DMSO) was added at different time points and the cells were harvest and processed as described in the immunoprecipitation section. Densitometric quantifications of the immunoreactive bands were done using the Muligauge software (Fuji, Japan). Values are presented as a percentage of the calnexin-bound receptors obtained in the untreated wells (time 0). The data were analyzed with the GraphPad Prism software using one phase decay equation. The results are from three independent experiments.

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm S.E.M., and statistical significance of the differences were assessed by ANOVA. Pair-wise comparisons were made by post hoc Bonferroni's multiple comparison test. Differences with $P < 0.05$ were considered significant. Symbols used: * when comparing the different receptors and \square when comparing between untreated and treated samples.

Results:

Clinical outcome severity of patients carrying the W164S or Y128S mutations

Two NDI-causing V2R mutations, W164S- and Y128S-V2R, were selected for the present study. As shown in table 1, these two mutant forms of the receptor are representative of mutation at each end of the spectrum of NDI clinical manifestations. Indeed, a male patient bearing the Y128S mutation was found to have a relatively mild phenotype since maximal urine osmolality during dehydration was 321 mOsm/kg H₂O with concomitant plasma sodium of 154 mEq/L. Also, he increased his urine osmolality from 101 to 243 mOsm/kg of H₂O after a pharmacological (24 µg) intravenous dose of dDAVP (desmopressin). He was never hospitalized for dehydration episodes. Another male patient bearing the Y128S mutation (in another unrelated family) was found to have a similar mild phenotype, with urine osmolality of 314 after dehydration (plasma sodium 152 mEq/L), and urine osmolality 387 mOsm/kg H₂O post dDAVP administration. In contrast, the male patient bearing the W164S mutation has a severe phenotype, with a maximal urine osmolality during dehydration of 80.5 mOsm/kg H₂O with concomitant plasma sodium of 158mEq/L. His urine osmolality was unchanged after a dDAVP treatment: 79 mOsm/kg H₂O before administration and 72 mOsm/kg H₂O after. Overall, these physiological data illustrate well the difference in the clinical outcome severity of patients with either the Y128S or W164S mutations.

Maturation profile and surface expression of WT-, W164S- and Y128S-V2R.

To assess the maturation profile of the receptors, total cell lysates from HEK293T cells transiently expressing WT-, W164S- or Y128S-V2R that were treated or not with the PC SR121463, were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using the anti-myc antibody (9E10) that recognizes the myc epitope present at the N-terminus of each construct (Fig 1A). The presence and the nature of oligosaccharide chains were assessed by treatment with Endoglycosidase H (endoH) and Peptide: N-Glycosidase F

(PNGaseF). For the WT and the two mutant receptors, a doublet at 37 and 40 kDa was observed (Fig 1A, bands A & B). The 37 kDa band corresponds to the unglycosylated species, as it migrates at the predicted molecular weight of the receptor. Since addition of N-linked glycans is a co-translational process, the presence of such specie results from the accumulation of deglycosylated receptors targeted for degradation after unproductive folding attempts (44). The 40 kDa entity (band B) represents the ER-core glycosylated receptor, as determined by its sensitivity to endoH treatment (Fig. 1B). An additional diffuse band, spanning 45 to 55 kDa (Fig 1A, band C) is observed. EndoH treatment had no effect on the mobility of these bands while PNGaseF treatment reduces its apparent molecular weight to approximately 43 kDa (figure 1B, lanes 2 & 3), indicating that the 45-55 kDa bands corresponds to the fully glycosylated, mature receptors harbouring complex sugars. PNGaseF treatment did not yield the 37 kDa species corresponding to the deglycosylated receptor but rather a 43 kDa species representing the O-glycosylated form, as previously reported (40), indicative of a transit of the receptor through the Golgi apparatus where O-glycosylation occurs. The intensity of the 45-55 kDa mature form was dramatically reduced for both W164S- and Y128S-V2R as compared to the WT receptor, consistent with the impaired maturation previously reported for those NDI-causing mutant receptors. Using the densitometric ratio of mature/immature forms as an estimate (band C over band A + band B), the maturation efficiency of W164S- and Y128S-V2R was found to be 21 and 29% of the WT respectively (Fig 1a inset). Upon treatment with SR121463, a 1.74- and 2.24-fold increase in the mature/immature ratio was observed for W164S- and Y128S-V2R respectively, indicating that their maturation and processing was promoted by the PC (Fig. 1a and inset). A small increase of the WT mature forms was also observed but did not reach statistical significance. The higher molecular weight species (bands D & E) observed for all receptors represent SDS-resistant oligomeric forms, as regularly reported for GPCRs.

Whole cell ELISAs were performed to assess relative surface expression of the different receptors. As seen in Figure 1C, the two mutant receptors have a significantly compromised cell surface expression (~16 and ~28% of the WT for the W164S- and Y128S-V2R, respectively), consistent with the altered maturation observed. SR121463

treatment led to a significant increase of cell surface expression for both receptor mutants reaching ~67.5 and 89.5% of the untreated WT level for W164S- and Y128S-V2R respectively. In contrast, the PC treatment did not significantly affect the cell surface expression of WT-V2R.

Analysis of N-linked glycosylation mutants

Sadeghi and Birnbaumer (40) have shown that mutagenesis of asparagine 22 to glutamine abolishes N-linked glycosylation of the V2 receptor (N22Q-V2R) without altering its function or expression level. However, the role of this N-glycan on the maturation and PC-mediated rescue of NDI-causing V2R mutants has never been assessed. We thus generated N22Q versions for the three V2R variants and looked at their maturation profile, cell surface expression, and rescue by a PC. Mutating the unique N-glycosylation site in the WT-V2R (WT-N22Q) led to the disappearance of the ~45-55 kDa leaving the ~43 kDa band (Fig 2A) corresponding to the O-glycosylated form of the receptor as observed after PNGase F digestion of the WT receptor (Fig. 1B) and the non-glycosylated ~37 kDa species. For Y128S/N22Q-V2R, the 37 kDa band was the main receptor species observed and only a faint 43 kDa band was observed, indicating that the absence of the N-linked sugar did not favor the release of the receptor from the ER and its further processing through the Golgi apparatus. A similar finding was obtained for the N-glycosylation deficient mutant W164S-V2R (W164S/N22Q). However, W164S/N22Q-V2R did not yield any 37 kDa product but rather a ~33 kDa species that accumulated heavily in the cell, (only 1/5 of the lysate was loaded on gel to yield comparable immunoreactivity). This increased mobility of the W164S/N22Q-V2R may be due to cleavage of its C-terminus (immune detection being dependent on an intact N-terminus) or to an early interruption of the elongation process. In any case, the intracellular accumulation and the reduced molecular weight of the W164S/N22Q-V2R suggest that in contrast to what was observed for Y128S-V2R, N-linked glycans plays a critical role in its processing of W164S-V2R since its removal resulted in impaired processing.

As was the case for the glycosylated V2R mutant forms, SR121463 treatment facilitated the maturation of Y128S/N22Q-V2R, as indicated by the net increase in the mature, 43 kDa species (Fig 3) and the rescue of its cell surface expression (Fig 2B) and signaling activity (Fig 2C), indicating that the N-glycan is not required for the pharmacochaperoning of Y128S-V2R. In sharp contrast, the W164S/N22Q-V2R did not respond to the PC, as its migration pattern was not altered by the treatment (Fig 3). This also contrasts with the significant maturation rescue of its glycosylated counterpart, W164S-V2R, by SR121463 (Fig 1A) demonstrating that the absence of N-linked sugar renders W164S-V2R irresponsive to the PC. Consistent with the lack of SR121463-promoted maturation of W164S/N22Q-V2R, neither its cell surface targeting (Fig 2B) nor its signaling activity (Fig 2C) were rescued by the PC. Taken together these data unravel a mutation-specific role of N-glycosylation on the processing of misfolded V2R and their ability to be rescued by PCs.

Calnexin interaction with the different V2Rs

Given the importance of N-glycan for the interaction of folding proteins with the molecular chaperone calnexin (Cnx), we then assessed the interaction between the receptors and this ER-resident protein. Receptors from HEK293T cells transiently expressing the different V2R constructs were immunoprecipitated and the amount of associated Cnx was visualized by Western blotting. As shown in figure 3, the N-glycan bearing WT and mutant forms of V2R interacted with Cnx. The mutation of the glycosylation site (N22Q) almost completely prevented the co-immunoprecipitation of Cnx with the three receptor forms, confirming that sugars are important for receptor-Cnx interaction, as often reported for other proteins. Interestingly, the amount receptor-bound Cnx was similar between receptors suggesting that, at steady state, a similar fraction of mutant and WT receptors are in association with Cnx. Moreover, treating the cells with the PC did not affect the steady-state of Cnx/V2R interaction for any of the three receptor forms. Given the previous observations that the proportion of core-glycosylated form of the receptor (expected to interact with Cnx) is greater for the mutants than the WT receptor (see Fig. 1A) and that the PC treatment reduced the amount of ER-retained

mutant receptors, these results suggest that, at these expression levels, the amount of ER-resident receptors may saturate the capacity of Cnx to process nascent receptors. No interaction was detected between any of the receptor forms and calreticulin, the soluble homolog of Cnx also known to bind N-glycosylated proteins in the ER (data not shown).

Although no change in the steady-state amount of receptor-bound CNX was observed between WT and mutant receptor forms, or upon PC treatment, the kinetic of this interaction could be affected. To test this possibility, the amount of Cnx-bound receptors was monitored by co-immunoprecipitation at different time point after the addition of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) to assess the dissociation kinetics. Cnx-bound receptors were then probed by Western blotting (Fig 4A & B). The results show that Cnx interacts principally with the core glycosylated (40 kDa) form of the receptors, which is consistent with the fact that N-glycans are important for this interaction. For the Y128S-V2R, the half-life of the interaction with Cnx was found to be equal to that of the WT-V2R (40 ± 7.8 and 41 ± 4.8 min respectively). The fact that Y128S-V2R has the same time of interaction with Cnx than the WT-V2R while being retained in the ER suggests that Cnx does not participate in the retention of this particular mutant, implying that other components, downstream of Cnx, are preventing the anterograde transport of Y128S-V2R. For W164S-V2R, the interaction with Cnx was found to be significantly longer than for the two other receptors with a half-time of dissociation of 60 ± 7.2 min, suggesting that Cnx interaction may contribute to the ER-retention of this mutant. These results thus suggest that the mechanisms involved in the recognition and processing of ER-retained mutants are mutation-specific. Upon SR121463 treatment, the dissociation time with Cnx was similarly reduced for both WT- and Y128S-V2R (22.2 ± 3 and 20.4 ± 1.8 min, respectively). The fact that the interaction time of Y128S-V2R with Cnx is indissociable from that of the WT receptor upon a PC treatment while its maturation is promoted by the treatment suggest that the PC may affect other retention mechanisms downstream of Cnx. Interestingly, the PC treatment did not significantly affect the length of Cnx interaction with the W164S-V2R confirming again a difference in the retention mechanism of the two receptor mutants. To validate these results, we took advantage of a BRET-based assay monitoring the proximity of receptors to Cnx. Coherent with the results presented in Figure 4A & B, the BRET decay

in the presence of the PC was faster for Y128S- than for W164S-V2R (Fig. 4C), supporting the notion that that dissociation from Cnx is accelerated for Y128S but not W164S-V2R. Combining the fact that the PC treatment induced a significant rescue of the W164S-V2R's maturation and cell surface expression (Fig 1A & 1C) with the fact that the treatment did not affect the length of the prolonged receptor-Cnx interaction allows to suggest that at least two control points are contributing to the intracellular retention of this mutant and that the beneficial PC action on the maturation efficiency of W164S-V2R occurs downstream of Cnx. Taken together our results suggest that Y128S-V2R is retained after Cnx interaction while W164S-V2R is retained both during Cnx interaction and downstream of this interaction. These differences may explain the variable susceptibility of the two mutants to N-sugar removal and their efficiency of rescue by a PC treatment.

Discussion

Although there is a growing list of diseases associated with GPCR misfolding, the mechanisms involved in their maturation, and in the recognition and retention of misfolded mutant receptors are still poorly understood. The emergence of a new class of therapeutics, which are known to promote the maturation of specific ER-retained misfolded proteins, justifies a better understanding of their mode of action. Since the discovery of pharmaco-chaperoning, the V2R has been a model of choice and was intensively studied. Indeed, the folding and processing of V2R are highly sensitive to genetic alterations as indicated by the identification of more than 200 distinct mutations affecting receptor function and leading to NDI (18), most of them as a result of misprocessing (45). From what is known, pharmaco-chaperoning is restricted to a subset of mutations and its efficacy (efficiency of cell surface expression recovery) is mutation-specific (19, 23, 46). These data suggest that the intracellular retention of different mutations may involve distinct quality control mechanism. Consistent with this notion, some NDI-causing V2R mutations were found to be retained in the ER while others were

found to progress to the ERGIC compartment before being retro-translocated to the ER (47). In order to investigate further how distinct mutations could be differentially recognized by the quality control system, we took advantage of two NDI-causing V2R mutations leading to different severity of the disease.

We found that the receptor harbouring a mutation leading to a severe NDI phenotype (W164S) was less efficiently targeted to the cell surface than the Y128S-V2R which is linked to a mild clinical outcome. This difference in cell-surface targeting was reflected in the cAMP accumulation promoted by AVP stimulation in cells expressing these receptors. Also, whereas the PC treatment only partially restored the cell surface expression and signalling of W164S, it promoted the cell surface targeting and signalling of Y128S-V2R to levels similar to that of the WT-V2R. Taken together, these data demonstrate a difference in the capacity of the cells to fold and process the two mutants. The difference in the extent of cell surface targeting and PC responsiveness between the two mutants is not solely a quantitative gradation but most likely results from an intrinsic difference of their handling by the quality control system. Indeed, whereas mutation of the unique V2R N-glycosylation site did not affect the level of Y128S-V2R maturation and cell surface expression it completely abrogated the maturation and membrane targeting of the W164S-V2R. In addition, the lack-of N-linked glycans for W164S-V2R yielded a single receptor species that was shorter than the unglycosylated form observed for either Y128S- or WT V2R (33 kDa vs 37 kDa). This truncated receptor species that accumulates intracellularly to very high levels may represent either a degradation intermediate that is generated by proteolysis or by the premature interruption of the polypeptide elongation during translation. In any case, these data illustrate a major difference in the role of the N-linked sugars on the processing of the two NDI mutant studied herein. Whereas for Y128S-V2R, the presence or absence of N-glycosylation does not affect the receptor processing, the occurrence of this co-translational modification is essential for the normal processing and, seemingly, the degradation of the W164S-V2R. This dependence on the presence of N-linked sugars may indicate a role for lectin chaperones in the handling of W164S-V2R. Alternatively, since it has been shown that addition of large polar carbohydrates core have a role in promoting and

stabilizing local structures (48), the presence of N-glycans could directly affect the biophysical properties of the nascent polypeptide chain thus favouring the processing of W164S-V2R toward the degradation pathway.

In most cases reported, Cnx binding to nascent folding proteins was shown to involve the presence of N-linked sugars. However, Lanctot *et al.* (39) showed that the N-glycosylation-deficient mutant AT1 receptor, which normally has two N-glycosylation sites, could still interact with Cnx. In addition, the human LH receptor (with 6 putative N-glycosylation sites) was found to interact with Cnx in the presence of the glucosidase inhibitor castanospermin (49), highlighting the possibility of a protein-based interaction of the chaperone with some GPCRs. In contrast with these studies, we show here that N-glycans play a central role for the binding of V2R to Cnx. Indeed, removal of the N-glycosylation site essentially abolished the co-immunoprecipitation of the WT, and mutant forms of V2R with Cnx. When considering the kinetics of interaction with Cnx for the different receptor forms considered, W164S-V2R was found to have a significantly prolonged interaction time when compared with WT-V2R, suggesting that the interaction with the lectin chaperone contributed to the retention of the mutant receptor. This is consistent with a previous study demonstrating that another NDI-causing V2R mutant (R337X), also showed a longer interaction time with Cnx (20) indicating that at least in some cases, the Cnx complex is able to discriminate between native and defective conformations. In contrast, Y128S-V2R was found to have the same interaction time with Cnx than the WT receptor suggesting that this mutant form was not retained through its interaction with Cnx, implying the existence of another control point in the quality control system. This is consistent with the observation that mutation of the glycosylation site, which is essential for Cnx interaction, did not promote cell surface targeting of Y128S. This also suggests that the mechanism involved in the retention of Y128S-V2R is lectin-independent. Our results also confirm the previous finding that N-glycan are not essential for the normal maturation and cell surface targeting of the WT-V2R since the N22Q mutation did not affect its cell surface expression and signalling.

As previously found for many NDI-causing V2R mutations (19, 22, 50), treatment with PC rescued the cell surface and signaling capacity of both Y128S- and W164S-V2R. Consistent with the distinct effects of N-glycosylation site removal on the processing of

Y128S- and W164S-V2R, the N22Q mutation led to dramatically different consequences on the responsiveness of the two receptors to PC. Indeed, whereas the unglycosylated Y128S-V2R responded to the PC treatment as well as its glycosylated form, the lack of glycosylation on W164S-V2R completely abolished the ability of the PC to rescue its maturation and cell surface targeting. The difference between the two mutants could also be appreciated when considering the effect of the PC on the kinetics of interaction between the receptors and Cnx. For both WT- and Y128S-V2R, PC treatment accelerated their dissociation from Cnx. Similar effects were previously reported for mutant forms of the V1b receptor (51) and hERG channel (52). This effect however, is probably not responsible for the rescue of the Y128S-V2R by the PC since the decrease was of similar magnitude for both WT- and Y128S-V2R. Furthermore, and as previously discussed, preventing Cnx interaction by mutating the N-glycosylation site did not prevent intracellular retention nor PC-mediated rescue of this particular mutant. This suggests again the existence of another quality control point that may represent the export limiting step overcome by the binding of PC to the mutant receptor. Interestingly, despite the suspected role of Cnx in the retention of W164S-V2R that is suggested by its prolonged interaction with the lectin-chaperone, the PC treatment did not affect this interaction time. This suggests that, similarly to what was concluded for Y128S-V2R the rescue action of the PC does not occur at the receptor-Cnx interaction step. The mechanism involved in the intracellular retention of the mutants downstream of Cnx is still unknown, but it could be the similar for the two mutants studied herein. Nevertheless, the different PC effect on the interaction time between the two mutants and Cnx reflect a differential handling of the two mutants by the ER quality control system. Moreover, N-glycans were shown essential for the folding, degradation and PC-mediated rescue of the W164S mutant while being dispensable in all these processes for Y128S, stressing again the intrinsic difference between the mutant receptors. Our results also indicate that the pharmacological chaperoning can occur either before or during Cnx interaction for some mutant, and after this interaction for others, suggesting that the 'prise en charge' of mutant V2R by the secretory pathway could be mutant specific. Although we cannot conclude on the precise molecular determinants leading to the distinct handling of W164S- and Y128S-V2R by the quality control system, our study highlight

that this system does not rely on a binary process simply distinguishing between properly folded and misfolded proteins but rather depends on an elaborate process that involves distinct mechanisms depending on the nature of the conformational defects promoted by a given mutation.

References

1. Tan, C. M., Brady, A. E., Nickols, H. H., Wang, Q., and Limbird, L. E. (2004) Membrane trafficking of G protein-coupled receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 559-609.
2. Sung, C. H., Davenport, C. M., Hennessey, J. C., Maumenee, I. H., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. R., Nowakowski, R., Fishman, G., Gouras, P., and Nathans, J. (1991) Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6481-6485.
3. Bradbury, F. A., Kawate, N., Foster, C. M., and Menon, K. M. (1997) Post-translational processing in the Golgi plays a critical role in the trafficking of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor to the cell surface, *J Biol Chem* 272, 5921-5926.
4. Birnbaumer, M., Gilbert, S., and Rosenthal, W. (1994) An extracellular congenital nephrogenic diabetes insipidus mutation of the vasopressin receptor reduces cell surface expression, affinity for ligand, and coupling to the Gs/adenylyl cyclase system, *Mol Endocrinol* 8, 886-894.
5. Janovick, J. A., Maya-Nunez, G., and Conn, P. M. (2002) Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target, *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3255-3262.
6. Gromoll, J., Schulz, A., Borta, H., Gudermann, T., Teerds, K. J., Greschniok, A., Nieschlag, E., and Seif, F. J. (2002) Homozygous mutation within the conserved Ala-Phe-Asn-Glu-Thr motif of exon 7 of the LH receptor causes male pseudohermaphroditism, *Eur J Endocrinol* 147, 597-608.
7. Rannikko, A., Pakarinen, P., Manna, P. R., Beau, I., Misrahi, M., Aittomaki, K., and Huhtaniemi, I. (2002) Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation, *Mol Hum Reprod* 8, 311-317.
8. Biebermann, H., Schoneberg, T., Krude, H., Schultz, G., Gudermann, T., and Gruters, A. (1997) Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism, *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3471-3480.
9. D'Souza-Li, L., Yang, B., Canaff, L., Bai, M., Hanley, D. A., Bastepe, M., Salisbury, S. R., Brown, E. M., Cole, D. E., and Hendy, G. N. (2002) Identification and functional characterization of novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia, *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1309-1318.
10. Valverde, P., Healy, E., Sikkink, S., Haldane, F., Thody, A. J., Carothers, A., Jackson, I. J., and Rees, J. L. (1996) The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma, *Hum Mol Genet* 5, 1663-1666.
11. Ho, G., and MacKenzie, R. G. (1999) Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity, *J Biol Chem* 274, 35816-35822.

12. Tanaka, H., Moroi, K., Iwai, J., Takahashi, H., Ohnuma, N., Hori, S., Takimoto, M., Nishiyama, M., Masaki, T., Yanagisawa, M., Sekiya, S., and Kimura, S. (1998) Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization, *J Biol Chem* 273, 11378-11383.
13. Fuchs, S., Amiel, J., Claudel, S., Lyonnet, S., Corvol, P., and Pinet, F. (2001) Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease: evidence for selective loss of Gi coupling, *Mol Med* 7, 115-124.
14. Vassart, G., and Costagliola, S. (2011) G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases, *Nat Rev Endocrinol* 7, 362-372.
15. Fujiwara, T. M., Morgan, K., and Bichet, D. G. (1995) Molecular biology of diabetes insipidus, *Annu Rev Med* 46, 331-343.
16. Conn, P. M., Ulloa-Aguirre, A., Ito, J., and Janovick, J. A. (2007) G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo, *Pharmacol Rev* 59, 225-250.
17. Bichet, D. G. (2008) Vasopressin receptor mutations in nephrogenic diabetes insipidus, *Semin Nephrol* 28, 245-251.
18. Spanakis, E., Milord, E., and Gragnoli, C. (2008) AVPR2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: review and missense mutation significance, *J Cell Physiol* 217, 605-617.
19. Morello, J. P., Salahpour, A., Laperriere, A., Bernier, V., Arthus, M. F., Lonergan, M., Petaja-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants, *J Clin Invest* 105, 887-895.
20. Morello, J. P., Salahpour, A., Petaja-Repo, U. E., Laperriere, A., Lonergan, M., Arthus, M. F., Nabi, I. R., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2001) Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus, *Biochemistry* 40, 6766-6775.
21. Bernier, V., Lagace, M., Lonergan, M., Arthus, M. F., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059, *Mol Endocrinol* 18, 2074-2084.
22. Wuller, S., Wiesner, B., Loffler, A., Furkert, J., Krause, G., Hermosilla, R., Schaefer, M., Schulein, R., Rosenthal, W., and Oksche, A. (2004) Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors, *J Biol Chem* 279, 47254-47263.
23. Robben, J. H., Sze, M., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2007) Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus, *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F253-260.
24. Bernier, V., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors, *Curr Opin Pharmacol* 4, 528-533.

25. Morello, J. P., Petaja-Repo, U. E., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding, *Trends Pharmacol Sci* 21, 466-469.
26. Bernier, V., Lagace, M., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases, *Trends Endocrinol Metab* 15, 222-228.
27. Rajan, R. S., Tsumoto, K., Tokunaga, M., Tokunaga, H., Kita, Y., and Arakawa, T. (2011) Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases, *Curr Med Chem* 18, 1-15.
28. Bernier, V., Morello, J. P., Zarruk, A., Debrand, N., Salahpour, A., Lonergan, M., Arthus, M. F., Laperriere, A., Brouard, R., Bouvier, M., and Bichet, D. G. (2006) Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol* 17, 232-243.
29. Shimizu, Y., and Hendershot, L. M. (2007) Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum, *Adv Exp Med Biol* 594, 37-46.
30. Ware, F. E., Vassilakos, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., Lehrman, M. A., and Williams, D. B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins, *J Biol Chem* 270, 4697-4704.
31. Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 913-917.
32. Hebert, D. N., Foellmer, B., and Helenius, A. (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum, *Cell* 81, 425-433.
33. Ihara, Y., Cohen-Doyle, M. F., Saito, Y., and Williams, D. B. (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro, *Mol Cell* 4, 331-341.
34. Brockmeier, A., Brockmeier, U., and Williams, D. B. (2009) Distinct contributions of the lectin and arm domains of calnexin to its molecular chaperone function, *J Biol Chem* 284, 3433-3444.
35. Rozell, T. G., Davis, D. P., Chai, Y., and Segaloff, D. L. (1998) Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin, *Endocrinology* 139, 1588-1593.
36. Butz, J. A., Niebauer, R. T., and Robinson, A. S. (2003) Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast, *Biotechnol Bioeng* 84, 292-304.
37. Lu, M., Echeverri, F., and Moyer, B. D. (2003) Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors, *Traffic* 4, 416-433.
38. Ge, X., Loh, H. H., and Law, P. Y. (2009) mu-Opioid receptor cell surface expression is regulated by its direct interaction with Ribophorin I, *Mol Pharmacol* 75, 1307-1316.

39. Lanctot, P. M., Leclerc, P. C., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2006) Role of N-glycan-dependent quality control in the cell-surface expression of the AT1 receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 340, 395-402.
40. Sadeghi, H., and Birnbaumer, M. (1999) O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor, *Glycobiology* 9, 731-737.
41. Breton, B., Sauvageau, E., Zhou, J., Bonin, H., Le Gouill, C., and Bouvier, M. (2010) Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer, *Biophys J* 99, 4037-4046.
42. Hamdan, F. F., Rochdi, M. D., Breton, B., Fessart, D., Michaud, D. E., Charest, P. G., Laporte, S. A., and Bouvier, M. (2007) Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2, *J Biol Chem* 282, 29089-29100.
43. Barak, L. S., Salahpour, A., Zhang, X., Masri, B., Sotnikova, T. D., Ramsey, A. J., Violin, J. D., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., and Gainetdinov, R. R. (2008) Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor, *Mol Pharmacol* 74, 585-594.
44. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P., and Bouvier, M. (2000) Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor, *J Biol Chem* 275, 13727-13736.
45. Morello, J. P., and Bichet, D. G. (2001) Nephrogenic diabetes insipidus, *Annu Rev Physiol* 63, 607-630.
46. Rene, P., Le Gouill, C., Pogozeva, I. D., Lee, G., Mosberg, H. I., Farooqi, I. S., Valenzano, K. J., and Bouvier, M. (2010) Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity, *J Pharmacol Exp Ther* 335, 520-532.
47. Hermosilla, R., Oueslati, M., Donalies, U., Schonenberger, E., Krause, E., Oksche, A., Rosenthal, W., and Schulein, R. (2004) Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway, *Traffic* 5, 993-1005.
48. Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., and Wormald, M. R. (2004) Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding, *Glycobiology* 14, 103-114.
49. Mizrachi, D., and Segaloff, D. L. (2004) Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors, *Mol Endocrinol* 18, 1768-1777.
50. Robben, J. H., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2004) Regulation of the vasopressin V2 receptor by vasopressin in polarized renal collecting duct cells, *Mol Biol Cell* 15, 5693-5699.
51. Robert, J., Auzan, C., Ventura, M. A., and Clauser, E. (2005) Mechanisms of cell-surface rerouting of an endoplasmic reticulum-retained mutant of the vasopressin V1b/V3 receptor by a pharmacological chaperone, *J Biol Chem* 280, 42198-42206.

52. Gong, Q., Jones, M. A., and Zhou, Z. (2006) Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome, *J Biol Chem* 281, 4069-4074.

Table 1: Pertinent clinical data of patients with NDI bearing the W164S or Y128S mutations subjected to dDAVP or water deprivation challenge tests. For Y128S, data for two patients are shown (1 and 2)

| Mutation: | Urine osmolality (mOsm/kg H₂O) | | Response to Dehydration | |
|------------------|--|---------------------------------------|------------------------------------|---|
| | Before dDAVP administration | After dDAVP administration | Plasma sodium (mEq/L) | Urine (mOsm/kg H₂O) |
| W164S | 79 | 72 | 158 | 80.5 |
| Y128S (1) | 101 | 243 | 154 | 321 |
| Y128S (2) | n.a. | 387 | 152 | 314 |

Figure legends

Figure 1: *Maturation profile and surface expression of WT- and mutant V2R.*

Total extracts (75 μ g) of HEK293 cell transiently expressing for 48 hours the myc tagged WT-, W164S-, Y128S-V2R or transfected with an empty vector (Mock), treated or not for 18 hours with SR121463 (10 μ M) were subject to SDS-PAGE and Western blotting before **(A)** and after **(B)** endoglycosidases digestion using the HRP-coupled goat anti-myc antibody. In **(A)**, the A band represent the unglycosylated form of the receptor, the B band is the core glycosylated immature form, and band C correspond to the fully glycosylated, mature receptor. Band D & E are oligomers of the core glycosylated and fully mature forms of the receptors, respectively. A densitometric analysis of mature over immature forms of the receptors is found in the graphic shown in inset For **(B)**, the cells were all treated with SR121463 18 hours prior to solubilization. Surface receptor expression levels were determined with and without SR121463 treatment (18 hours) by ELISA **(C)** All experiments were performed three times. The ELISA data are expressed as means \pm SEM (n = 3).

Figure 2: *Maturation profile and surface expression of N-linked glycan deficient mutants V2R.*

(A) Total extract of transiently transfected HEK293 cells with either: N22Q-V2R, N22Q/W164S-V2R, N22Q/Y128S-V2R constructs or an empty vector (mock) were subject to SDS-PAGE and Western blotting using the HRP-coupled goat anti-myc antibody. **(B)** The relative surface expression level of the different constructs, treated or not with SR121463 (10 μ M, 18 hours), was determined by surface ELISA, as described in the methods section. The blots shown are representative of at least three experiments. The ELISA data are expressed as means \pm SEM (n = 3).

Figure 3: *Functional assessment of the different V2R mutants.*

Relative AVP-induced cAMP production was determined using a BRET-based EPAC biosensor co-transfected with the indicated constructs. 24 hours after transfection, the cells treated or not with 10 μ M SR121463 for 18 hours were exposed or not to 10 μ M AVP for 15 minutes prior to reading. The BRET values obtained for the different conditions were subtracted from the BRET value obtained from cells transfected only with the biosensor to yield net BRET. Shown values are the difference in net BRET values obtained for each receptor after stimulation from the net BRET observed for the same cells under unstimulated condition (basal net BRET) to yield delta BRET. The data are expressed as means \pm SEM (n=3).

Figure 4: *Calnexin interaction with WT- and mutant V2R.*

(A) Total receptors from 48 hr transiently transfected HEK293T cells with the indicated constructs, treated or not for 18 hours with SR121463 (10 μ M), were immunoprecipitated using the myc (9E10) mouse anti-myc antibody, resolved on SDS-PAGE and probed by Western blotting using the HRP-coupled goat anti-myc (top panel) or with the rabbit anti-calnexin antibody (lower panel). The blots are representative of three independent experiments

Figure 5: *Cycloheximide chase of V2R/calnexin interaction.*

(A) HEK293 cells transiently expressing the WT-, W164S-, or Y128S-V2R for 24 hrs, treated or not with SR121463 (10 μ M, 18 hr) were exposed to the protein synthesis inhibitor cycloheximide for 0 to 3 hours before lysis and immunoprecipitation using the rabbit anti-calnexin antibody. The immunoprecipitates were resolved on SDS-PAGE and probed, by Western blotting using the HRP-coupled goat anti-myc to reveal calnexin-bound receptors. The immunoreactive bands were quantified by densitometry. Values are presented as a percentage of the calnexin-bound receptors obtained in the untreated wells (time 0). (B) The data were analyzed with the GraphPad Prism software using one phase decay equation to determine calnexin/receptor interaction half-life. (C) Cells were transfected with the Cnx-luc construct along with the indicated YFP-fused receptor construct and treated for the indicated time with SR121463 (10 μ M) prior to BRET measurements. The results are from three independent experiments.

Figure 1

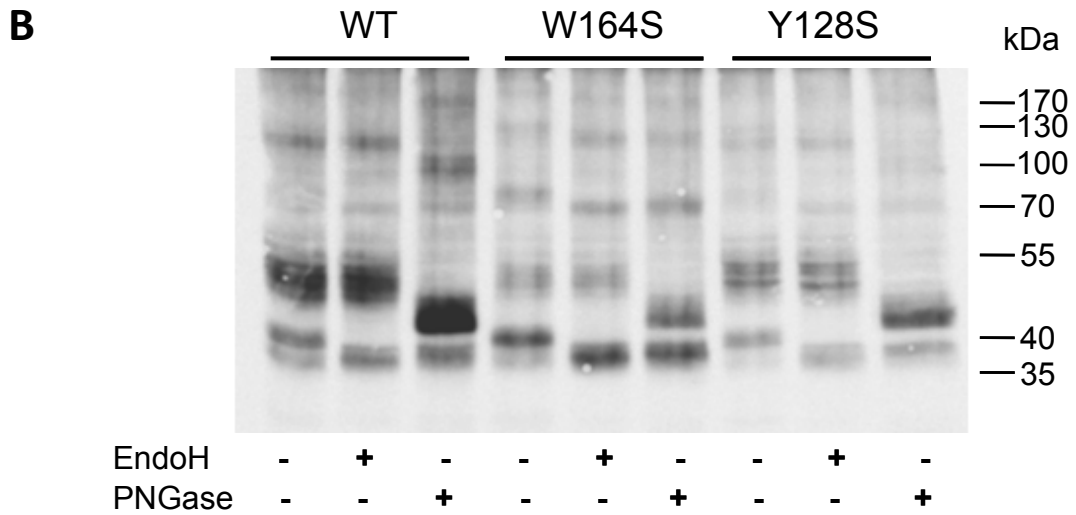
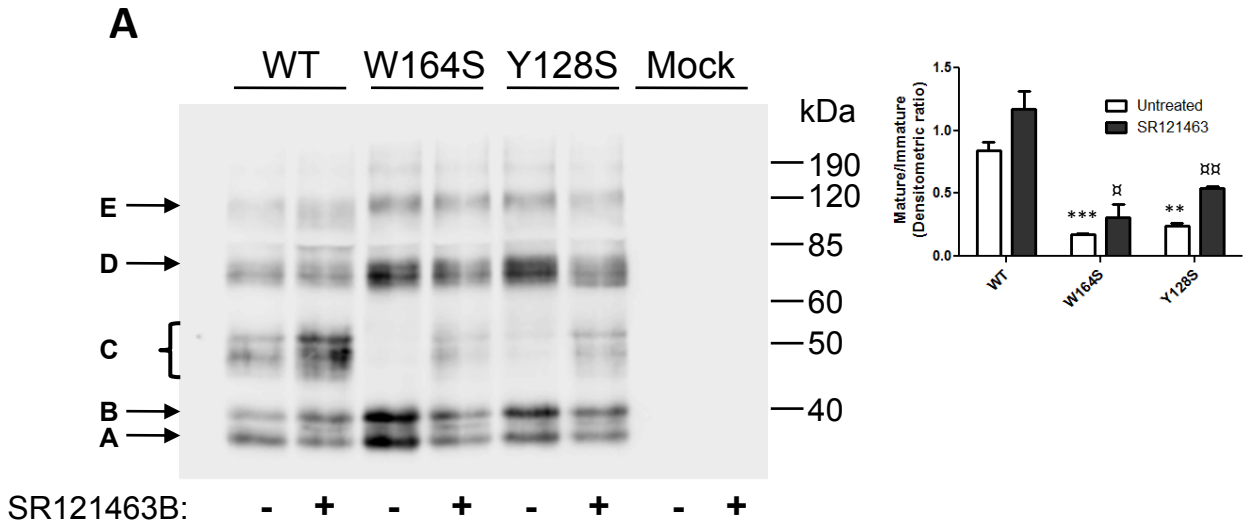


Figure 1

C

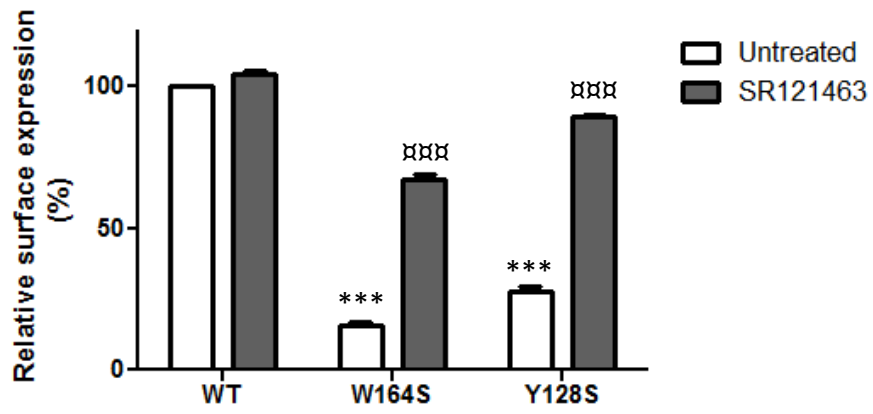
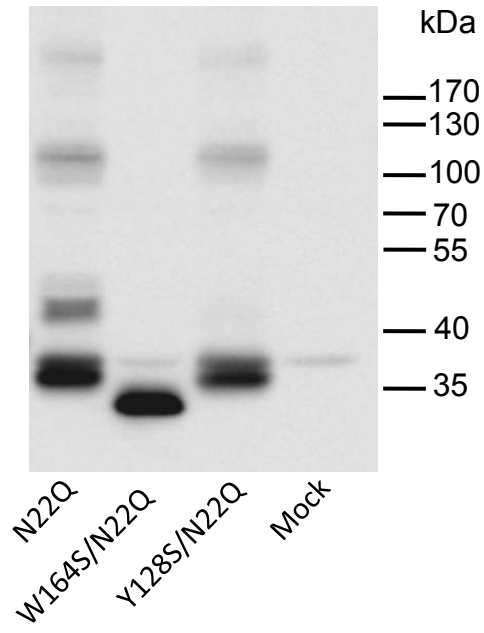


Figure 2

A



B

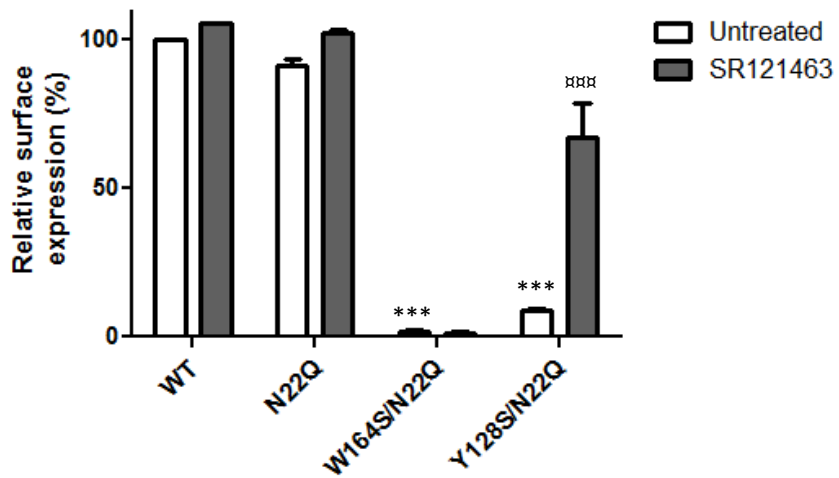


Figure 2

C

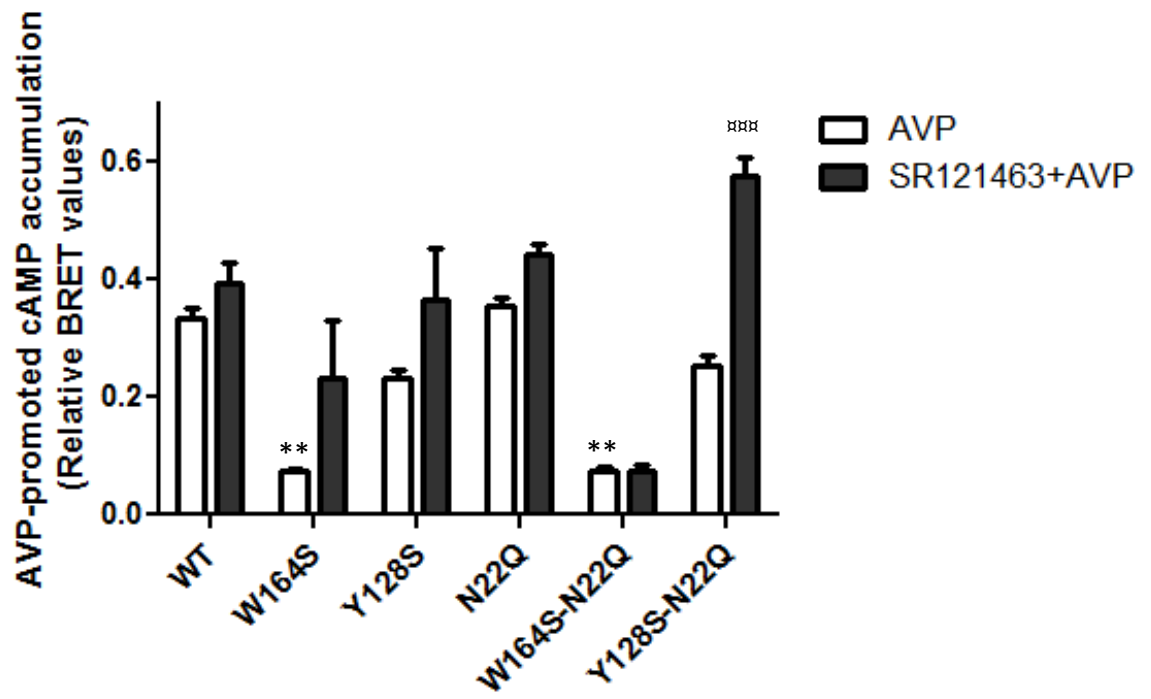


Figure 3

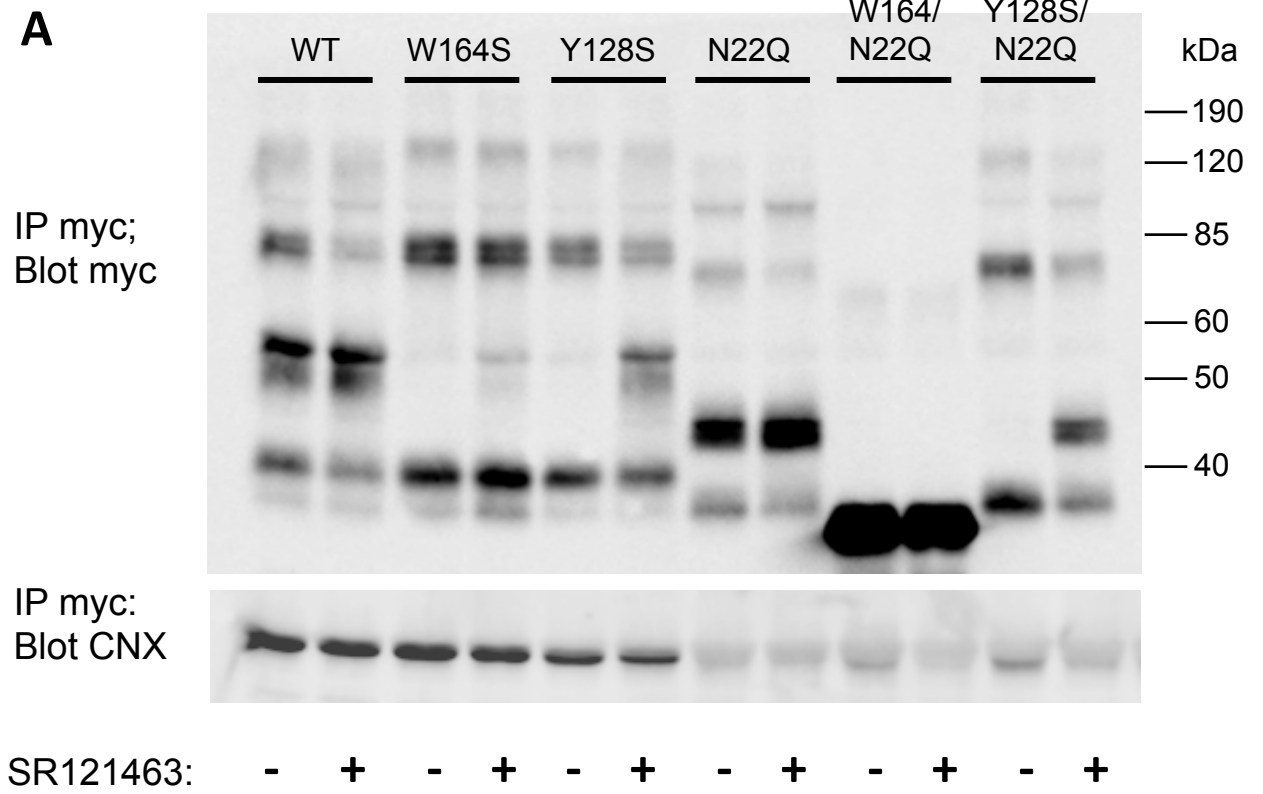
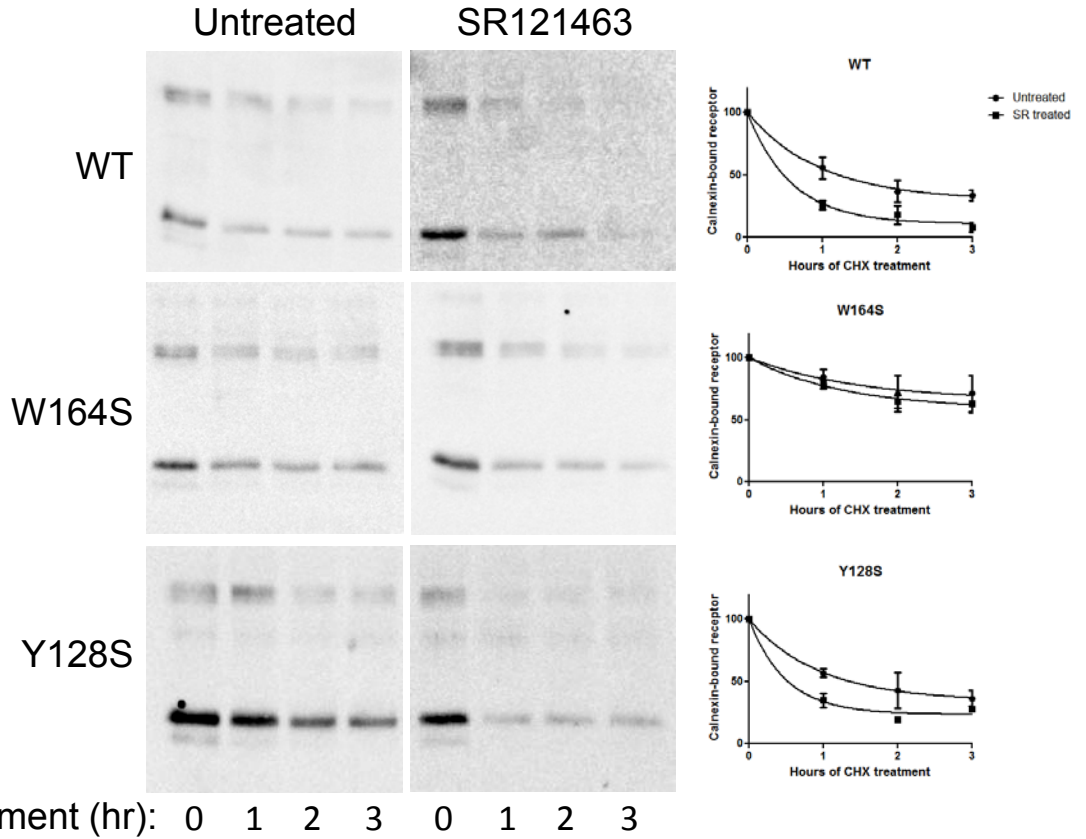


Figure 4

A

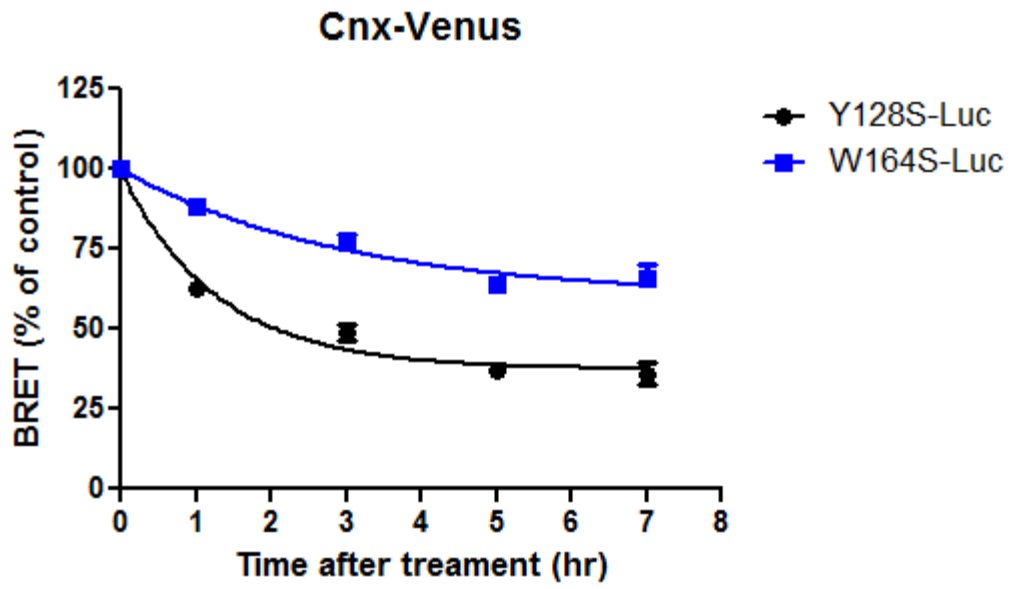


B

| | Interaction half-life (hour) | |
|-------|------------------------------|----------------------------|
| | Untreated | SR121463 |
| WT | 0.68 +/- 0.08 | 0.37 +/- 0.05 [Ⓜ] |
| W164S | 1.00 +/- 0.12 [*] | 0.89 +/- 0.11 |
| Y128S | 0.66 +/- 0.13 | 0.34 +/- 0.03 [Ⓜ] |

Figure 4

C



Multiplexing of Multicolor Bioluminescence Resonance Energy Transfer

Billy Breton, Étienne Sauvageau, Joris Zhou, Hélène Bonin, Christian Le Gouill, and Michel Bouvier*

Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, and Groupe de Recherche Universitaire sur le M  dicament, Université de Montréal, Montréal, Canada

ABSTRACT Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) is increasingly being used to monitor protein-protein interactions and cellular events in cells. However, the ability to monitor multiple events simultaneously is limited by the spectral properties of the existing BRET partners. Taking advantage of newly developed *Renilla* luciferases and blue-shifted fluorescent proteins (FPs), we explored the possibility of creating novel BRET configurations using a single luciferase substrate and distinct FPs. Three new (to our knowledge) BRET assays leading to distinct color bioluminescence emission were generated and validated. The spectral properties of two of the FPs used (enhanced blue (EB) FP2 and mAmetrine) and the selection of appropriate detection filters permitted the concomitant detection of two independent BRET signals, without cross-interference, in the same cells after addition of a unique substrate for *Renilla* luciferase-II, coelenterazine-400a. Using individual BRET-based biosensors to monitor the interaction between G-protein-coupled receptors and G-protein subunits or activation of different G-proteins along with the production of a second messenger, we established the proof of principle that two new BRET configurations can be multiplexed to simultaneously monitor two dependent or independent cellular events. The development of this new multiplexed BRET configuration opens the way for concomitant monitoring of various independent biological processes in living cells.

INTRODUCTION

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) is a natural phenomenon that occurs in a variety of coelenterates, including *Aequorea*, *Obelia*, *Phialidium*, and *Renilla*. It is based on the transfer of nonradiative energy originating from the luciferase-mediated oxidation of coelenterazine (the donor) to a fluorescent protein (FP) acting as the energy acceptor, which reemits part of the energy as photons (1). BRET occurs only when the donor and acceptor proteins are in close proximity (typically $<100 \text{ \AA}$) (2), and when the emission spectrum of the donor overlaps sufficiently with the excitation spectrum of the acceptor. The BRET phenomenon can be easily detected if the Stoke's shift between the excitation and emission spectra of the FP is sufficient for the light emission of the acceptor to be spectrally resolved from the donor's emission. Based on these properties, and the fact that the efficacy of the transfer varies with the 6th power of the distance between the donor and the acceptor, previous studies used BRET as an alternative to fluorescence resonance energy transfer (FRET) as a proximity-based assay to monitor macromolecular interactions and conformational rearrangements (3,4). More precisely, the luciferase from *Renilla reniformis* (Rluc) and different FP variants of *Aequorea victoria* GFP were genetically fused to distinct proteins to monitor their possible interactions in living cells (5,6). In other cases, the energy donor and acceptor were fused to a single protein to monitor conformational changes that can be used as biosensors of specific cellular events (7,8). More recently,

chemical fluorophores were used as energy acceptors and combined with Rluc-fused protein to monitor protein-lipid (9) and protein-RNA interactions (10) in living mammalian cells.

To date, three major BRET configurations using distinct Rluc substrates and FPs have been developed and used for protein-protein interaction and conformational rearrangement monitoring. BRET1 uses coelenterazine-h (coel-h) and a yellow FP (YFP) (5,6) or a green FP (GFP) from *Renilla* (RGFP) (11), BRET2 utilizes coelenterazine-400a (coel-400a) and a UV-excited green FP (uvGFP) (12,13), and BRET3 makes use of coel-h and the monomeric orange FP (mOrange) (14). Each of these BRET assays provides advantages that can be exploited for specific applications. BRET3, which results in the emission of red light, is less likely to be quenched by biological tissues (compared to yellow and green for BRET1 and BRET2, respectively) and thus facilitates in vivo detection. BRET2 has the best signal/noise ratio of the three configurations due to the larger Stoke's shift of the uvGFPs, and thus allows detection of smaller BRET changes. BRET1 results in the highest absolute signal, in part due to the very high quantum yield of YFP, permitting detection of BRET between proteins expressed at lower levels. However, none of the BRET partners used to date have allowed for simultaneous spectral resolution of signals, which is a prerequisite for true multiplexing within the same cells in a single well. The ability to multiplex BRET signals would allow investigators to detect distinct biological processes simultaneously in a unique cell population.

With the objective of developing BRET configurations that can be multiplexed, we searched for FPs that can serve as BRET acceptors for Rluc/coel-400a. The identification

Submitted June 28, 2010, and accepted for publication October 15, 2010.

*Correspondence: [REDACTED]

Editor: David P. Millar.

   2010 by the Biophysical Society
0006-3495/10/12/4037/10 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.025

and characterization of new BRET partners would lead to more flexibility in the use of BRET under different experimental conditions, and could allow the use of an existing collection of proteins already in fusion with different FPs. For this purpose, we took advantage of the recently developed mutant form of Rluc (Rluc2) that increases its bioluminescence by a factor of 3–45 times, depending on the coelenterazine used as substrate (15). Such an increase in the amount of energy emitted by Rluc2 should theoretically allow monitoring of energy transfer to FPs, which cannot be readily detected using wild-type (WT) Rluc, due to their less than optimal excitation spectrum overlap with the donor emission spectrum. The FPs to be tested were selected on the basis that they can all be excited by the same energy donor (Rluc/coel-400a), and they have sufficiently different Stoke's shifts to allow spectral resolution of their emission spectra.

In this study we established the ability of three additional FPs (enhanced blue (EB) FP2, super cyan fluorescent protein (SCFP3A), and mAmetrine) to accept energy transfer from Rluc2/coel-400a, generating three new BRET configurations. The spectral properties of mAmetrine and EBFP2 allowed their multiplexing with Rluc2/coel-400a as an energy donor, thus permitting simultaneous monitoring of two independent biological phenomena in the same cells.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

All fusion proteins in this study were subcloned in pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). Plasmids encoding all of the different G-protein subunits, prostanoid TP α receptor (TP α R), and dopamine D2 receptor (D2R) used in this study were purchased from the Missouri University of Science and Technology (www.cdna.org). The GFP10-G γ_2 construct was previously described (16). Constructs for EBFP2-G γ_2 , SCFP3A-G γ_2 , or mAmetrine-G γ_2 were derived from GFP10-G γ_2 by excising the GFP10 coding sequence with NheI-BamHI and replacing it with a polymerase chain reaction (PCR)-amplified coding sequence of EBFP2, SCFP3A, and mAmetrine, respectively. The mAmetrine-G γ_1 was constructed by replacing G γ_2 from mAmetrine-G γ_2 with G γ_1 using Acc65I-XbaI endonuclease. The EBFP2 (17) and mAmetrine1.1 (18) were obtained from AddGene (Cambridge, MA), and sCFP3 was generously provided by Dr. Gadella (19). The V2R-Rluc2 fusion was done using PCR fragments from V2R cDNAs and a mutant form of Rluc (15) in which C124 and M185 were replaced by alanine and valine residues, respectively. This mutant Rluc, named Rluc2, demonstrates an enhanced energy output from improved enzymatic properties (see Fig. S1 in the Supporting Material). The G α_q -121Rluc2 and G α_{i1} -91Rluc2 were constructed by PCR overlapping to insert the Rluc2 at position 121 and 91 of G α_q and G α_{i1} , respectively. The BRET-cAMP biosensors were derived from previously published GFP10-EPAC-Rluc2 fusion protein (20), in which GFP10 was replaced by the appropriate FPs using NheI-BamHI restriction enzymes (as described above for the GFP10-G γ_2) to generate EBFP2-EPAC-Rluc2, SCFP3A-EPAC-Rluc2, and mAmetrine-EPAC-Rluc2. Sequence integrity for the different clones was confirmed by DNA sequencing.

Cell culture and transfection

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin/strepto-

mycin, and 2 mM L-glutamine (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, Canada), and incubated at 37°C in 5% CO $_2$. Two days before experiments were conducted, 40,000 cells were distributed in 96-well white culture plates (PerkinElmer, Waltham, MA) treated with poly-ornithine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and transfected with 250 ng of total DNA using polyethylenimine 25 kD linear (PEI; Polysciences, Warrington, PA) as transfecting agent (3:1 PEI/DNA ratio). Then 11–50 ng of each specified expression vector were diluted in 150 mM NaCl and the total quantity of DNA was completed at 250 ng with salmon sperm DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Bioluminescence and fluorescence spectral profiles

Cells transiently expressing the individual FP-EPAC-Rluc2 fusion protein were seeded at 100,000 cells/well in a 96-well white Optiplat (PerkinElmer). The fluorescence spectra were acquired every 2 nm at 430–600 nm after excitation at 400 nm using a FlexStationII microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and expressed as a fraction of the maximal emission (normalized to one) for each FP. The bioluminescence spectra were acquired every 5 nm at 360–600 nm after 2 min of exposure to 5 μ M coel-400a (Biotium, Hayward, CA) using the FlexStationII microplate reader. The bioluminescence was expressed as a fraction of the maximal emission of the energy donor (normalized to one).

BRET measurements

Transfected cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) directly in the 96-well culture plates and kept in 100 μ L of PBS. BRET was monitored 10 min after the addition of 5 μ M coel-400a in a Mithras LB 940 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) equipped with different donor/acceptor emission filter sets (filter set 1: donor 480 \pm 20 nm/acceptor 530 \pm 20 nm; filter set 2: donor 410 \pm 70 nm/acceptor 515 \pm 20 nm; filter set 3: donor 410 \pm 70 nm/acceptor 480 \pm 20 nm; and filter set 4: donor 410 \pm 70 nm/acceptor 550 longpass). BRET signals were derived from the emission detected with the energy acceptor filter divided by the emission detected using the energy donor filter. Finally, the specific BRET signal was defined as the difference between the total BRET signals and the one obtained with Rluc2 alone. For the bioluminescence emission spectra experiments presented in Fig. 1, an mCherry-EPAC-Rluc2 construct, which is not competent for BRET, was used to define background values to be subtracted from those obtained from the spectrum of each FP. Identical background values were obtained using either the Rluc2 or the mCherry-EPAC-Rluc2 construct alone.

Multiplexing BRET assay

Transfected cells were washed and coel-400a was added as described for regular BRET measurement. To monitor two energy transfers, the luminescence signal was collected in the presence of three distinct filters, successively: 410 \pm 70 nm (common donor; Rluc2/coel-400a), 480 \pm 20 nm (EBFP2 acceptor), and 550 longpass (mAmetrine acceptor). The signal was collected for 1 s for each of the filters, for a total of 3 s per well of data acquisition. The signals from each BRET were derived from the emission detected with the appropriate energy acceptor filter divided by the emission detected using the energy donor filter (BRET $_{400\text{-BFP}} = 480 \pm 20$ nm over 410 \pm 70 nm, and BRET $_{400\text{-mAmetrine}} = 550$ longpass over 410 \pm 70 nm). Finally, the specific BRET signal was defined as the difference between the total BRET signals and the one obtained in cells transfected with Rluc2 alone.

Statistical analysis

We assessed the statistical significance of the difference between conditions by performing two-way analyses of variance (ANOVAs) followed by

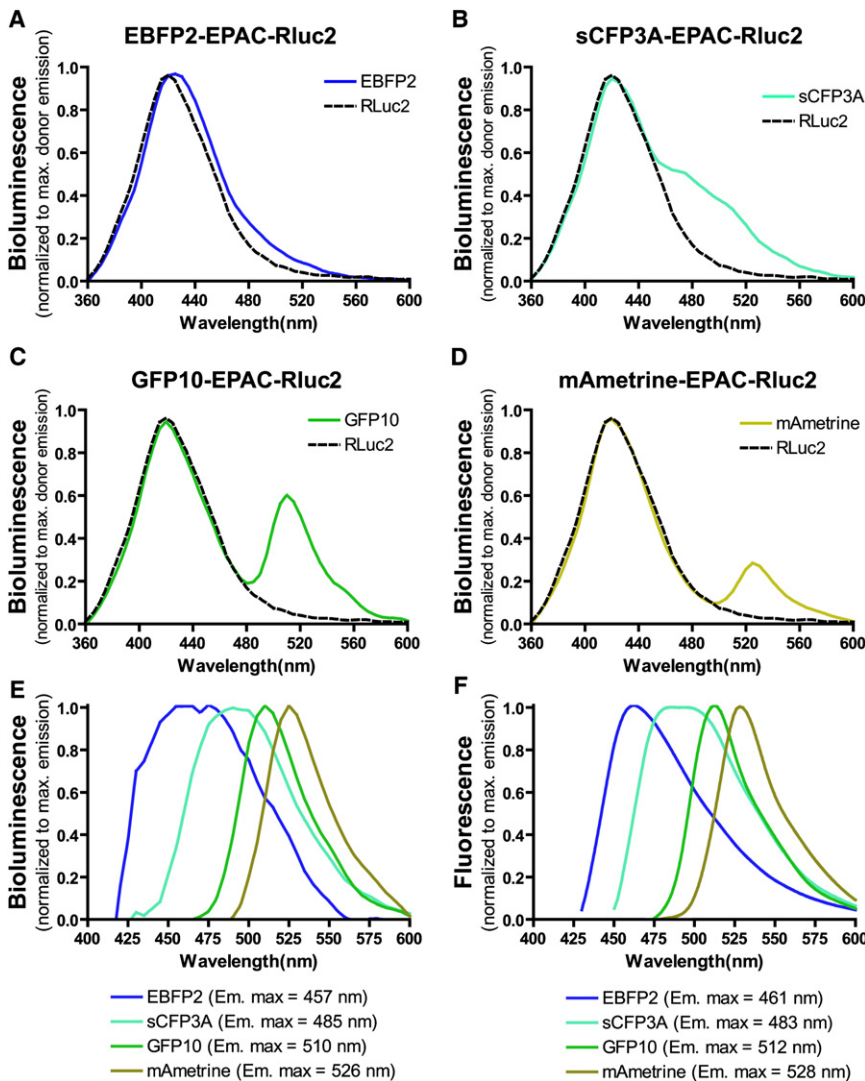


FIGURE 1 Bioluminescence and fluorescence emission spectra. Bioluminescence emission spectra of cells overexpressing EBFP2-EPAC-Rluc2 (A, blue line), SCFP3A-EPAC-Rluc2 (B, cyan line), GFP10-EPAC-Rluc2 (C, green line), and mAmetrine-EPAC-Rluc2 (D, dark yellow line), and negative control mCherry-EPAC-Rluc2 (A–D, black dotted line) were measured after the addition of coel-400a. (E) The bioluminescence of the mCherry-EPAC-Rluc2 control (which was not different from the emission from Rluc2 alone, since mCherry is not an acceptor for the Rluc2/coel-400a) was subtracted from the emission spectrum for each FP-EPAC-Rluc2 fusion proteins and normalized as a ratio of the maximal emission for each FP. (F) Fluorescence spectra obtained from cells overexpressing each of the FP-EPAC-Rluc2 fusion proteins was measured after direct excitation at 400 nm. The curves were generated using the LOWESS fitting equation from the Prism 4.0 software.

Bonferroni post-tests using Prism 4.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTS

Bioluminescence spectra

BRET2 is characterized by an energy transfer from the Rluc-mediated oxidation of coel-400a to the UV-shifted GFPs that can be excited at 400 nm and reemit light at 510 nm (e.g., GFP2 and GFP10) (4). The recently described FPs (EBFP2 (17), SCFP3A (19), and mAmetrine (18)), which have different emission wavelengths and Stoke’s shifts but close excitation peaks in the dark-blue region of the spectrum, could therefore represent potential BRET partners for Rluc2/coel-400a to create novel BRET configurations emitting at different colors. However, the suboptimal spectrum overlap and lower quantum yield of these FPs compared to GFP2 and GFP10 make them less attrac-

tive. The development of Rluc2, which yields luminescence signals 50 times larger than those generated by the WT Rluc (Fig. S1) upon coel-400a oxidation may make it possible to detect significant BRET despite these apparent limitations. To assess possible energy transfer between Rluc2/coel-400a and these FPs, we measured bioluminescence spectra from cells expressing an unimolecular BRET-based cAMP-biosensor of each color: EBFP2-EPAC-Rluc2, SCFP3A-EPAC-Rluc2, mAmetrine-EPAC-Rluc2, and GFP10-EPAC-Rluc2. As shown in Fig. 1, A–D, the spectra are characteristic of energy transfer, since in addition to the peak corresponding to the emission of Rluc2, a second component corresponding to the expected emission of the respective FPs was observed. To determine whether the second component of the curves (which in some cases (e.g., EBFP2) is a relatively small shoulder) truly results from fluorophore reemission, we subtracted the spectrum for a BRET noncompetent mCherry-EPAC-Rluc2 construct

(equivalent to Rluc2 alone) from the recorded spectrum for each FP. As shown in Fig. 1 E, the resulting spectra are essentially identical to those obtained after direct light excitation of each FP (Fig. 1 F), confirming that the second component of the curves originated from an energy transfer to an FP.

Since all constructs have essentially the same structure and sequence, except for a few mutations within FPs that lead to their specific spectral properties, the observed differences in emission intensity result from their distinct intrinsic ability to be excited and reemit transferred energy from the Rluc2/coel-400a. The differences are dictated by the extent of overlap between the Rluc2/coel-400a emission spectrum and the excitation spectrum of a given FP, as well as the quantum yield of the individual fluorophores. Based on the spectral overlap, the best partners for energy transfer from Rluc2/Coel400a are (in decreasing order) GFP10, mAmetrine, SCFP3A, and EBFP2. This is consistent with the amplitude of their emission peak (area under the curve): GFP10 (175.8) > SCFP3A (127.1) \approx mAmetrine (121.0) > EBFP2 (40.8), which reflects both the donor emission/acceptor excitation overlap and the fluorophore quantum yield. The relatively small reemission observed for EBFP2 is to be expected, given its relatively low quantum yield and a left-shifted excitation maximum peak (386 nm) compared to the other FPs (21). The above data illustrate that energy transfer can be monitored between Rluc2/coel-400a and the four UV-shifted FPs tested, supporting the possible development of three new BRET assays with EBFP2, SCFP3A, and mAmetrine. To prevent confusion among the different Rluc-based BRET configurations, we propose a new nomenclature that first indicates the emission peak of the donor, and then the name of the prototypical FP (which usually reflects its emission color) used for the transfer. According to this nomenclature, the three new BRET assays would be called BRET_{400-BFP}, BRET_{400-CFP}, and BRET_{400-mAmetrine}, whereas the existing BRET1, BRET2, and BRET3 would become BRET_{480-YFP}, BRET_{400-GFP}, and BRET_{480-Orange}, respectively.

Multicolor BRET

Given the different spectral properties of the confirmed BRET pairs, we then explored whether some filter sets could optimally detect their signals. For this purpose, we tested four donor/acceptor filter sets (set 1: 480/530; set 2: 410/515; set 3: 410/480; and set 4: 410/550) for monitoring bimolecular BRET between the V2 vasopressin receptor fused to Rluc2 (V2R-Rluc2) and the γ_2 subunit of an heterotrimeric G-protein fused to the different FPs (FP-G γ_2), upon stimulation of the receptor with increasing concentration of arginine-vasopressin (AVP). As shown in Fig. 2, A–D, both basal and AVP-promoted BRET increases were detected between FP-G γ_2 and V2R-Rluc2 for several FP and filter combinations. The basal BRET signal has been attributed to precoupling of the receptor with the G-protein, whereas the

agonist-promoted increase reflects a functional engagement of the G-protein by the receptor (16,22,23). The BRET signals generated by specific FPs were differentially detected by distinct filter sets, but perfect correlations between basal and agonist-promoted BRET increases were observed independently of the filter set used (Fig. 2 E), indicating that the characteristics of the different filters affect only the intensity of the detected signal and not its dynamics. For identical acceptor/donor expression ratios, the agonist-promoted BRET increases (expressed as % of the basal BRET) were the same for all BRET pairs considered (Fig. S2), indicating that the different BRET configurations yield comparable responses. Also, the detected EC₅₀-values for the AVP-stimulated increase in BRET between V2R-Rluc2 and each FP-G γ_2 were very similar for all FP and filter combinations used. The optimal filter sets for detecting BRET signals were different for each FP: filter set 1 was optimal for GFP10 and mAmetrine, whereas filter set 3 was best for SCFP3A and EBFP2, thus defining the optimal detection conditions for the four BRET assays. It is noteworthy that even for EBFP2, which yielded the weakest energy transfer (Fig. 1 A), the selection of a proper filter set allowed for the detection of a robust and highly reproducible signal.

Interestingly, some of the filter sets did not detect the BRET signal generated by some FPs (Fig. 2 and Fig. S2). For example, no BRET could be detected with the mAmetrine-G γ_2 in filter set 3 or with EBFP2-G γ_2 in filter set 4. Yet, good BRET signals were observed for mAmetrine-G γ_2 with filter set 4, set 1, and, to a lesser extent, set 2; and for EBFP2-G γ_2 with filter set 3 and, to a lesser extent, set 2 (Fig. 2). The absence of detected BRET between V2R-Rluc2 and G γ_2 with certain FPs and some filter sets did not result from a lack of interaction, but from the inadequacy of these filters to resolve the emissions resulting from energy transfer. The fact that BRET between Rluc2 and either mAmetrine or EBFP2 can be detected by distinct filter sets (sets 4 and 3, respectively) without contaminating the other signal raises the possibility that two independent transfers between a common donor and two acceptors can be monitored simultaneously within the same cells.

Multiplexing BRET

To experimentally determine whether simultaneous measurements of BRET between Rluc2 and both EBFP2 and mAmetrine can be used to differentially follow two events within the same cells, we combined two BRET-based biosensors: 1), a unimolecular cAMP-biosensor (mAmetrine-EPAC-Rluc2) that senses the cAMP level by monitoring the conformational change of EPAC upon cAMP binding; and 2), a bimolecular biosensor (EBFP2-G γ_2 and V2R-Rluc2) that detects the physical engagement of a G-protein subunit by V2R. Because G α_{12} was previously shown to potentiate receptor-mediated activation of

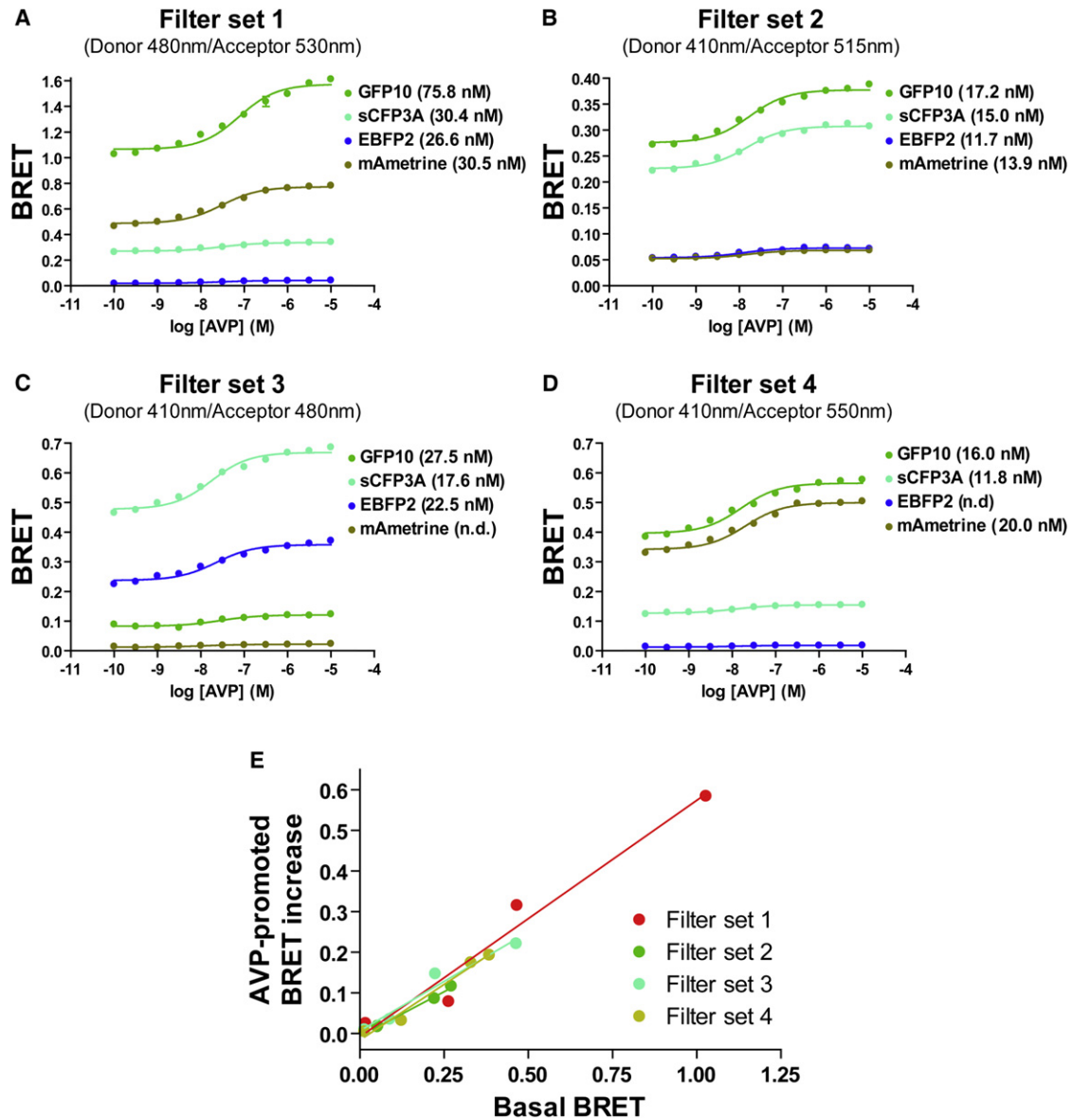
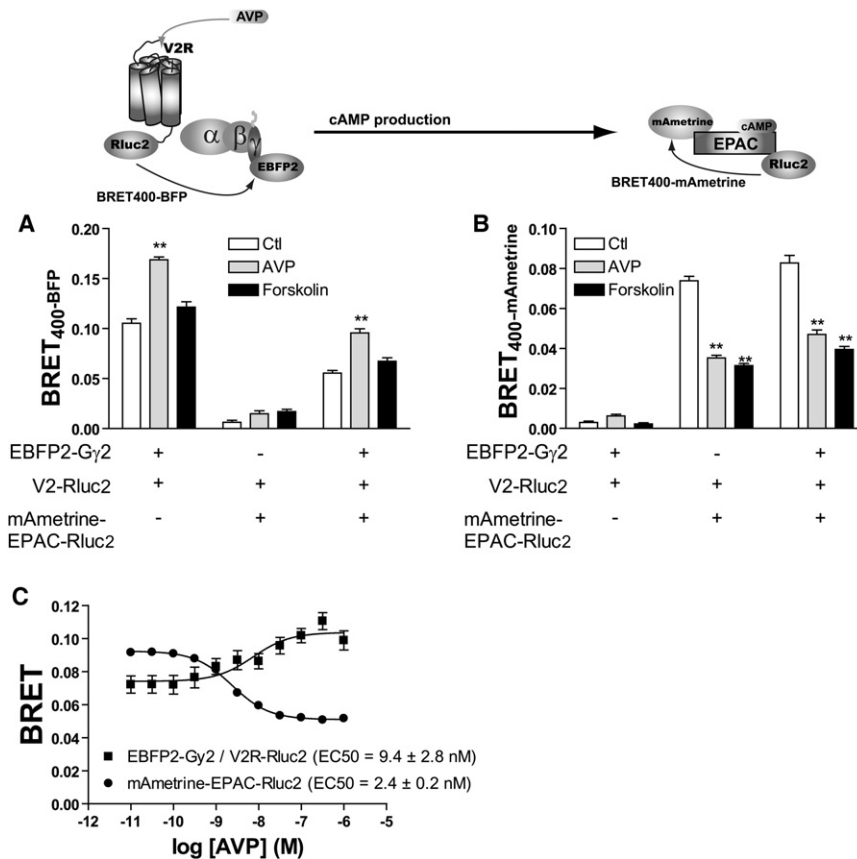


FIGURE 2 Multicolor BRET measurements. (A–D) BRET between V2R-Rluc2 and GFP10- $G\gamma_2$ (green), EBFP2- $G\gamma_2$ (blue), SCFP3A- $G\gamma_2$ (cyan), or mAmetrine- $G\gamma_2$ (dark yellow) were measured in cells coexpressing the indicated BRET partners and $G\alpha_{12}$, in the presence or absence of increasing concentrations of AVP. Cells were stimulated for 20 min with the indicated concentration of AVP, and coel-400a was added 10 min before the readings were taken. BRET was measured using four different filter sets (see characteristics in the Materials and Methods section), as indicated in the panels. Results are expressed as the means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. Curves were analyzed using a nonlinear regression sigmoid fit from the Prism 4.0 software. The EC_{50} (nM) is indicated for each FP within each filter set. (E) The maximal AVP-promoted BRET for each pair is plotted as a function of their basal BRET signals. The linear correlations for the four filter sets were obtained using a linear regression fit from the Prism 4.0 software and are depicted by the four lines in the graph.

adenylyl cyclase (24), we performed the assays in the presence of coexpressed $G\alpha_{12}$ to increase the size of the signal (Fig. S3). The two BRET events were monitored with three filters (filter set 5) composed of the common donor filter 410 ± 70 nm, and the optimal acceptor filters for mAmetrine (set 4: 550 longpass) and EBFP2 (set 3: 480 ± 20 nm) to follow the two energy transfers. In cells coexpressing V2R-Rluc2 and EBFP2- $G\gamma_2$, a significant basal increase and an AVP-promoted increase in BRET_{400-BFP}

were detected (Fig. 3 A), reflecting the engagement of the G-protein by the receptor, whereas no significant BRET_{400-mAmetrine} was observed (Fig. 3 B). In cells coexpressing V2R-Rluc2 and mAmetrine-EPAC-Rluc2, a significant AVP- and forskolin-promoted decrease in BRET_{400-mAmetrine} was detected (Fig. 3 B), indicating an increase in cAMP levels, whereas no BRET_{400-BFP} was detected in these cells (Fig. 3 A). These results confirm the selectivity of each filter set for detecting only one of the



two BRET events. In cells coexpressing V2R-Rluc2, EBFP2-G γ 2, and mAmetrine-EPAC-Rluc2, AVP promoted a significant increase in BRET_{400-BFP} (Fig. 3 A), reflecting the engagement of EBFP2-G γ 2 by V2R-Rluc2, as well as a concomitant decrease in BRET_{400-mAmetrine} (Fig. 3 B), resulting from an increase in cAMP levels. Forskolin-stimulated cAMP production also promoted a reduction in BRET_{400-mAmetrine} (Fig. 3 B) but did not affect BRET_{400-BFP} (Fig. 3 A), which is consistent with the ability of forskolin to stimulate adenylyl cyclase independently of the receptor/G-protein interaction. It is worth mentioning that the basal BRET_{400-BFP} observed in cells coexpressing V2R-Rluc2, EBFP2-G γ 2, and mAmetrine-EPAC-Rluc2 was lower than in cells expressing only V2R-Rluc2 and EBFP2-G γ 2 (Fig. 3 A). This can easily be explained by the fact that BRET is a ratio of EBFP2-emission over Rluc2-emission, and the Rluc2 signal originated from both V2R-Rluc2 and mAmetrine-EPAC-Rluc2 in the former cells. It is therefore important when setting up such assay to ensure that the expression levels of each Rluc2-fused constructs are maintained in similar ranges. Interestingly, however, the AVP-promoted BRET_{400-BFP} increase was very similar in the two conditions ($73 \pm 29\%$ vs. $60 \pm 11\%$ for cells expressing both Rluc2 biosensors or only one, respectively), indicating that the presence of the two Rluc2-based biosen-

FIGURE 3 Multiplexing BRET. BRET_{400-BFP} (A) and BRET_{400-mAmetrine} (B) were measured in cells expressing the indicated combination of V2R-Rluc2, EBFP2-G γ 2, and mAmetrine-EPAC-Rluc2. BRET was measured in the absence of ligand (Ctl) or after 20 min stimulation with AVP (100 nM) or forskolin (100 μ M). Coel-400a was added 10 min before readings were taken, using a single energy donor filter (410 ± 70 nm) and two different energy acceptor filters (480 ± 20 nm for BRET_{400-BFP} and 550LP for BRET_{400-mAmetrine}). Two-way ANOVAs followed by Bonferroni post-tests were used to assess the statistical significance of the differences (** $p < 0.001$) using Prism 4.0 software. (C) BRET_{400-BFP} between V2R-Rluc2 and EBFP2-G γ 2 (squares) and BRET_{400-mAmetrine} for the cAMP biosensor mAmetrine-EPAC-Rluc2 (circles) were measured simultaneously in cells coexpressing these constructs, after 20 min stimulation with increasing concentration of AVP. The results are expressed as the means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. The curves were generated using the nonlinear regression sigmoid fit from Prism 4.0 software.

sors did not influence their dynamic response. As shown in Fig. 3 C, in cells coexpressing V2R-Rluc2, EBFP2-G γ 2, and mAmetrine-EPAC-Rluc2, AVP promoted an increase in BRET_{400-BFP} and a decrease in BRET_{400-mAmetrine} with similar EC₅₀-values. These results show for the first time, to our knowledge, that multiplexing of two separate biosensors expressed in the same cell population can be monitored after a single coelenterazine addition. It should be noted that although the coexpression of G α 12 increased the cAMP signal, its presence was not required for detection of the EPAC biosensor signal (Fig. S3).

To determine whether BRET_{400-mAmetrine} and BRET_{400-BFP}-based biosensors can be multiplexed to monitor the activation of other signaling pathways, we directly monitored the activation of G α _i by D2R by monitoring the BRET changes between G α _{i1}-91Rluc2 and mAmetrine-G γ 2 upon stimulation of the D2R with quimpirol, and monitoring cAMP accumulation with BRET_{480-BFP} using EBFP2-EPAC-Rluc2 (Fig. 4 A). As expected, the stimulation with quimpirole promoted a decrease in BRET between G α _{i1} and G γ 2, indicating activation of G α _i (16), as well as an increase in the EPAC intramolecular BRET, reflecting a decrease in cAMP resulting from the action of activated G α _i on the adenylyl cyclase. The effects of agonist stimulation were blocked by pretreatment with pertussis

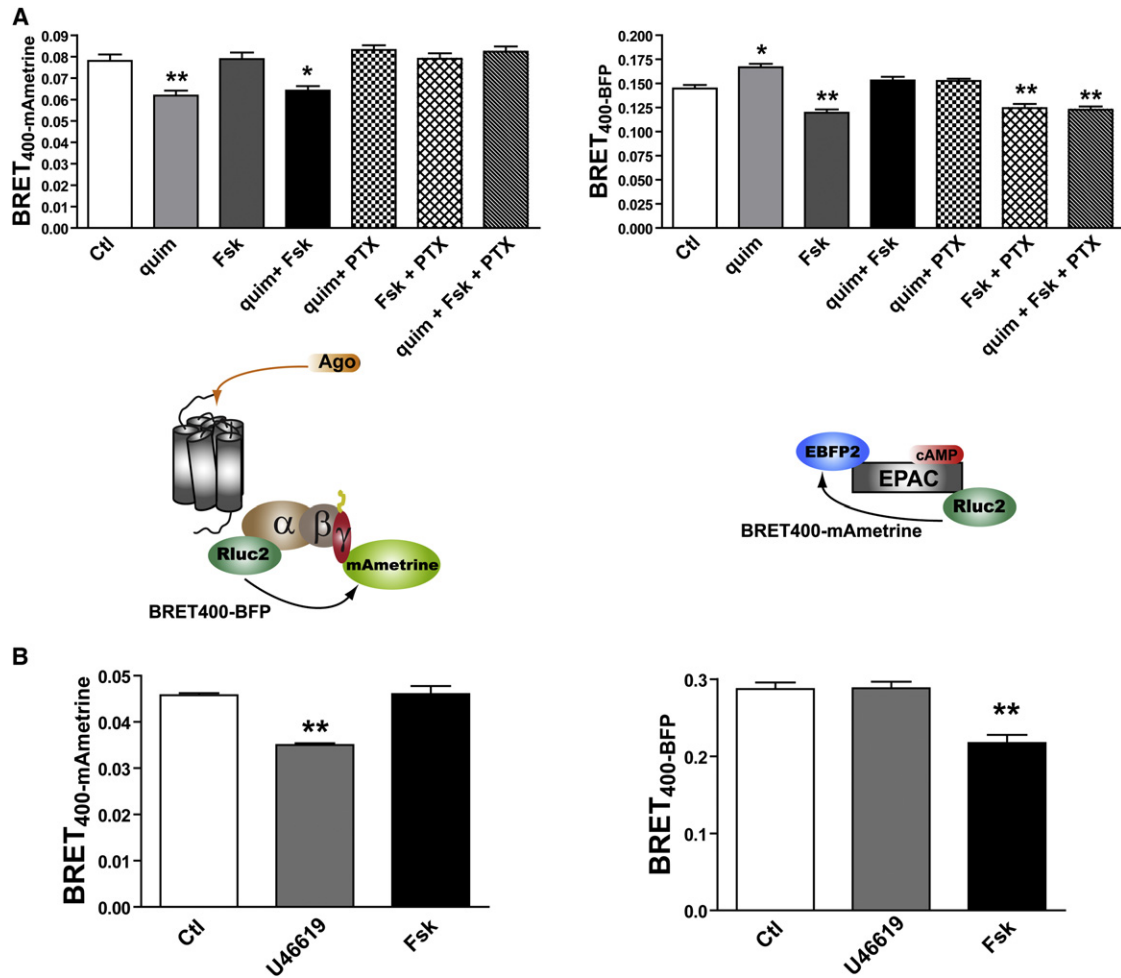


FIGURE 4 Multiplexing $G_{\alpha i}$ or $G_{\alpha q}$ activation with cAMP production. BRET from cells expressing (A) D2 dopamine receptor, $G_{\alpha i1}$ -91Rluc2, mAmetrine- $G_{\gamma 2}$, and EBFP2-EPAC-Rluc2; or (B) TP α R, $G_{\alpha q}$ -121Rluc2, mAmetrine- $G_{\gamma 1}$, and EBFP2-EPAC-Rluc2 was measured either in the absence of ligand or after 20 min stimulation with quimpirol (quim, 100 nM, A), U46619 (100 nM, B), and/or forskolin (Fsk, 100 μ M, A and B), as indicated. For the negative control in A, PTX (100 ng/mL) was added 16 h before the experiment. Coel-400a was added 10 min before readings were taken, using a single energy donor filter (410 ± 70 nm) and two different energy acceptor filters (480 ± 20 nm for BRET_{400-BFP} and 550LP for BRET_{400-mAmetrine}). Two-way ANOVAs followed by Bonferroni post-tests were used to assess the statistical significance of the differences (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) using Prism 4.0 software.

toxin (PTX), which inhibits $G_{\alpha i}$ activity. Direct activation of the adenylyl cyclase with forskolin had no effect on the BRET between $G_{\alpha i1}$ and $G_{\gamma 2}$, whereas it promoted a decrease in the intramolecular EPAC resulting from the increased cAMP. As expected, the latter effect was completely resistant to PTX treatment. We also assessed the activation of $G_{\alpha q}$ by monitoring BRET_{400-mAmetrine} between $G_{\alpha q}$ -121Rluc2 and mAmetrine- $G_{\gamma 1}$ upon activation of the TP α R with the selective agonist U46619. As shown in Fig. 4 B, activation with the agonist promoted a decrease in BRET between $G_{\alpha q}$ and $G_{\gamma 1}$, reflecting $G_{\alpha q}$ activation, whereas it did not affect the EPAC intramolecular BRET_{400-BFP} consistent with the notion that activation of TP α R does not affect cAMP levels. In the same cells, direct stimulation of adenylyl cyclase by forskolin promoted a decrease in the EPAC BRET but did not affect the $G_{\alpha q}$ - $G_{\gamma 1}$ BRET. Taken together, these results indicate that

BRET_{400-mAmetrine} and BRET_{400-BFP} can be multiplexed to monitor many distinct signaling pathways, and the BRET signals obtained with the individual biosensors are independent of one another.

DISCUSSION

In this study we report the development of what we believe are three new BRET configurations that complement the existing ones, and provide for the first time, to our knowledge, a toolbox for simultaneous multiplexing of spectrally resolved BRET assays within the same cells.

Multicolor BRET

To date, three configurations of genetically encoded BRET assays, with Rluc used as the energy donor, have been

described. BRET1 and BRET3 use coel-h as the Rluc substrate for transferring energy to YFPs (eGFP, eYFP, citrine, venus, YPeT, and RGFP) and RFPs (mOrange, mTomato, and sdTomato), respectively. BRET2 uses coel-400a and Rluc as an energy donor, and uvGFPs (GFP10, GFP2, and Sapphire) as energy acceptors. In this study, three new BRET configurations are presented. They all use coel-400a as the Rluc substrate and acceptor FPs that can be excited at a similar wavelength (~400 nm) but emit at different colors as a result of distinct Stoke's shifts.

Of the four BRET₄₀₀ FPs used in our study, the original BRET_{400-GFP} is still the one with the largest BRET signals due to its superior quantum yield and better overlap between the Rluc emission and FP excitation spectra. The lower transfer efficacy toward BFP, CFP, and mAmetrine as compared to GFP10 most likely explains why BRET signals obtained with these FPs have not been reported until now. Only the availability of Rluc mutant forms, such as Rluc8 and Rluc2 (15,25), that emit higher levels of bioluminescence upon oxidation of coel-400a, raised the possibility of using BFP, CFP, and mAmetrine as viable BRET₄₀₀ acceptors. Indeed, in our hands, the amount of light emitted by Rluc2 was 50-fold higher than that emitted by the WT enzyme (Fig. S1), which led to detectable transfer to BFP, CFP, and mAmetrine despite a suboptimal overlap between Rluc2/coel-400a emission and FPs excitation spectra. Furthermore, because of the higher bioluminescence of Rluc2, one can achieve easily measurable BRET signals with coel-400a using much lower expression levels than previously needed for classical BRET2. For instance, when a standard curve correlating the luminescence signal to the density of V2R (assessed by radioligand binding) was generated (data not shown), the levels of V2R needed to obtain the BRET signals reported in Fig. 2 and Fig. S2 were estimated to be between 110 and 325 fmol/mg of protein. Such expression levels are comparable to those measured in kidney tissues and kidney cells (130 and 310 fmol/mg, respectively (26)).

The selection of optimal filter sets to quantify the BRET generated by specific fluorophores is also an important factor in obtaining the best signal/noise ratio. Larger BRET ratios are obtained by selecting filters that favor the detection of the FP over that of the Rluc emission. However, it is important to select a filter band-pass that will allow the detection of a sufficient amount of light to remain within the linear dynamic range of the detectors and avoid affecting the linearity of the signals. A good illustration of this phenomenon is provided by the observation that the filter sets that generate the largest signal for BRET_{400-GFP} are Rluc em: 480 ± 20 nm and GFP em: 530 ± 20, and not Rluc em: 410 ± 35 nm and GFP em: 515 ± 15 nm (compare Fig. 2, A and B), which are commonly use for this type of BRET experiment (12,13). The filter sets used do not affect the dynamics of the response, since the increase in basal signal was found to be directly propor-

tional to the ligand-promoted increase in BRET observed between V2-Rluc2 and GFP-Gγ₂ (Fig. 2 E). However, the larger absolute signals obtained could allow the detection of small BRET signals that might be lost in the background noise when nonoptimal filter sets are used.

Although BRET_{400-GFP}, which corresponds to traditional BRET2, remains the BRET system that generates the largest signal with Rluc2/coel-400a, access to additional BRET colors provides several advantages. First, the ability to perform BRET_{400-CFP} provides an interesting alternative because it allows the direct use of the many proteins and protein libraries (generated to study proteins localization or protein interactions by FRET) that are already CFP-tagged. Moreover, some FPs, such as mAmetrine and EBFP2, have similar excitation profiles but different Stoke's shifts, resulting in spectrally resolvable emission spectra that allow multiplexing for the simultaneous detection of two distinct BRET events with a single Rluc substrate in living cells. It should also be noted that even though a single prototypical FP was used for each of the new color BRET configurations presented, a selection of FPs could be used for two of them: BRET_{400-BFP} (EBFP, EBFP2, and mKalama1) and BRET_{400-CFP} (ECFP, SCFP3A, CyPet, mCerulean, and mTFP1.0). In some cases, the specific biophysical properties of some FPs (e.g., pH sensitivity, propensity to dimerize, and quantum yield) could make them preferred choices.

Multiplexing BRET

A few studies have described genetically encoded dual FRET-based assays (27) that allow the detection of two simultaneous FRET events within the same cells. These assays provide the advantage of single-cell microscopy imaging (27). However, the quantification of two FRET events is complicated by the fact that only a limited numbers of FP pairs are available for efficient transfer. For most existing pairs, the excitation of the donor with a light source leads to direct excitation of the acceptor. Moreover, the emission spectra of the existing FP FRET acceptors are similar, which makes it difficult to achieve spectral resolution and leads to spectral bleed-through. This necessitates the use of mathematical correction factors, which are not always easy to translate to practice and require additional control measurements. BRET is more sensitive than FRET for measuring RET with the use of plate readers. This is due in part to the high sensitivity of the PMT detectors used in plate readers, which allows easy detection of BRET. Also, the autofluorescence originating from the light excitation of the donor reduces the signal/noise ratio for FRET (28). Thus, for different applications (i.e., imaging versus activity detection in plate readers), either technique may be preferred.

The results of this study demonstrate that two BRET events can be monitored simultaneously within the same

cells, thus permitting the simultaneous detection of distinct biological outcomes. We have shown that BRET_{400-BFP} and BRET_{400-mAmetrine} can be multiplexed to detect the conformational rearrangement of a unimolecular cAMP biosensor simultaneously with the engagement of G-proteins by their cognate receptors. The activation of three distinct receptor/G-protein signaling pathways can be easily monitored with bimolecular sensors that monitor either the interaction between the receptor and G γ or the receptor-mediated separation between G α and G γ . We observed BRET_{400-BFP} and BRET_{400-mAmetrine}, triggered by the activation of the receptor, within the same cells without cross-interference from the individual signals. This multiplexing method is distinct from and complementary to previously reported BRET approaches. For instance, because of its ability to monitor two events independently, the BRET_{400-BFP}/BRET_{400-mAmetrine} multiplexing approach is different from recently developed sequential RET (29) and bimolecular fluorescence complementation BRET assays (30,31) that were designed to monitor a single event involving three partners. BRET_{400-BFP}/BRET_{400-mAmetrine} multiplexing, which allows the monitoring of two BRET signals simultaneously in a single well, facilitates kinetic comparisons between the two events and reduces the number of manipulations needed, thus opening the door to high-throughput screening applications.

In this study, we used BRET_{400-BFP}/BRET_{400-mAmetrine} multiplexing to combine unimolecular biosensors (mAmetrine-EPAC-Rluc2 or BFP-EPAC-Rluc2) with bimolecular probes (V2R-Rluc2/EBFP2-G γ ₂, G α _{i1}-91Rluc2/mAmetrine-G γ ₂, or Gq-121Rluc2/mAmetrine-G γ ₁) for the detection of protein-protein interactions. However, the assays would also allow one to combine two unimolecular biosensors or three probes to monitor the interaction of one partner in fusion with Rluc2 with two distinct partners in fusion with mAmetrine and EBFP2. In the latter case, the extent of BRET observed with each partner will be influenced by the relative expression levels of the partners. One can easily determine the optimal acceptor/donor ratio to use for signal detection by performing BRET titration experiments for each FP individually, where the Rluc2-fused construct is maintained constant and the level of the FP-fused construct is increased (Fig. S2, B and C). Because there is no spectral overlay between mAmetrine and EBFP2 when the appropriate filters are used, different ratios can easily be used for the two multiplexed pairs without signal contamination. Since the FPs used in the new BRET assays did not influence the interaction or the modulation of the interactions monitored, as shown by the similar amplitude of the BRET change detected between V2R and G γ ₂ for the different FP combinations used (Fig. 2 E), we expect that the adaptation and optimization of known BRET interactions into BRET multiplexing should be straightforward.

In addition to introducing three new (to our knowledge) configurations of BRET, we have presented what we believe

is a first proof of principle that spectrally resolved BRET assays can be multiplexed to monitor two independent cellular events. These assays will undoubtedly be valuable tools for monitoring protein-protein interactions as well as other events, such as second messenger production, for which RET biosensors can be designed. The robustness and easy implementation of these assays should ensure their wide utilization and facilitate their combination with other approaches, such as bimolecular fluorescence or luminescence complementation assays (30,32), to increase the number of interactions that can be simultaneously monitored within the same cell.

SUPPORTING MATERIAL

Three figures are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495S0006-3495\(10\)01313-5](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495S0006-3495(10)01313-5).

We thank Dr. Monique Lagacé for her critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada, and the Kidney Foundation of Canada to M.B. B.B. received a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. M.B. holds the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

REFERENCES

- Morin, J. G., and J. W. Hastings. 1971. Energy transfer in a bioluminescent system. *J. Cell. Physiol.* 77:313–318.
- Dacres, H., J. Wang, ..., S. C. Trowell. 2010. Experimental determination of the Förster distance for two commonly used bioluminescent resonance energy transfer pairs. *Anal. Chem.* 82:432–435.
- Pfleger, K. D., and K. A. Eidne. 2006. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat. Methods.* 3:165–174.
- Hamdan, F. F., Y. Percherancier, ..., M. Bouvier. 2006. Monitoring G-protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 5:Unit 5.23.
- Xu, Y., D. W. Piston, and C. H. Johnson. 1999. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:151–156.
- Angers, S., A. Salahpour, ..., M. Bouvier. 2000. Detection of β 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3684–3689.
- Jiang, L. I., J. Collins, ..., P. C. Sternweis. 2007. Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J. Biol. Chem.* 282:10576–10584.
- Charest, P. G., S. Terrillon, and M. Bouvier. 2005. Monitoring agonist-promoted conformational changes of β -arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep.* 6:334–340.
- Pontier, S. M., Y. Percherancier, ..., M. Bouvier. 2008. Cholesterol-dependent separation of the β 2-adrenergic receptor from its partners determines signaling efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. *J. Biol. Chem.* 283:24659–24672.
- Martel, C., S. Dugré-Brisson, ..., L. Desgroseillers. 2010. Multimerization of Staufin1 in live cells. *RNA.* 16:585–597.
- Molinari, P., I. Casella, and T. Costa. 2008. Functional complementation of high-efficiency resonance energy transfer: a new tool for the study of protein binding interactions in living cells. *Biochem. J.* 409:251–261.

12. Bertrand, L., S. Parent, ..., L. Ménard. 2002. The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G-protein-coupled receptors (GPCRS). *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 22:533–541.
13. Mercier, J. F., A. Salahpour, ..., M. Bouvier. 2002. Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 277:44925–44931.
14. De, A., P. Ray, ..., S. S. Gambhir. 2009. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaginG-protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J.* 23:2702–2709.
15. Loening, A. M., T. D. Fenn, ..., S. S. Gambhir. 2006. Consensus guided mutagenesis of *Renilla luciferase* yields enhanced stability and light output. *Protein Eng. Des. Sel.* 19:391–400.
16. Galés, C., R. V. Rebois, ..., M. Bouvier. 2005. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat. Methods.* 2:177–184.
17. Ai, H. W., N. C. Shaner, ..., R. E. Campbell. 2007. Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochemistry.* 46:5904–5910.
18. Ai, H. W., K. L. Hazelwood, ..., R. E. Campbell. 2008. Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nat. Methods.* 5:401–403.
19. Kremers, G. J., J. Goedhart, ..., T. W. Gadella, Jr. 2006. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry.* 45:6570–6580.
20. Leduc, M., B. Breton, ..., N. Heveker. 2009. Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331:297–307.
21. Day, R. N., and M. W. Davidson. 2009. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* 38:2887–2921.
22. Bünemann, M., M. Frank, and M. J. Lohse. 2003. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:16077–16082.
23. Galés, C., J. J. Van Durm, ..., M. Bouvier. 2006. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G-protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:778–786.
24. Jiang, L. I., J. Collins, ..., P. C. Sternweis. 2008. Regulation of cAMP responses by the G12/13 pathway converges on adenylyl cyclase VII. *J. Biol. Chem.* 283:23429–23439.
25. Kocan, M., H. B. See, ..., K. D. Pflieger. 2008. Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G-protein-coupled receptors in live cells. *J. Biomol. Screen.* 13:888–898.
26. Hensen, J., M. Haenelt, and P. Gross. 1996. Lithium induced polyuria and renal vasopressin receptor density. *Nephrol. Dial. Transplant.* 11:622–627.
27. Carlson, H. J., and R. E. Campbell. 2009. Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:19–27.
28. Boute, N., R. Jockers, and T. Issad. 2002. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol. Sci.* 23:351–354.
29. Carriba, P., G. Navarro, ..., R. Franco. 2008. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods.* 5:727–733.
30. Héroux, M., M. Hogue, ..., M. Bouvier. 2007. Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifyinG-protein-1. *J. Biol. Chem.* 282:31610–31620.
31. Rebois, R. V., M. Robitaille, ..., T. E. Hébert. 2008. CombininG-protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. *Methods.* 45:214–218.
32. Stefan, E., S. Aquin, ..., S. W. Michnick. 2007. Quantification of dynamic protein complexes using *Renilla luciferase* fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:16916–16921.