

Université de Montréal

**Nouveaux mécanismes de régulation des récepteurs
couplés aux protéines G**

Lien entre complexes protéiques, localisation et signalisation

Par

Stéphanie M. Pontier

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

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

Juillet, 2005

© Stéphanie M. Pontier, 2005

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Nouveaux mécanismes de régulation des récepteurs
couplés aux protéines G**

Lien entre complexes protéiques, localisation et signalisation

Présentée par :
Stéphanie M. Pontier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Philippe Crine, président-rapporteur
Michel Bouvier, directeur de recherche
Audrey Claing, membre du jury
Carole Parent, examinatrice externe
Nikolaus Heveker, Représentant du doyen de la FES

Résumé

La compartimentation cellulaire et les mécanismes modulant les interactions protéiques déterminent la spécificité et la dynamique de la composition des complexes de signalisation. L'impact de ces processus sur l'efficacité du transfert d'information reste mal connu. Le rôle des rafts, des microdomaines membranaires particuliers, ou de mécanismes de contrôle des interactions protéiques impliquant la chaperone NSF ou le phénomène d'ubiquitination sera ainsi évalué en étudiant la signalisation de trois récepteurs modèles de la famille des GPCR (Récepteurs couplés aux protéines G) : les récepteurs β 2-adrénérique (β 2AR), GABA_B (GABA_BR) et V2-vasopressine (V2R), respectivement. Nos résultats suggèrent qu'au contraire du β 2AR, exclu des rafts résistants au TritonX100, la protéine Gs et l'adénylyl cyclase s'y localisent significativement. Cette distribution différentielle du récepteur et de ses partenaires de signalisation constituerait un frein à son efficacité de transduction. L'étude du rôle de l'interaction directe de NSF et du GABA_BR indique par ailleurs que l'activité de cette chaperone contrôle également l'efficacité de couplage du récepteur dans un mécanisme dépendant de la protéine kinase C. La présence de la protéine NSF et du récepteur GABA_B dans les rafts suggère, de plus, qu'NSF exerce cette fonction en régulant potentiellement la distribution membranaire du récepteur. Outre leur rôle dans la signalisation, les rafts participent parallèlement aux microdomaines recouverts de clathrine, au contrôle des phénomènes d'endocytose survenant lors de la désensibilisation fonctionnelle des GPCR. Acteur clef de ces phénomènes, la β arrestine adopte un comportement spécifique en fonction de son état d'ubiquitination. Afin de pouvoir détecter en parallèle la dynamique en temps réel de l'ubiquitination de la β arrestine et l'évolution de ses capacités de liaison aux récepteurs ou à ses autres partenaires, nous avons développé une méthode originale reposant sur la technologie de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence. La fidélité de cette dernière a été estimée en revisitant le modèle d'ubiquitination différentielle de la β arrestine par les β 2AR ou V2R.

L'ensemble de ces études nous ont conduit à proposer que NSF, l'ubiquitination et les rafts participent à différentes facettes d'un même principe de régulation: le contrôle de la distribution latérale et de l'association des GPCR à des complexes de signalisation spécifiques.

Mots-clés: GPCR, signalosome, désensibilisation, compartimentation, rafts, diffusion latérale, ubiquitination, β arrestine, NSF

Abstract

The cellular compartmentation and the various mechanisms controlling protein interactions guarantee the specificity and the dynamic composition of signaling protein complexes. The impact of these processes on the efficacy of the transfer of information being largely unknown, the influence of raft microdomains or of mechanisms regulating protein interactions involving the NSF chaperone or the ubiquitination phenomenon, have been evaluated by studying the signalisation of three membrane receptors belonging to the G protein coupled receptor family (GPCR): β 2-adrenergic (β 2AR), GABA_B (GABA_BR) and V2-vasopressin (V2R) receptors. Our results show that in contrast to β 2AR, the Gs protein and the adenylyl cyclase are significantly localized in TritonX100 resistant rafts. This differential distribution of the receptor and its signaling partners appears to restrain its coupling efficacy. The direct interaction between NSF and the GABA_BR is also implicated in the control of receptor signaling efficacy. The presence of NSF and the receptor in raft microdomains could moreover suggest that NSF exercise its role by controlling the lateral distribution of the GABA_BR. In addition to their role in signaling, rafts participate with the clathrin associated microdomains to the regulation of receptor endocytosis occurring for exemple during desensitization events. A key actor in these phenomena, the β arrestin, adopts a specific behaviour depending on its ubiquitination state. In order to be able to follow in real time, the dynamic of the ubiquitination of this protein and the evolution of its binding properties toward receptors or other kind of partners, we developed a detection method using the bioluminescence resonance energy transfert technology. The reliance and the efficacy of this method have been estimated by studying the model of the differential ubiquitination of β arrestin in response to β 2AR or V2R.

By correlating our studies to numerous reports in the literature, we will propose that NSF, ubiquitination and rafts, participate to different aspects of a general principal of regulation of GPCR: the control of their lateral membrane diffusion and their association to specific signaling complexes.

Keywords: GPCR, signalosome, desensitization, compartmentation, lateral diffusion, raft, ubiquitination, β arrestin, NSF

Table des matières

| | |
|--|------------|
| AVANT-PROPOS | 1 |
| INTRODUCTION..... | 3 |
| LA SIGNALISATION ASSOCIÉE AUX GPCR..... | 4 |
| LES ACTEURS..... | 4 |
| <i>Les récepteurs.....</i> | <i>4</i> |
| <i>Les protéines G hétérotrimériques</i> | <i>9</i> |
| <i>Les effecteurs activés par les protéines G.....</i> | <i>16</i> |
| <i>Les protéines régulatrices de l'activité des GPCR.....</i> | <i>28</i> |
| COMPLEXES MULTIMÉRIQUES ET SIGNALISATION..... | 45 |
| <i>Structure quaternaire des acteurs de la signalisation des GPCR.....</i> | <i>45</i> |
| <i>Les avantages moléculaires de la multimérisation</i> | <i>48</i> |
| <i>Le rôle de l'oligomérisation : le cas des GPCR.....</i> | <i>52</i> |
| TRANSITIONS ALLOSTÉRIQUES ET SIGNALISATION | 54 |
| <i>Définition.....</i> | <i>54</i> |
| <i>Le cas des récepteurs.....</i> | <i>55</i> |
| LOCALISATION MEMBRANAIRE | 62 |
| LES MEMBRANES CELLULAIRES | 63 |
| <i>Composition et organisation des membranes biologiques.....</i> | <i>64</i> |
| <i>Les microdomaines membranaires.....</i> | <i>67</i> |
| <i>Raft et signalisation.....</i> | <i>77</i> |
| CYTOSQUELETTE ET PROTÉINES D'ÉCHAFAUDAGES..... | 90 |
| <i>Le réseau cortical d'actine.....</i> | <i>90</i> |
| <i>Les protéines d'échafaudage.....</i> | <i>93</i> |
| <i>Diffusion latérale et transport membranaire</i> | <i>97</i> |
| LE TRANSPORT MEMBRANAIRE | 98 |
| <i>L'endocytose.....</i> | <i>99</i> |
| <i>Le phénomène de fusion membranaire.....</i> | <i>106</i> |

| | |
|---|------------|
| LES TROIS RÉCEPTEURS MODÈLES | 113 |
| LE RÉCEPTEUR β 2-ADRÉNERGIQUE..... | 113 |
| <i>Signalisation</i> | 113 |
| <i>Compartimentation membranaire</i> | 115 |
| <i>Régulation de l'activité et désensibilisation</i> | 117 |
| LE RÉCEPTEUR V2-VASOPRESSINE..... | 118 |
| LE RÉCEPTEUR GABA _B | 119 |
| <i>Distribution cellulaire au cours du développement</i> | 121 |
| <i>Fonction physiologique</i> | 122 |
| <i>Transport membranaire</i> | 124 |
| <i>Déterminants moléculaires de l'activation du récepteur</i> | 126 |
| <i>Modulation de l'activité et interactions protéiques</i> | 127 |
| OBJECTIFS DE LA THÈSE | 130 |
| RÉSULTATS | 132 |
| LA COMPARTIMENTATION MEMBRANAIRE..... | 133 |
| INTRODUCTION | 134 |
| PUBLICATION N°1(SOUMISSION À JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY) ... | 136 |
| LA PROTÉINE NSF..... | 175 |
| INTRODUCTION | 176 |
| PUBLICATION N°2 (EN PRÉPARATION POUR EMBO JOURNAL)..... | 178 |
| L'UBIQUITINATION | 223 |
| INTRODUCTION | 224 |
| PUBLICATION N°3 (PUBLIÉE DANS NATURE METHODS)..... | 227 |
| DISCUSSION GÉNÉRALE | 258 |
| LE RÔLE DES RAFTS DANS LA SIGNALISATION..... | 259 |
| LE CAS DU RÉCEPTEUR β 2-ADRÉNERGIQUE | 259 |
| D' AUTRES RÉCEPTEURS | 261 |
| LE POINT DE VUE PHARMACOLOGIQUE | 262 |

| | |
|--|------------|
| RÔLE DE LA PROTÉINE CHAPERONE NSF..... | 265 |
| CARACTÉRISATION DE LA LIAISON DE NSF AU GABA _B R..... | 265 |
| UN MODÈLE POTENTIEL DE L'ACTION DE NSF | 266 |
| DYNAMIQUE DE LA LIAISON DE NSF À L'HÉTÉRODIMÈRE | 268 |
| LE RÔLE DE NSF DANS LA DIFFUSION LATÉRALE | 269 |
| INFLUENCE DU RÉCEPTEUR GABA _B SUR L'ACTIVITÉ DE NSF | 272 |
| RÔLE DE L'UBIQUITINATION DANS LA RÉGULATION DES | |
| COMPLEXES PROTÉIQUES..... | 274 |
| CONCLUSION..... | 278 |
| REFERENCES..... | 280 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| TABLEAU 1. PROPRIÉTÉS DES DIFFÉRENTES ADÉNYLYL CYCLASES..... | 19 |
| TABLEAU 2. LA CELLULE EN CHIFFRES | 51 |
| TABLEAU 3. RÉCEPTEURS ET RAFTS..... | 78 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| FIGURE 1. SCHÉMA DE LA TOPOLOGIE MEMBRANAIRE D'UN RÉCEPTEUR À 7TM MODÈLE. | 6 |
| FIGURE 2. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU COMPLEXE HETEROTRIMERIQUE $G_{T\alpha_{GDP}}-G\beta-G\gamma_1$ (PDB CODE 1GOT). | 10 |
| FIGURE 3. REPRESENTATION DU CYCLE D'ACTIVATION D'UNE PROTEINE G HETEROTRIMERIQUE ET DU ROLE ACTIVATEUR OU INHIBITEUR JOUE PAR LES DIFFERENTS MODULATEURS DE CE DERNIER. | 12 |
| FIGURE 4. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE PROPOSÉE DES DIFFÉRENTS ISOFORMES MEMBRANAIRES DES ADÉNYLYL CYCLASES. | 18 |
| FIGURE 5. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN KIR3.0 ET DE LA LOCALIZATION DE SES INTERACTIONS AVEC DIVERSES MODULATEURS. | 21 |
| FIGURE 6. REPRÉSENTATION DE LA SOUS UNITÉ α D'UN CANAL CAV2.0 ET DU SITE D'ACTION DES DIFFÉRENTS MODULATEURS DE CETTE DERNIÈRE. | 26 |
| FIGURE 7. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES PROTEINES DE LA FAMILLE GRK (GRK1-GRK7). | 32 |
| FIGURE 8. ARCHITECTURE DES β BARR1 ET β BARR2. | 35 |
| FIGURE 9. LES DIFFÉRENTES VOIES D'INTERNALISATION EMPRUNTÉES PAR LES GPCR. | 37 |
| FIGURE 10. REPRESENTATION DU MECANISME D'UBIQUITINATION DU RECEPTEUR β 2AR ET DE LA β ARRESTINE 2. | 39 |
| FIGURE 11. ILLUSTRATION DE LA DYNAMIQUE D'UBIQUITINATION DE LA β BARR. | 40 |
| FIGURE 12. PAILLON DE LA FAMILLE DES LÉPIDOPTÈRES. | 44 |
| FIGURE 13. ORGANISATION ET TOPOGRAPHIE DE LA FACE CYTOSOLIQUE DE LA RHODOPSINE DANS DES MEMBRANES NATIVES DE RETINES DE SOURIS. | 46 |
| FIGURE 14. MODELE DU COMPLEXE TERNAIRE POUR LES GPCR. | 58 |
| FIGURE 15. MODELE PROBABILISTE. | 60 |
| FIGURE 16. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTES ORGANISATIONS ADOPTÉES PAR LES MOLÉCULES DE LIPIDE. | 67 |
| FIGURE 17. LES HYPOTHESES CONCERNANT LA STRUCTURE ET LA REGULATION DES RAFTS. | 71 |
| FIGURE 18. IMPORTANCE DES RAFTS AU COURS DE LA RÉACTION LYMPHOCYTAIRE. | 76 |
| FIGURE 19. RÔLE DES RAFTS DANS LA SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS OXYTOCIN ET β 1-ADRÉNERGIQUE. | 84 |
| FIGURE 20. SPÉCIFICITÉ DE SIGNALISATION DE DIVERS RÉCEPTEURS DANS LES RAFTS. | 86 |
| FIGURE 21. RÔLE DES RAFTS DANS LA SIGNALIZATION DE L'EGFR. | 88 |
| FIGURE 22. MECANISME DE REGULATION DE L'EXPRESSION A LA SURFACE DES RECEPTEURS AMPA AU GLUTAMATE CONTENANT LES SOUS UNITES GLUR1 ET GLUR2. | 94 |

| | |
|---|-----|
| FIGURE 23. IMPLICATION DE LA VOIE D'INTERNALISATION RAFT/CAVEOLAE DANS LA DEGRADATION DU RECEPTEUR DE L'EGF. | 104 |
| FIGURE 24. MÉCANISME DE FUSION MEMBRANAIRE LORS DE L'EXOCYTOSE DE NEUROTRANSMETTEUR. | 107 |
| FIGURE 25. REPRÉSENTATION DE L'ORGANISATION MOLÉCULAIRE DE LA PROTÉINE NSF..... | 109 |
| FIGURE 26. MÉCANISME D'ACTION DE NSF AU COURS DU DÉSAMBLAGE DU COMPLEXE SNARE ET LES PHÉNOMÈNES LE RÉGULANT..... | 110 |
| FIGURE 27. SÉQUENCE DU RÉCEPTEUR β 2AR. | 114 |
| FIGURE 28. REPRÉSENTATION DES PROPRIÉTÉS DE TRANSPORT À LA MEMBRANE DES RÉCEPTEURS GBR1 ET GBR2 DANS DES SYSTÈMES HÉTÉROLOGUES..... | 121 |
| FIGURE 29. SEQUENCES ET ORGANISATION DES RECEPTEURS GBR1 ET GBR2..... | 125 |
| FIGURE 30. CARACTERISATION DE LA LIAISON PRÉCISE DE NSF A LA SOUS UNITÉ GBR2. | 267 |
| FIGURE 31. RÔLE DE NSF DANS LA RÉGULATION DU RÉCEPTEUR GABA _B | 271 |
| FIGURE 32. IDENTIFICATION DES MOTIFS PEST PRÉSENTS DANS LES SEQUENCES DE β ARR1 ET β ARR2. | 277 |

Liste des sigles et abréviations

| | |
|------|--|
| AA | acide aminé |
| A | Alanine |
| C | Cystéine |
| D | Aspartate |
| E | Glutamate |
| F | Phénylalanine |
| G | Glycine |
| H | Histidine |
| I | Isoleucine |
| K | Lysine |
| L | Leucine |
| M | Méthionine |
| N | Asparagine |
| P | Proline |
| Q | Glutamine |
| R | Arginine |
| S | Sérine |
| T | Thréonine |
| V | Valine |
| Y | Tyrosine |
| W | Tryptophane |
| AAA | ATPase associées à différentes activités cellulaires |
| ABC | Cassette de liaison à l'ATP |
| AC | Adénylyl cyclase |
| AGS | Activateur de la signalisation des protéines G |
| AKAP | Protéine d'ancrage de la PKA |
| AMPA | Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate |

| | |
|--|--|
| AMPC | Adénosine monophosphate cyclique |
| AP1/2/3/4 | Complexes adaptateurs de type 1, 2, 3 ou 4 |
| AQP2 | Aquaporine de type 2 |
| α AR, β AR | Récepteur adrénergique de type α ou β |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| ATPase | Enzyme hydrolysant l'ATP |
| ATP γ S | Adenosine 5'-(gamma-thio) triphosphate |
| AT ₁ R | Récepteur de l'angiotensine de type 1A |
| AVP | Arginine vasopressine |
| B2R | Récepteur de la bradykinine de type 2 |
| β arr1/2 | β arrestine 1 ou 2 |
| BRET | Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence |
| BRET ¹ | BRET entre la coelenterazine H et la YFP |
| BRET ² | BRET entre la DeepBlue coelenterazine et la GFP |
| c- | Carboxyl |
| Ca ²⁺ | Ion calcique |
| CaM | Calmoduline |
| CaR | Récepteur de sensibilité au calcium |
| Cav | Canaux calciques voltages dépendant |
| CCR5 | Récepteur des chimiokines CC de type 5 |
| CFTR | Cystic fibrosis transmembrane regulator |
| CKII | Kinase caséine II |
| CRE | Élément de réponse à l'AMPC |
| CREB | Protéine liant CRE |
| CRLR | Calcitonin receptor like receptor |
| CTC | Complexe ternaire cubique |
| CXCR | Récepteur des chimiokines CXC |
| D1R, D2R, D3R | Récepteur de la dopamine de type 1, 2, ou 3 |
| DAG | Diacylglycérol |
| δ OR | Récepteur δ -opioïde |
| e ₁ , e ₂ , e ₃ | Boucles extra-cellulaires 1, 2, 3 |

| | |
|--------------------------------------|---|
| EDTA | Acide tétra-acétique éthylène diamine |
| EGF, EGFR | Facteur de croissance des épidermes et son récepteur |
| eNOS, iNOS | NO synthase endothéliale ou inductible |
| ERK1/2 | Kinases régulées par des signaux extra-cellulaires 1 et 2 |
| ET _A R, ET _B R | Récepteur de l'endothéline de type A ou B |
| ETC | Complexe ternaire étendu |
| fMLP | N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine |
| FRET | Transfert d'énergie de fluorescence par résonance |
| Frz | Récepteur Frizzled |
| FSH | Hormone stimulatrice du follicule |
| G | Protéine à activité GTPase |
| GABA | Acide- γ -amino-butyrique |
| GABA _A R | Récepteur ionotropique au GABA |
| GABA _B R | Récepteur métabotropique au GABA |
| GAP | Protéine activatrice de la GTPase |
| GBR1/2 | Récepteur GABA _B de type 1 et 2 |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| GEF | Facteur d'échange du GDP |
| GFP | Protéine fluorescente verte |
| GIRK | Canaux potassiques rectifiant entrant sensibles aux protéines G |
| Glu | Glutamate |
| GluR | Récepteur ionotropique au glutamate |
| GLUT | Transporteur du glucose |
| GMPc | Guanosine monophosphate cyclique |
| GnRH | Hormone de relâche des gonadotropines |
| GRK | Kinase des GPCRs |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| GTPase | Enzyme hydrolysant le GTP |
| H | Hormone |
| H ⁺ | Ion hydrogène |
| HEK293 | Cellules embryonnaires de rein humain 293 |

| | |
|-----------------|---|
| Hh | Récepteur hedgehogue |
| i_1, i_2, i_3 | Boucles intra-cellulaires 1, 2, 3 |
| IGF | Facteur de croissance semblable à l'insuline |
| IL-8 | Interleukine-8 |
| IP3 | Inositol-1,4,5-triphosphate |
| IR | Récepteur de l'insuline |
| JNK | Kinase au domaine N-terminal semblable à c-Jun ou SAPK |
| K^+ | Ion potassique |
| K_{ATP} | Canaux potassiques sensibles à l'ATP |
| K_{ir} | Canaux potassiques rectifiant entrant |
| K_{on} | Constante cinétique d'association |
| K_{off} | Constante cinétique de dissociation |
| L | Ligand |
| LH | Hormone lutéinisante |
| Luc | Luciférase de <i>Rénilla</i> |
| MAPK | Protéine kinase activée par des mitogènes |
| Mg^{2+} | Ion magnésium |
| mGluR1/5/7 | Récepteur métabotropique du glutamate de type 1, 5 ou 7 |
| Mn^{2+} | Ion manganèse |
| n- | Amino |
| Na^+ | Ion sodique |
| NGF, NGFR | Facteur de croissance neuronal et son récepteur |
| NHE3 | Échangeur $Na^+ - H^+$ de type 3 |
| NHERF | Facteur de régulation de l'échange $Na^+ - H^+$ |
| NK1R | Récepteur de la neurokinine-1 |
| nm | Nanomètre |
| nM | Nanomolaire |
| NMDA | N-méthyl-D-aspartate |
| NO | Oxyde d'azote |
| NOS | Enzyme de synthèse du NO |
| NSF | Facteur sensible au N-éthylmaléimide |

| | |
|-----------------------------|--|
| OR | Récepteur de l'oxytocin |
| PAF, PAFR | Facteur activant les plaquettes et son récepteur |
| PAR | Récepteur activé par une protéase |
| PC | Phosphatidylcholine |
| PCA | Essai de complémentation protéique |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PDGF, PDGFR | Facteur de croissance dérivé des plaquettes et son récepteur |
| PDZ | Domaine semblable à PSD-95/Discs-large/ZO-1 |
| PE | Phosphatidyléthanolamine |
| PH | Domaine d'homologie à la plextrine |
| PI | Phosphatidyl Inositol |
| PICK1 | Protéine interagissant avec la PKC |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase |
| PKA | Protéine kinase dépendante de l'AMPc |
| PKC | Protéine kinase dépendante du Ca ²⁺ |
| PKD | Protéine kinase D |
| PLA ₂ , PLC, PLD | Phospholipase de type A ₂ , C, ou D |
| PP2A | Phosphatase de type 2A |
| PS | Phosphatidylsérine |
| PSD | Protéine de densité synaptique |
| PTH, PTHR | Hormone parathyroïdienne et son récepteur |
| R | Récepteur |
| R* | Récepteur actif |
| RACK | Récepteur activé par la PKC |
| RAMP | Protéine modifiant l'activité des récepteurs |
| GPCR | Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques |
| RGS | Régulateur de la signalisation des protéines G |
| RTK | Récepteur à activité tyrosine kinase |
| SH1, SH2, SH3 | Domaine d'homologie à Src de type 1, 2, ou 3 |
| SL | Sphingolipides |
| Smo | Récepteur smoothened |

| | |
|-----------------------------|---|
| SNAP | Protéine soluble de liaison à NSF |
| SNAP-25 | Protéine soluble de liaison à NSF de type 25 (SNARE) |
| SNARE | Récepteur à SNAP |
| STX1 | Syntaxine de type 1 |
| SUR | Récepteur de l'urée sulfoné |
| TGF β / TGF β R | Facteur de croissance transformant de type β et son récepteur |
| TM | Domaine trans-membranaire |
| TSH | Hormone stimulatrice de la thyroïde |
| μ M | Micromolaire |
| V2R | Récepteur de la vasopressine de type 2 |
| VAMP | Protéine membranaire d'attachement des vésicules |
| YFP | Protéine fluorescente jaune |

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Dr Audrey Claing, Carole Parent et Philippe Crine pour avoir accepté de critiquer ce travail éclectique qui je l'espère, fera l'objet de riches discussions. Je remercie également l'ensemble des membres passés et présents du laboratoire et du département de Biochimie, collègues et collaborateurs, dont les discussions souvent pleines d'humour ont toujours constitué des sources inépuisables d'idées et de réflexions. Les idées développées dans cette thèse reflètent, je crois, de manière plus ou moins directe l'ensemble de ces discussions. Certains individus ont néanmoins eu des rôles particuliers en aidant par leur écoute, leur compréhension personnelle ou leurs critiques à en structurer l'argumentation et je leur en suis reconnaissante. A vous tous, Charlène Bélanger, Michel Bouvier, François-Xavier Campell-Valois, Céline Galès, Galia Ghaddar, Monique Lagacée, Nicolas Lahaie et Ali Salhapour. Si j'ai eu la chance d'avoir eu quelques idées au cours de cette période c'est sans aucun doute grâce à vous qu'elles n'ont pas aussitôt replongé dans les méandres de mon inconscient.

* * * *

Fraîchement arrivée d'un pays pétri de théorie, Michel Bouvier décida, dès 1999, de faire de moi « une américaine ». Mes racines européennes m'intimaient d'être très choquée de ce dessein dont la nature m'échappait pleinement. Néanmoins, l'homme s'attela à cette difficile tâche. A mon insu, il m'inculquât donc l'art et les finesses de la discussion « américaine » et de l'échange des idées. Art complexe dans lequel mes origines ne me conféraient que de bien piètres dispositions.

Rétrospectivement, sa réussite en ce projet ne m'apparaît pas évidente, néanmoins, il est des raideurs françaises que l'homme a certainement aidé à adoucir et pour cela je l'en remercie. Si je reste solidement campée sur certaines des positions que j'ai prises au cours de nos multiples discussions, il n'est aucun de ses arguments qui ne resteront gravés dans ma mémoire. Pas plus que cette fascinante habileté qui est la sienne de s'attacher à mettre en exergue les qualités d'une situation, à trouver le compromis salvateur ou encore la critique constructive.

Pour ce difficile rôle de modèle et de guide que tu as accepté de jouer pendant ces sept années, je te prie de croire en mon profond respect et mon infinie gratitude.

* * * * *

Cette période est certainement apparue aux yeux de certains des résidents de la côte est de l'atlantique, cette fameuse vieille France, bien longue. Ils sont pourtant restés, contre vents et marrés, des ancres à la solidité exceptionnelle, essentielles dans les jours de tempête. Quand ma route leur échappait, ils changeaient de cap et me suivaient, infailliblement. Merci à vous, Hélène, Thierry, Marcel, Ginette et Archibald.

* * * * *

Cette expérience singulière m'a également donné l'opportunité de côtoyer des personnes en l'absence de qui, mon séjour québécois aurait été moins heureux. Monique Lagacée tout d'abord qui m'a toujours laissée abuser de sa gentillesse, sa patience et sa générosité. Virginie Bernier dont l'honnêteté et les incertitudes assumées font d'elle une personne époustouflante. Nicolas Lahaie dont la compagnie pendant ces deux dernières années s'est révélée tout à la fois stimulante, gratifiante et très enrichissante. Stéphane Angers, un scientifique à l'énergie radiante. Ali Salahpour dont les talents scientifiques et humains en font un collègue et un ami irremplaçable. Céline Galès, une amie dont la passion pour la science et la vie en général semble inépuisable. Stéphanie Cox, une colocataire inoubliable. Galia Gaddhar, pour son amitié, nos longues discussions et ses talents de photographe. Dimitri Sans, un ami précieux et unique. Charlène Bélanger, Alexis Vallée-Beslisle, Murielle Chapuis, des amis de mes premières heures québécoises qui sont et resteront dans mon cœur.

* * * * *

Finalement, Arthur et.....François.

AVANT-PROPOS

Unité fondamentale du vivant, la cellule est étroitement dépendante de son milieu. La quantité de nourriture, le niveau d'oxygène, le niveau de lumière ou encore la présence d'autres cellules ou organismes sont autant d'informations nécessaires à sa survie. Ce besoin a amené les cellules à développer des moyens de détection et de communication remarquables tant par leur diversité que leur efficacité. Tous sont organisés selon un schéma conservé: un récepteur cellulaire détecte un signal; il transmet l'information à des effecteurs; ces derniers permettent alors la propagation et l'intégration du signal ; l'intégration du signal aboutit à un stockage de l'information à plus ou moins long terme ainsi qu'à l'adaptation du comportement cellulaire. Chez l'homme, plus d'un cinquième des protéines sont impliqués dans de tels mécanismes de communication, soit environ 20000 protéines différentes (Copley et al., 2002). La cellule humaine doit donc à tout moment intégrer de manière efficace les multiples signaux transmis par l'intermédiaire de ces milliers de protéines.

Quels sont les mécanismes biologiques lui permettant de relever un tel défi? Comment la transmission exacte d'une information donnée est-elle assurée au même titre que des centaines d'autres et ce, simultanément? Par quelle « magie » la cellule réussit-elle à atteindre un tel niveau de précision dans un environnement complexe et variable?

L'une des réponses développées au cours des quelques trois milliards et demi d'années qui nous ont précédés, réside dans la régulation de l'association des protéines assurant la communication cellulaire (Bray and Duke, 2004). Au demeurant simple, ce phénomène repose paradoxalement sur la synergie d'une variété de mécanismes moléculaires d'une exquise complexité.

En étudiant les conséquences fonctionnelles de ces mécanismes sur la signalisation de récepteurs appartenant à la famille des récepteurs couplés aux

protéines G (GPCR), dont la diversité et le succès évolutif constituent les signes distinctifs (Perez, 2003), ce travail de doctorat s'inscrit dans cette problématique générale.

INTRODUCTION

L'idée directrice de ce travail est d'étudier le rôle, dans la signalisation des GPCR, de certains des mécanismes cellulaires, impliqués dans la modulation des complexes protéiques. A travers l'étude de trois récepteurs particuliers, les récepteurs β_2 adrénergique (β_2AR), V2-vasopressine (V2R) et $GABA_B$ ($GABA_{BR}$), les conséquences fonctionnelles de la compartimentation membranaire et de la modulation des complexes et des interfaces protéiques seront évaluées. Afin de souligner la multitude et la promiscuité des acteurs impliqués dans la signalisation de ces trois récepteurs, les propriétés générales de certains de leurs partenaires seront dans un premier temps envisagées. Comme nous le verrons, la plupart de ces protéines présentent une propension à s'organiser en complexes oligo- ou multimériques probablement essentielle à l'efficacité de la signalisation cellulaire. Le contrôle précis de cette dernière va ainsi reposer sur la régulation de la localisation et la composition de ces complexes de signalisation, encore appelés signalosomes. Afin d'illustrer le rôle et les propriétés de certains de ces mécanismes, nous étudierons les conséquences pharmacologiques de la présence dans les rafts (des microdomaines particuliers des membranes) des partenaires de signalisation du β_2AR ; de l'interaction du $GABA_{BR}$ avec une protéine spécialisée dans la déstabilisation des complexes protéiques, NSF; enfin de la liaison covalente de la β arrestine à une petite protéine, l'ubiquitine, dont la dynamique, détectée *in vivo* à l'aide de la technologie du BRET (Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence) détermine les propriétés d'association de la β arrestine aux GPCR. Dans ce dernier cas, les exemples des récepteurs, β_2AR et V2R seront envisagés. Finalement, nous tenterons d'évaluer à travers leur remise en contexte dans la littérature dans quelle mesure ces trois types de régulation spécifiques au demeurant indépendantes, ne constitueraient pas différentes facettes d'un même principe général de régulation de la signalisation associée aux GPCR.

LA SIGNALISATION ASSOCIÉE AUX GPCR

LES ACTEURS

Les récepteurs

La superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) est sans conteste la plus grande famille de récepteurs chez les mammifères (Perez, 2003). Le séquençage du génome humain a permis d'évaluer à un peu moins d'un millier le nombre de gènes codant ces récepteurs. Leur versatilité leur permet de détecter efficacement une grande variété de ligands (photons, molécules odorantes, acides aminés, nucléotides, hormones glycoprotéiques...etc), dont la diversité est probablement sous estimée puisque nombre de ces récepteurs restent pharmacologiquement orphelins. Comme leur nom le suggère, le couplage de ces molécules aux protéines G hétérotrimériques semblent partagé par l'ensemble des récepteurs de la superfamille des GPCR. Ce prédictat n'a évidemment pas été démontré pour tous les récepteurs. La démonstration d'un couplage aux protéines G pour deux récepteurs très fortement conservés au cours de l'évolution (Pires-daSilva and Sommer, 2003), Frizzled (Frz) (Katanaev et al., 2005) et Smoothed (Smo) (DeCamp et al., 2000) tend néanmoins à soutenir l'hypothèse d'une généralisation du couplage récepteurs/protéine G au sein de la famille des GPCR. Cette interaction fonctionnelle entre récepteur et protéine G n'en est pas pour autant exclusif. Nombre de récepteurs ont la capacité de transduire le signal indépendamment des protéines G. De leur côté, les protéines G hétérotrimériques régulent entre autre, l'activité de récepteurs membranaires distincts des GPCR, comme par exemple les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tel que le récepteur de l'insuline (IR).

Évolutivement conservés, on retrouve des GPCR chez les plantes, les champignons, les invertébrés et les vertébrés. La conservation de séquence des récepteurs homologues est néanmoins minime. Une classification reposant sur leur similarité de séquence (Kolakowski, Jr., 1994) a ainsi rapidement démontré des faiblesses en faillant à incorporer des récepteurs tels que le récepteur Frizzled (Wang et al., 1996) ou voméronasal (Dulac and Axel, 1995). Plus récemment, une

classification reposant sur les liens phylogénétiques existant entre les différents GPCR a été proposée (Fredriksson et al., 2003). Elle comprend cinq groupes principaux de récepteurs (**G**lutamate, **R**hodopsin, **A**dhesion, **F**rizzled et **S**ecretin) constituant le système de classification GRAFS. La majorité des récepteurs répertoriés chez les différents organismes eucaryotes dont le génome a été séquencé, appartiennent à l'un de ces cinq groupes (Fredriksson and Schioth, 2005). Certains récepteurs échappent néanmoins à cette classification; les chémorécepteurs du nématode (Robertson, 1998), le récepteur à l'AMPc de *Dictyostelium*, les récepteurs du goût et des odeurs des insectes (Hill et al., 2002), le récepteur MLO chez les plantes (Devoto et al., 2003), les récepteurs STE2 (Marsh and Herskowitz, 1988) et STE3 (Hagen et al., 1986) chez la levure, en sont des exemples. A l'encontre des classifications précédentes (Bockaert and Pin, 1999), le système GRAFS suggère l'existence d'un ancêtre commun aux différents GPCR (Fredriksson et al., 2003; Perez, 2003) répertoriés, avec lequel la bactério-rhodopsine pourrait avoir des liens phylogénétiques. Bien qu'exhibant une très faible homologie de séquence avec la famille des GPCR (Josefsson, 1999), la topologie membranaire heptahélicoïdale de la bactério-rhodopsine est semblable à la structure tertiaire du domaine membranaire des GPCR (Perez, 2003).

Topologie

Les sept hélices transmembranaires (7TM) des GPCR (Fig. 1) forment en effet l'empreinte structurale de ces protéines, également connue sous le terme de « récepteurs à 7TM ». Ces domaines hydrophobes placent leurs extrémités n et c-terminales de part et d'autre de la membrane. L'extrémité n-terminale et trois boucles, situées chacune entre deux régions membranaires (les boucles e₁, e₂ et e₃), constituent la zone d'interface avec le milieu extracellulaire; les boucles i₁, i₂, i₃ et le domaine c-terminal baignant quant à eux dans le cytoplasme. Les boucles intracellulaires vont former une interface de liaison essentielle au couplage du récepteur aux protéines G hétérotrimériques (Hamm, 2001). L'extrémité c-terminale va être la cible de

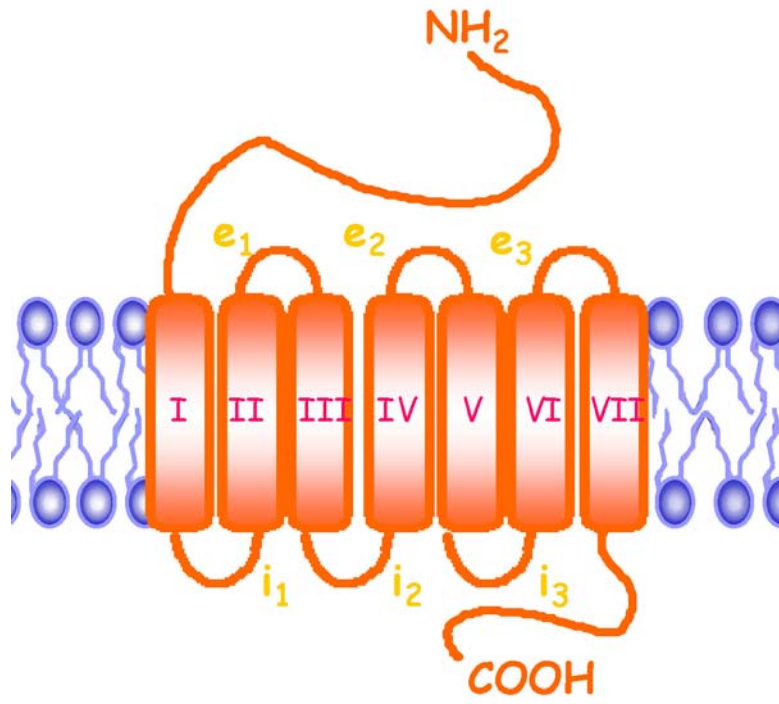


Figure 1. Schéma de la topologie membranaire d'un récepteur à 7TM modèle.

diverses protéines kinases et constituer un ancrage potentiel à de nombreuses protéines accessoires ou GIP (GPCR interacting protein) parmi lesquelles les protéines d'échafaudage sont un groupe important (Bockaert et al., 2003; Bockaert et al., 2004).

Phylogénie

La famille de la rhodopsine

Les récepteurs présentant des liens phylogénétiques avec la rhodopsine sont les plus nombreux. Chez l'homme, parmi les quelque 700 récepteurs de ce groupe, 460 sont des récepteurs olfactifs. Tous partagent des motifs conservés, la séquence NsxxNPxxY dans le TM_{VII} et le motif DRY entre le passage TM_{III} et la boucle i₂. La rhodopsine est le seul récepteur à 7TM ayant été cristallisé jusqu'à présent (Palczewski et al., 2000). Ceci permet d'estimer avec un degré de confiance relatif la structure transmembranaire des récepteurs de cette famille. La plupart d'entre eux lient le ligand au niveau d'une poche hydrophobe située entre les passages transmembranaires (Kristiansen, 2004). Les récepteurs aux hormones glycoprotéiques (LH, FSH, TSH) font cependant exception en liant le ligand par leur extrémité n-terminale.

Les récepteurs β_2 AR et V₂R, deux de nos récepteurs modèles, font partie du groupe des récepteurs liés phylogénétiquement à la rhodopsine. Si le récepteur β_2 AR présente des propriétés de liaison similaires à la rhodopsine, le V₂R va par contre lié la vasopressine à la fois au niveau de ses domaines TM mais aussi de son domaine n-terminal.

La famille des récepteurs sécrétine

Cette famille de récepteurs comprend des récepteurs avec un domaine n-terminal long de 60 à 80 acides aminés, liant des peptides impliqués dans la signalisation intercellulaire de type paracrine. Ils présentent des cystéines très conservées engagées dans des ponts dissulfures importants pour la liaison du peptide. En plus du récepteur à la sécrétine, cette famille inclut entre autres les récepteurs de la calcitonine, les récepteurs CRLR (*Calcitonin receptor like receptor*) et ceux au glucagon.

La famille des récepteurs au glutamate

Les récepteurs de la famille des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) sont au nombre de seize : huit récepteurs au glutamate, deux récepteurs métabotropiques à l'acide γ -amino-butérique (GABA), les récepteurs GABA_B 1 et 2 (GBR1 et GBR2), un récepteur sensible au calcium (CaR) et cinq récepteurs de type TAS1 liant potentiellement des molécules du goût. Ils ont en commun une région n-terminale imposante (280 à 580 acides aminés) rappelant la forme d'une plante tue-mouche ou Venus Flytrap que l'on retrouve également chez certains récepteurs ionotropiques [Glutamate et GABA; (Mayer and Armstrong, 2004)]. Ce domaine n-terminal aurait une structure bilobée similaire à celle retrouvée chez les protéines périplasmiques bactériennes (Felder et al., 1999) comme la protéine de liaison au maltose. Le ligand serait enfermé dans la cavité délimitée par les deux lobes (Kunishima et al., 2000). A l'exception des récepteurs GBR1 et GBR2, les récepteurs de cette famille comportent une région riche en cystéines potentiellement importante dans le processus d'activation. Autre élément commun à plusieurs des récepteurs de cette famille, l'influence allostérique positive du calcium sur la fonction des récepteurs mGlu et GABA_B (Pin et al., 2003).

La famille des récepteurs d'adhésion

Indifférenciés par les précédentes classifications, ce groupe semble néanmoins phylogénétiquement distinct du clan sécrétine (Fredriksson and Schioth, 2005) dans lequel étaient classés certains des récepteurs retrouvés ici, le récepteur de la latrotoxine par exemple. Ces récepteurs présentent des répétitions de domaines impliqués dans l'adhésion cellulaire à leur extrémité n-terminale, comme les domaines du type EGF ou muscine ou encore des domaines riches en cystéines. La longueur de leur région terminale extracellulaire peut ainsi varier de 200 à 2800 acides aminés.

La famille des récepteurs frizzled

Les récepteurs Frizzled (Frz) sont au nombre de dix et participent au complexe oligomérique liant les facteurs de croissance de type Wnt. Leur rôle fondamental de modulateur de la polarité, la multiplication ou la mort cellulaire au cours du

développement des métazoaires est illustré par un degré d'identité très élevé (70%). Les récepteurs Frz présentent une extrémité n-terminale de 200 à 300 acides aminés comportant des cystéines très conservées qui semblent impliquées dans l'oligomérisation de ces récepteurs et la liaison à Wnt.

Deux autres types de récepteurs appartiennent également à cette famille : le récepteur smoothed (Smo), impliqué dans la voie de signalisation Hedgehog (Hh) également essentielle au cours du développement, et les récepteurs de type TAS2. Contrairement à ce que laisserait penser leur dénomination, les récepteurs TAS2 ne semblent pas avoir de lien phylogénétique avec les récepteurs TAS1 retrouvés dans la famille des mGluR. Ils seraient impliqués dans la sensibilité à l'amertume.

Les protéines G hétérotrimériques

Malgré le recensement de quelques infidélités avec des récepteurs à activité tyrosine kinase par exemple (Dalle et al., 2001), les protéines G hétérotrimériques (Fig. 2) restent des partenaires de choix des GPCR. A l'issue de la liaison du ligand, la structure tertiaire du récepteur est modifiée. Le récepteur adopte alors un agencement tridimensionnel (conformation) exhibant une affinité supérieure pour une protéine G hétérotrimérique particulière. Ce couplage récepteur-protéine G aboutit à l'activation de cette dernière et à la dissociation de l'hétérotrimère en une sous unité α ($G\alpha$) et un dimère $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) (Neer, 1995). La sous unité α et le complexe $\beta\gamma$ propagent alors le signal en activant à leur tour des effecteurs spécifiques. La convergence fonctionnelle de $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ dans la régulation de nombreux effecteurs comme l'adénylyl cyclase ou les canaux potassiques sensibles aux protéines G (GIRK) (voir référence dans les paragraphes suivants) et les résultats obtenus à l'aide de développements technologiques récents permettant de suivre en temps réel la dynamique du processus d'activation de l'hétérotrimère (Gales et al., 2005) pourraient néanmoins défier cette vision classique du processus

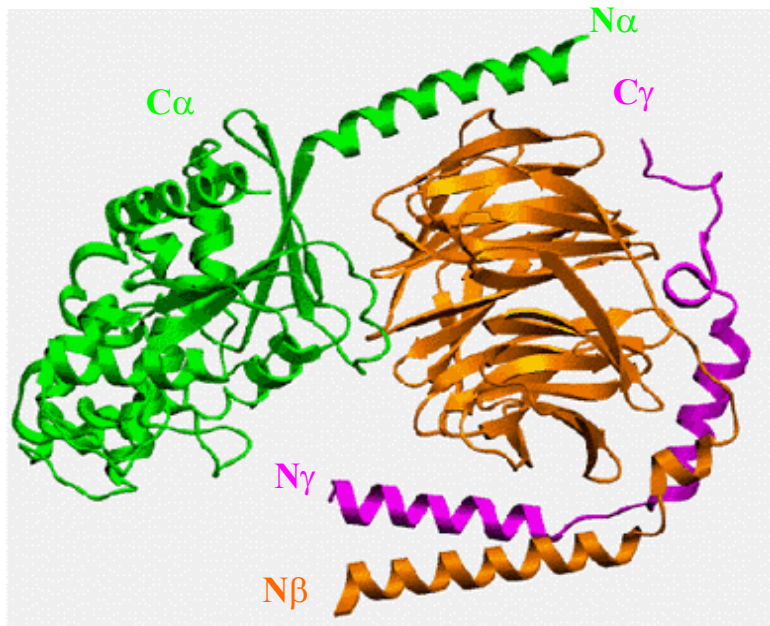


Figure 2. Structure tridimensionnelle du complexe hétérotrimérique $G\alpha_{GDP}-G\beta-G\gamma_1$ (PDB code 1GOT). La sous unité α est représentée en vert et les sous unités β et γ en orange et magenta respectivement.

d'activation des protéines G. L'hypothèse que la protéine G, le récepteur et les effecteurs s'associent en un seul et même complexe protéique ou signalosome (Rebois and Hebert, 2003) pourrait encore renforcer cette idée. Nous reviendrons par la suite sur le détail de ces exemples.

Chez les mammifères, chacune des sous unités, α , β et γ ($G\beta$ et $G\gamma$) présentent plusieurs isoformes. Il existe seize gènes codant des $G\alpha$, cinq pour $G\beta$ et douze pour $G\gamma$ (Gilman, 1987) dont certains sont soumis en outre à de l'épissage alternatif. Tous présentent un niveau de conservation parmi les mammifères approchant une identité parfaite. Selon un calcul combinatoire simple, 960 hétérotrimères différents pourraient exister si chacune des sous unités s'appariait aléatoirement avec les deux autres.

Si cette théorie combinatoire trouve des applications *in vitro*, toutes les combinaisons $G\alpha\beta\gamma$ ne semblent pas efficaces en terme de transduction du signal *in vivo* (Blackmer et al., 2001; Hynes et al., 2004a; Lei et al., 2000; Schmidt et al., 1992; Spring and Neer, 1994). En outre, la composition de l'hétérotrimère influence la spécificité de couplage à la fois envers le récepteur et les effecteurs (Fletcher et al., 1998; Lindorfer et al., 1998).

Quatre familles de sous unités α peuvent être distinguées : α_s/α_{olf} , α_i/α_o , α_q/α_{11} et α_{12}/α_{13} (Gilman, 1987). Toutes présentent un domaine GTPasique régulant la cinétique du cycle activation/inactivation de la protéine G. Leur extrémité c-terminale, notamment les cinq derniers acides aminés, module la spécificité d'interaction avec le récepteur. Il reste néanmoins difficile de définir, avec exactitude, les déterminants moléculaires de la spécificité de couplage entre la protéine G et le récepteur dont le couplage met probablement en jeu un réseau complexe d'interactions impliquant le récepteur et chacune des sous unités α , β et γ (Kisselev et al., 1995a; Kisselev et al., 1995b; McIntire et al., 2001; Taylor et al., 1994; Yasuda et al., 1996).

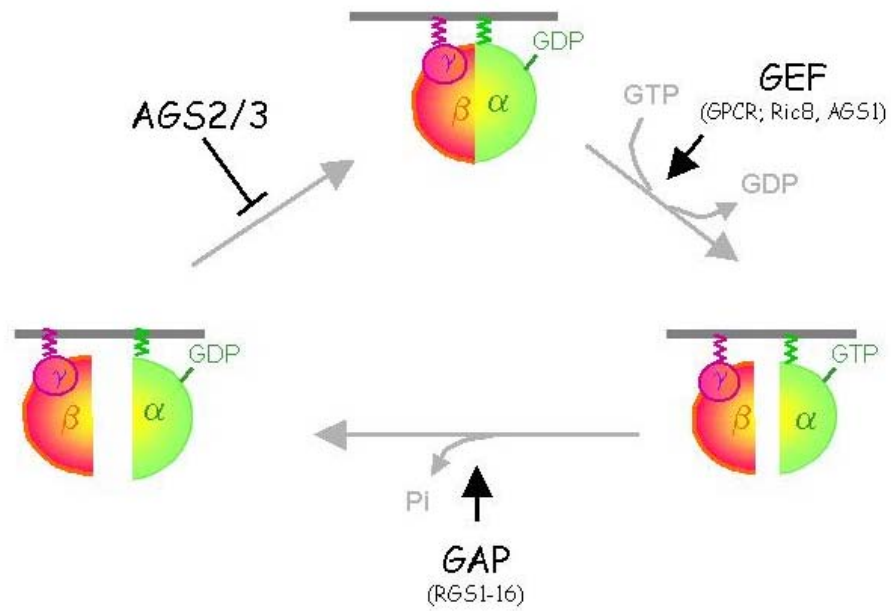


Figure 3. Représentation du cycle d'activation d'une protéine G hétérotrimérique et du rôle activateur ou inhibiteur joué par les différents modulateurs de ce dernier.

GPCR, GEF (GTPase exchange factor, ex: Ric8) ; GAP (GTPase activator factors); RGS (regulator of G protein signaling); AGS (receptor-independant activators of G protein signalling). Figure adaptée de (Lanier, 2004).

Support du couplage aux effecteurs du dimère $G\beta\gamma$, les sous unités $G\beta$ arborent une très haute affinité pour les sous unités γ . L'interaction entre β et γ est stabilisée par une interaction de type superhéliçoïdale ou *coiled coil* (Garritsen et al., 1993). La sous unité $G\beta5$ constitue une exception parmi les sous unités $G\beta$ en liant $G\gamma$ de manière plus labile. La composition du complexe $G\beta\gamma$ semble définir son interaction avec des effecteurs spécifiques (Blackmer et al., 2005).

Le cycle d'activation de $G\alpha$

Toutes les sous unités $G\alpha$ présentent un même cycle d'activation/inactivation (Fig 3). A l'état basal, $G\alpha$ est liée à $G\beta\gamma$ et présente sous cette forme une affinité élevée pour le GDP (guanosine diphosphate). Dans cette conformation inactive, l'interaction entre $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ s'effectue au niveau d'une poche hydrophobe dans le domaine GTPasique. Lorsque le récepteur est activé à l'issue de sa liaison au ligand, il induit un changement structural de $G\alpha$ en interagissant avec sa poche hydrophobe et déplace sa liaison à $G\beta\gamma$ (Lambright et al., 1996). Cet événement entraîne une diminution de l'affinité de la sous unité $G\alpha$ pour le GDP qu'elle libère. Une molécule de GTP, en concentration supérieure dans le milieu par rapport au GDP, est alors échangée. Le GTP clôt la phase d'activation de la sous unité $G\alpha$ en induisant la disparition de la poche de liaison au dimère $G\beta\gamma$ et la potentielle dissociation du trimère (Neer, 1995). Une vision alternative reposant sur un simple changement conformationnel de l'interface entre $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ pourrait également être envisagée dans le contexte où la dissociation physique de ces partenaires n'ait pas lieu comme nous l'avons précédemment évoqué.

L'étape d'inactivation de la protéine G dépend de l'activité GTPasique de la sous unité α . Une fois l'hydrolyse du GTP effectuée, le complexe $\alpha\beta\gamma$ reprend sa conformation initiale et stabilise la liaison du GDP à la sous unité α , complétant ainsi le cycle.

La libération du GDP et la vitesse de l'hydrolyse sont deux étapes limitantes du cycle de la protéine G. Bien que spontanée, la constante de dissociation (k_{off}) du GDP de la sous unité α varie en fonction de la nature de cette dernière (Cabrera-Vera et al.,

2003). Si la stimulation des GPCR ou de la protéine Ric8 ou AGS1 (Lanier, 2004; Willard et al., 2004) vont favoriser la libération du GDP et l'échange avec le GTP (activité GEF), il va par contre être inhibé par $G\beta\gamma$ (Fig 3). Cette capacité du dimère à diminuer la vitesse de dissociation du GDP de la sous unité $G\alpha$, lui confère donc un rôle régulateur essentiel dans le processus d'activation de la protéine G. L'activité GTPasique de la sous unité α est également spontanée et varie considérablement d'un type de sous unité à l'autre. Elle va elle-aussi être soumise à régulation, notamment par les RGS (regulator of G protein signalling) et certaines AGS (receptor-independent activators of G protein signalling) (Fig 3).

Les protéines régulatrices de l'activité GTPasique

Les RGS

La trentaine de protéines appartenant à la famille des RGS ont en commun un domaine spécifique comportant 23 résidus hydrophobes (Ross and Wilkie, 2000). Certaines d'entre elles sont des protéines à multiples domaines arborant à la fois un domaine RGS et des domaines aux fonctions diverses. La protéine RGS12 en est un bon exemple puisqu'elle cumule domaines RGS, PDZ, RBD (domaine de liaison à ras), GoLoco (domaine retrouvé chez certaines protéines AGS) et PTB (domaine de liaison au phosphotyrosine) (Siderovski et al., 1999). La fonction principale attribuée aux protéines comportant un domaine RGS est d'augmenter l'activité ATPasique des protéines G hétérotrimériques (activité GAP). Plus récemment, elles ont également été impliquées dans la régulation directe de différents effecteurs des protéines G, notamment les canaux calciques (Richman et al., 2005; Schiff et al., 2000).

Au contraire des GAP associées aux petites protéines G, telles que les protéines ras, arf ou rho, qui agissent à travers une structure en doigt d'arginine (Sprang, 1997), les RGS stabilisent l'état de transition survenant au cours de l'hydrolyse du GTP (Tesmer et al., 1997a). En accélérant l'activité GTPasique de $G\alpha$, elles diminuent l'activité de signalisation de $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ et permet leur éventuelle réassociation. En plus de leur activité GAP, certaines RGS, RGS1, RGS3, RGS4 et RGS8, ont également la capacité d'accélérer l'échange GDP/GTP au niveau de $G\alpha$ (Doupnik et al., 1997; Saitoh et al., 1997), potentialisant ainsi l'efficacité du signal protéine G

/effecteur. En liant $G\alpha$ au niveau de sa région d'interface avec $G\beta\gamma$, les RGS pourraient aussi stabiliser la forme $G\alpha_{GDP}$ (Tosetti et al., 2002) en entrant en compétition avec $G\beta\gamma$, laissant à celui-ci le loisir d'interagir avec d'éventuels effecteurs.

Les AGS

Découvertes plus récemment (Cismowski et al., 1999; Takesono et al., 1999), ce sont des protéines qui vont activer la protéine G séparément du récepteur. Bien que mises en évidence dans un même test fonctionnel, les AGS ne partagent aucune similarité structurale et leurs mécanismes d'action sont différents (Lanier, 2004). Elles modulent en outre différents types de protéine G. AGS1 promeut la dissociation de $G\alpha$ du complexe $G\beta\gamma$ en induisant l'échange GDP/GTP de $G\alpha_i$. Au contraire, AGS2 et AGS3 stabilisent la forme $G\alpha_{GDP}$ et semble lui conférer une activité indépendante de sa liaison au GTP tout en induisant sa dissociation de $G\beta\gamma$. AGS3 constitue le chef de file d'une famille de protéines exhibant un motif conservé d'environ 25-30 aa, le motif GPR (Takesono et al., 1999), ou GoLoco (Siderovski et al., 1999). Ce motif suffit à inhiber l'étape de libération du GDP de $G\alpha$. Parmi les protéines présentant un motif GoLoco, on retrouve également des protéines RGS (RGS12 et RGS14 par exemple) ainsi que des homologues de AGS3 chez *C. elegans* et la drosophile, GPR1/2 et PINS, essentiels à la polarisation cellulaire lors du développement embryonnaire (Knoblich, 2001; Schaefer et al., 2000).

Les protéines à activité GEF

En dehors des GPCR et de la protéine AGS1 qui modulent la protéine $G\alpha_i$ (Lanier, 2004), la protéine Ric8 constitue le seul autre exemple de protéine présentant une activité GEF vis à vis des protéines G hétérotrimériques. Elle favorise l'échange nucléotidique de $G\alpha_q$, $G\alpha_{i/O}$ et $G\alpha_{12/13}$ (Afshar et al., 2004; Miller et al., 2000; Tall et al., 2003). Contrairement au GPCR, Ric8 interagirait néanmoins préférentiellement avec la forme $G\alpha_{GDP}$ en l'absence de $G\beta\gamma$ et favoriserait, en induisant la libération du GDP, la formation d'un complexe $G\alpha/Ric8$ dépourvue de nucléotide (Tall et al.,

2003) biologiquement actif. Ces résultats suggèrent ainsi que l'espèce $G\alpha_{GTP}$ ne constitue pas la seule population de sous unité α à présenter une activité.

Les effecteurs activés par les protéines G

Longtemps considérées comme les sous unités actives des protéines G, les protéines $G\alpha$ vont, à l'issue de leur activation, directement interagir avec différentes classes d'effecteurs, dont les mieux caractérisés sont les phospholipases C (PLC) et les adénylates cyclases (AC) (Cabrera-Vera et al., 2003). L'activation de la PLC ou de l'AC mène à la production de molécules appelées « second messagers », respectivement les inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG), ou l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ces molécules vont propager et amplifier le signal initié par le récepteur et stimuler à leur tour de nouveaux effecteurs. Les canaux calciques et la protéine kinase C (PKC) sont les principaux effecteurs des IP3 et du DAG tandis que la protéine kinase A (PKA) est la cible principale de l'AMPc. Les sous unités $G\alpha$ vont également moduler l'activité d'autres effecteurs : les phosphodiesterase (PDE), les tyrosines kinases telles que src, la NO synthase (NOS), certaines phospholipase D et A (PLD et PLA), certains régulateurs des petites protéines G (rap1GAP et p115RhoGEF).

La mise en évidence de l'activation d'un canal potassique muscarinique à l'acétylcholine par $G\beta\gamma$ (Logothetis et al., 1987) a constitué la première évidence expérimentale d'un rôle actif de $G\beta\gamma$ en terme de signalisation chez les mammifères. Bien qu'ayant fait l'objet de discussions passionnées, cette idée avait été proposée plus de dix ans auparavant chez la levure sur la base d'expériences génétiques (Mackay and Manney, 1974a; Mackay and Manney, 1974b; Hartwell, 1980). Depuis, le dimère $G\beta\gamma$ s'est vu impliqué dans la régulation de l'activité de nombreux effecteurs protéiques des GPCR : les AC, la PLC, les canaux potassiques rectifiant entrant (Kir) dépendant des protéines G (GIRK) ou sensible à l'ATP (K_{ATP}), les canaux calciques (Cav), les kinases des GPCR (GRK), la protéine kinase D (PKD), la calmoduline, certaines tyrosines kinases (celle de Bruton et la tyrosine kinase Tsk), la protéine Shc, la tubuline, les RGS (dans le cas de la sous unité $G\beta_5$), la phosphatidyl inositol

tris-phosphate (PI3) kinase, récepteur Glycine (Yevenes et al., 2003), canaux K^+ voltage dépendant (Jing et al., 1999)...etc.

La liste détaillée des effecteurs de $G\alpha$ ou du complexe $G\beta\gamma$ a fait l'objet d'excellentes revues de la littérature (Cabrera-Vera et al., 2003; Knall and Johnson, 1998; Pierce et al., 2002; Taussig and Zimmermann, 1998). Dans l'ensemble, ces différents effecteurs sont des cibles pour diverses voies de transduction et constituent en cela de véritables plates-formes d'intégration en terme de signalisation. Cette propriété est merveilleusement illustrée par trois d'entre eux, l'AC, les GIRK et les Cav, qui constituent des effecteurs importants des β_2AR , V_2R et $GABA_BR$.

L'adénylate cyclase

La conservation évolutive de cette enzyme générant l'AMP cyclique (AMPC), retrouvée aussi bien chez l'homme que chez des eucaryotes unicellulaires tels que *Paramecium* ou *Dictyostellium*, reflète l'importance de l'AMPC dans la signalisation cellulaire. Certains pathogènes tels que *Bordetella pertussis* ou *Vibrio cholerae* sécrètent ainsi leur propre AC ou des toxines capable de réguler l'activité des AC afin d'exploiter la dépendance physiologique des mammifères vis à vis de l'AMPC (Cooper, 2003).

La famille des AC compte neuf protéines membranaires et une protéine soluble (Hanoune and Defer, 2001) chez les mammifères. Les AC membranaires comportent deux domaines membranaires constitués de 6TM et deux domaines cytosoliques catalytiques, C1 et C2, au sein desquels on peut distinguer deux régions différentes a et b (C1a/b et C2a/b) (Fig 4). La région d'interface des domaines C1a et C2a constitue le site actif de l'enzyme (Tesmer et al., 1997b) qui catalyse l'attaque du groupement hydroxyle en 3' du ribose de l'adenosine triphosphate et promeut la formation d'une molécule cyclique, l'AMPC. Deux résidus aspartate (D) du domaine C1a (D^{396} et D^{440}) semblent particulièrement important dans la catalyse de cette réaction, notamment en raison de leur capacité à instaurer une liaison de coordination avec un co-facteur de la réaction, le magnésium (Mg^{2+}). Cette liaison de coordination peut également être instaurée avec des molécules aux propriétés similaires à celles du

magnésium, comme les ions Mn^{2+} ou le Ca^{2+} . Le Mn^{2+} va ainsi présenter la capacité de stimuler l'AC (Tesmer et al., 1997b) tandis que le Ca^{2+} va jouer un rôle antagoniste à hautes concentrations en entrant en compétition avec les ions Mg^{2+} (Hu et al., 2002). La sensibilité des AC au magnésium étant variable, la capacité du Ca^{2+} à inhiber leur activité enzymatique va différer en fonction des isoformes.

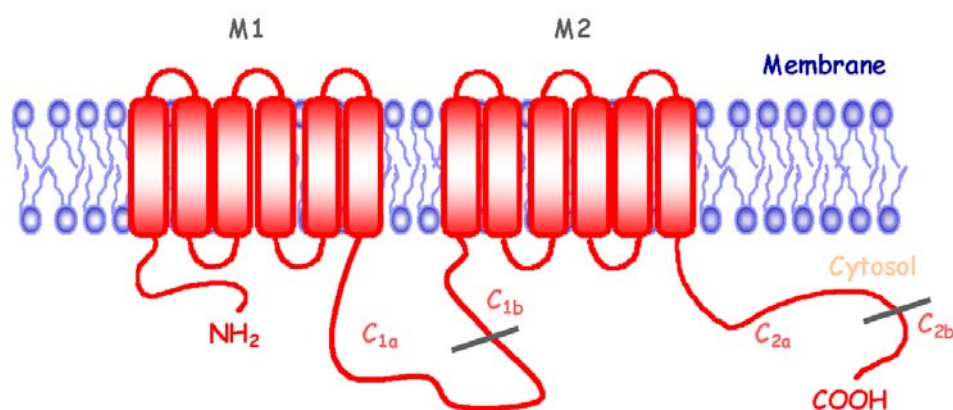


Figure 4. Représentation schématique de la structure proposée des différents isoformes membranaires des adénylyl cyclases.

Les sites M1 et M2 correspondent aux deux domaines membranaires constitués chacun de 6 passages transmembranaires. La localisation cytosolique des sites C1 et C2 formant le site catalytique de l'enzyme est également représentée par rapport à l'ensemble de la protéine.

L'ensemble des isoformes membranaires des AC sont stimulées par leur liaison à la sous unité $G\alpha_s$ liée au GTP et, à l'exception de l'isoforme IX (Premont et al., 1996a) (Yan et al., 1998), toutes sont régulées positivement par le diterpène, forskoline (Fsk) (Sunahara et al., 1997a).

En favorisant l'interaction entre les deux domaines C1a et C2a, $G\alpha_s$ ou la forskoline stabilisent l'état de transition de l'enzyme (Sunahara et al., 1997b; Tesmer et al., 1997b). Au-delà de ces deux régulateurs communs, un nombre important d'autres composants participent à la régulation des AC (Tableau 1).

Leur sensibilité au calcium va notamment permettre de les différencier en quatre groupes principaux : les AC activées par de faibles concentration calcique via leur liaison à la calmoduline (CaM), les AC inhibés par de fortes concentrations de calcium, celles indépendante du calcium et finalement dans le cas de ACIX, celles inhibées par le calcium via la calcineurine.

| Groupe | Isoformes | Expression | Activators | Inhibitors |
|----------|-----------|-------------------------------|---|---|
| Groupe 1 | ACI | Cerveau | $G\alpha_s$, Fsk, Ca^{2+}/CaM | $G\alpha_{i/o}$, $G\beta\gamma$, CaMKIV, inhibiteur site P ^a |
| | ACIII | Epithélium olfactif, pancréas | $G\alpha_s$, Fsk, Ca^{2+}/CaM | CaMKII, inhibiteur site P |
| | ACVIII | Cerveau, pancréas | $G\alpha_s$, Fsk, Ca^{2+}/CaM | inhibiteur site P |
| Groupe 2 | ACII | Cerveau, poumon | $G\alpha_s$, Fsk, $G\beta\gamma$, PKC | inhibiteur site P |
| | ACIV | Ubiquitaire | $G\alpha_s$, Fsk, $G\beta\gamma$ | inhibiteur site P |
| | ACVII | Ubiquitaire | $G\alpha_s$, Fsk, $G\beta\gamma$, PKC | inhibiteur site P |
| Groupe 3 | ACV | Cœur, striatum | $G\alpha_s$, Fsk, PKC | $G\alpha_i$, Ca^{2+} , PKA, inhibiteur site P, $G\beta\gamma$ |
| | ACVI | Cœur, reins, ubiquitaire | $G\alpha_s$, Fsk | $G\alpha_i$, Ca^{2+} , PKA, PKC, inhibiteur site P |
| Groupe 4 | IX | Corps pituitaire, ubiquitaire | $G\alpha_s$ | Calcineurin, inhibiteur site P |

Tableau 1. Expression et régulation de chacun des isoformes de la famille des adényl cyclases

(Tableau réalisé à partir des revues de littérature de Couper DMF 2003 Biochem. J et Patel TB 2001 Gene). a Inhibiteur site P : dérivés de l'adénosine 3' polyphosphates qui inhibe l'AC selon un mécanisme terminal non compétitif. Adapté de (Cooper, 2003).

Le cristal obtenu entre la sous unité $G\alpha_s$ et le site catalytique de l'AC a permis de définir le site de liaison principal de $G\alpha_s$ au niveau du domaine C2a (Tesmer et al., 1997b) de l'AC. La région C1b pourrait également être importante à la liaison de $G\alpha_s$ en constituant un site de plus basse affinité (Chen et al., 1997) pour la protéine G, potentiellement important en terme de régulation. En effet, la phosphorylation par PKA du domaine C1b de l'ACVI inhibe la stimulation de l'enzyme dépendante de haute concentration de $G\alpha_s$. Confirmant l'importance de la région C1b dans le processus d'activation de l'AC, ce domaine semble participer à la liaison de la calmoduline (CaM) à l'ACI (Vorherr et al., 1993) qui activerait cette dernière en désinhibant son site catalytique. Comme dans le cas de $G\alpha_s$, les domaines C1b/C2 forment un des sites de liaison important pour l'inhibition de l'ACI par $G\beta\gamma$, son autre site de liaison étant constitué par le domaine C1a (Wittpoth et al., 1999). Finalement, l'effet inhibiteur de $G\alpha_i$ sur les ACI, V et VI, proviendrait de sa capacité à lier le domaine C1a, induisant la diminution de la stabilité de l'état de transition de

l'enzyme ou alternativement la stabilisation d'un état inactif de cette dernière (Tesmer et al., 1997b).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les AGS et les RGS régulent l'activité des sous unités $G\alpha_{i/q}$ en modulant différentes étapes de leur cycle d'activation/inactivation : la stabilité de la forme $G\alpha_{GDP}$, l'échange GDP/GTP, ou encore l'hydrolyse du GTP. Les effecteurs des protéines G, la PLC β (Berstein et al., 1992) ou la guanosine monophosphate cyclique (GMPC)-phosphodiesterase (PDE) par exemple (Arshavsky and Bownds, 1992), ont également été impliqués dans la modulation de ce cycle, en favorisant l'activité GTPasique de $G\alpha_q$ ou $G\alpha_t$ respectivement. Dans le cas de $G\alpha_s$ pour laquelle une seule RGS a été mise en évidence jusqu'à présent (Zheng et al., 2001), une activité GAP de l'AC a également été montrée (Scholich et al., 1999). Ces auteurs démontrent en outre que l'AC potentialise l'activité GEF du récepteur vis à vis de $G\alpha_s$ et favorise ainsi l'initiation de son activation par le récepteur (Scholich et al., 1999). Cette activité GEF/GAP qui rappelle celle observée pour certaines RGS (Doupnik et al., 1997; Saitoh et al., 1997), augmente de 100 fois, la capacité du récepteur à activer l'AC (Scholich et al., 1999). Cette fonction GAP de l'AC pourrait ainsi amplifier le signal dans des conditions de basse concentration de ligand ou de récepteur dans une conformation active (Patel et al., 2001). En inférant l'existence d'un complexe récepteur-protéine G-cyclase au moment de l'activation, ces résultats supportent l'idée proposée dès le début des années 80 par le groupe de Levitski (Tolkovsky et al., 1982) concernant l'incorporation des ces acteurs au sein de mégacomplexes définis par la suite sous le terme de signalosome (Rebois and Hebert, 2003).

Finalement, les protéines RGS pourraient moduler directement l'activité cyclase à défaut de réguler Gs. La protéine RGS2 a dernièrement été impliquée dans la régulation des ACIII, ACV et ACVI (Salim et al., 2003; Sinnarajah et al., 2001). Dans le cas de l'ACV, l'interaction directe entre RGS2 et l'enzyme s'effectue entre le domaine n-terminal de RGS2 et le domaine C1 de ACV (Salim et al., 2003). Ce mécanisme permettrait à RGS2 d'atténuer la signalisation associée à la protéine G_s , mais indépendamment de son activité GAP.

L'exemple des GIRK et des K_{ATP}

Canaux sélectifs du potassium, les GIRK ont pour rôle physiologique de maintenir le potentiel membranaire basal et l'excitabilité des cellules neurales, cardiaques ou endocrines. Ils vont être stimulés en réponse à l'activation de différents récepteurs tels que les récepteurs muscariniques, cholinergiques, $GABA_B$, opioïdes, adénosines, somatostatines ainsi que ceux répondant à la neurotensine ou à la substance P (Jan and Jan, 1997). Ils forment une des sept sous-familles des canaux potassiques rectifiant entrant (Kir), la sous-famille Kir3.0 qui comprend quatre sous unités GIRK (Kir3.1, Kir3.2, Kir3.3 et Kir3.4) (Doupnik et al., 1995) Les canaux GIRK cardiaques et hypophysaires semblent essentiellement constitués des sous unités Kir3.1 et Kir3.4, tandis que la nature des canaux GIRK neuronaux est plus variable (Mark and Herlitze, 2000).

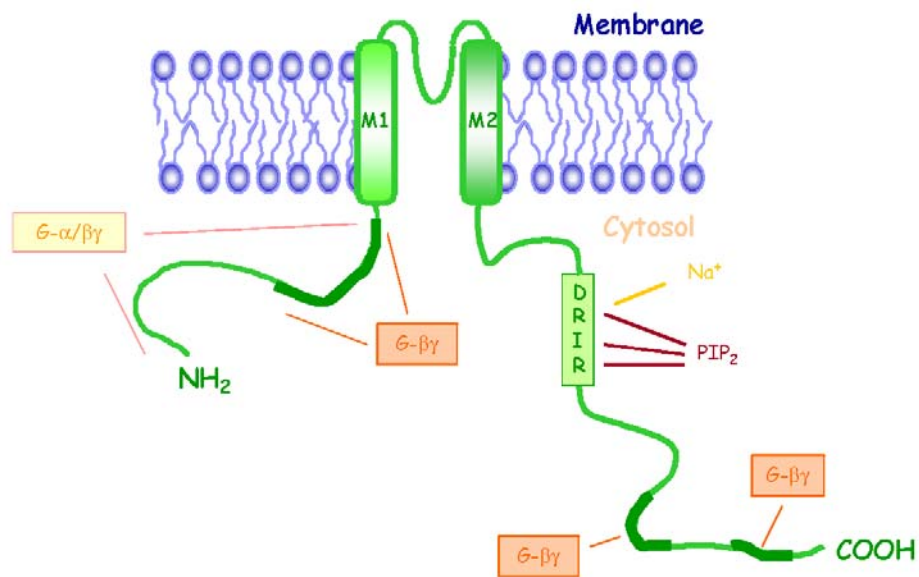


Figure 5. Représentation schématique d'un Kir3.0 et de la localisation de ses interactions avec divers modulateurs.

Exprimés à de faibles densités (10 canaux / μm^2) en comparaison à d'autres canaux ioniques (le récepteur nicotinique est présent à environ 10000 canaux / μm^2) (Corey et al., 1998), les canaux GIRK sont classiquement constitués de quatre sous unités Kir3.0, généralement différentes.

Étudié par Otto Loewi dès 1921, le mécanisme menant à l'activation des GIRK a fait l'objet d'une longue controverse initiée en 1987 par Logothetis et *al.* (Logothetis et al., 1987). En suggérant que $G\beta\gamma$, et non $G\alpha$, soit suffisant à l'activation des GIRK, ces auteurs conféraient pour la première fois à $G\beta\gamma$ un rôle actif dans la signalisation dépendante des GPCR chez les mammifères. Depuis, l'interaction fonctionnelle de $G\beta\gamma$ et des GIRK a été confirmée à plusieurs reprises (Dascal et al., 1993; Kubo et al., 1993) et leur liaison directe a été localisée au niveau des extrémités n- et c-terminales de chacune des sous unités du canal (Huang et al., 1995; Kunkel and Peralta, 1995)(Fig 5). La délétion de l'extrémité n-terminale ou sa substitution avec la portion équivalente d'un canal Kir insensible au protéine G abolit la sensibilité du canal GIRK à $G\beta\gamma$ (Huang et al., 1995). L'affinité de $G\beta\gamma$ pour le domaine c-terminal des Kir3.0, supérieure à celle qu'il exhibe pour la région n-terminale, est également considérablement altérée par une mutation ponctuelle au niveau de la leucine 339 du Kir3.4 (He et al., 1999; He et al., 2002). Tous ensemble, ces résultats soutiennent l'hypothèse que $G\beta\gamma$ est la composante fonctionnelle de l'activation des canaux potassiques dépendante des protéines G. Si $G\beta\gamma$ est impliqué dans la régulation de l'activation GIRK stimulée par les GPCR, il serait également très important pour l'activité basale de ces canaux. Cette activité basale serait ainsi proportionnelle au niveau de $G\beta\gamma$ libre dans la cellule (Rishal et al., 2005).

La cinétique d'activation et de désactivation d'un canal potassique correspond au temps nécessaire à l'initiation et à la terminaison du courant post-synaptique lent dans les neurones ou les myocytes. Dans ces dernières, une fois le ligand retiré du milieu, le temps de désactivation du canal est de 0.5 s. En système reconstitué, le temps de désactivation des GIRK peut atteindre 2 min, valeur similaire à la vitesse de l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine G. Doupnik et al. (Doupnik et al., 1997) ont mis en évidence que les RGS1, RGS3 et RGS4 étaient en mesure de

compenser cette différence en augmentant la vitesse de désactivation du canal par deux ordres de grandeur. Leur action résiderait dans l'augmentation de la vitesse de l'échange GDP/GTP et de d'hydrolyse du GTP par $G\alpha$, alliant ainsi à leur activité classique de GAP, une activité de GEF (Dounnik et al., 1997). Dans ces circonstances, $G\alpha$, qui lie l'extrémité n-terminale des Kir3.0 probablement par l'intermédiaire de sa liaison à $G\beta\gamma$ (Huang et al., 1995), aurait un rôle de régulation de la spécificité et de la durée de l'interaction entre $G\beta\gamma$ et Kir3.0 mais aussi de la vitesse du cycle activation/désactivation du canal (Mark and Herlitze, 2000).

Le dimère $G\beta\gamma$ participe également au processus de régulation d'autres canaux potassiques, les canaux rectifiant entrant dépendant de l'ATP (K_{ATP}). Dans ce cas, le mécanisme moléculaire supportant l'action de $G\beta\gamma$ semble très différent de celui observé dans le cas des GIRK. Les K_{ATP} , important dans la régulation de la libération d'insuline et du tonus vasculaire (Jan and Jan, 1997), sont constitués de deux sous unités : l'une de type Kir, par exemple Kir6.2, qui est insensible aux protéines G; l'autre correspondant au récepteur de type 1 ou 2 aux molécules d'urée sulfonée (SUR1 ou SUR2). Les récepteurs SUR font partie de la famille des transporteurs de type ABC et comprend un domaine de liaison à l'ATP (NBD) caractérisé par la présence de deux motifs conservés, les motifs Walker A et Walker B (Walker et al., 1982). C'est ce domaine qui confère la sensibilité du canal K_{ATP} à la concentration cellulaire en ATP. En présence d'ATP, la sous unité SUR diminue la probabilité d'ouverture du canal. En liant directement la sous unité SUR, $G\beta\gamma$ leverait cet effet inhibiteur, permettant ainsi l'ouverture de la sous unité Kir6.2 (Wada et al., 2000). De manière intéressante, $G\beta\gamma$ lie SUR au niveau d'une arginine conservée dans les domaines NBD à proximité du motif Walker A. Cette liaison pourrait ainsi modifier les propriétés de liaison du domaine NBD à l'ATP, inhibant par la même l'effet du nucléotide sur l'activité du canal potassique (Wada et al., 2000). Les domaines de liaison à l'ATP étant relativement bien conservés, $G\beta\gamma$ pourrait réguler l'activité d'autres ATPases selon un mécanisme similaire. Nous verrons que cette hypothèse

pourrait être d'intérêt dans le cas du contrôle de l'interaction entre la AAA (*ATPase associated to various cellular activities*) ATPase, NSF et le récepteur GABA_B.

L'exemple des canaux calciques dépendant du voltage (Ca_v)

L'activité des canaux calciques voltage dépendant, est également dépendante de l'activité de certains GPCR, selon différents mécanismes : l'action directe de la protéine G au niveau de l'activité du canal ou une action indirecte par l'intermédiaire de la stimulation de boucles de rétrocontrôle impliquant des kinases, PKA, PKC ou src par exemple (Catterall, 2000; Schiff et al., 2000; Zamponi et al., 1997). Si ce dernier mode de régulation est commun à tous les types de canaux calciques, seuls les canaux de types Ca_v2.0 peuvent être modulés directement par les protéines G. C'est ce dernier mode de régulation qui va nous intéresser tout particulièrement ici. Trois types de canaux Ca_v2.0 se distinguent : N, P/Q et R. Le manque d'outils pharmacologiques a considérablement limité l'étude des canaux de types R jusqu'à présent. Par contre, la sensibilité caractéristique des canaux N et P/Q à l' ω -CTx-GVIA et à l'agatoxine, respectivement, a permis d'impliquer ces canaux dans le processus de régulation de la libération des neurotransmetteurs dans le système nerveux central. La modulation par le récepteur GABA_B de l'exocytose des neurotransmetteurs va ainsi être médiée dans certains cas, par ces canaux particuliers. Deux éléments caractérisent l'action des protéines G au niveau des Cav₂ : elle est indépendante de facteurs solubles et est levée par une forte dépolarisation membranaire. En augmentant le seuil d'activation du canal vers des potentiels membranaires positifs, la protéine G ralentit la vitesse d'activation du canal en stabilisant un état « réfractaire » ou inactif de ce dernier.

Comme dans le cas des GIRK, l'interaction directe du dimère G $\beta\gamma$ et de la sous unité constituant le pore principal du canal, α_1 , semble essentielle à l'inhibition des Ca_v2.0 (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996). L'injection de G $\beta\gamma$ purifiée dans des neurones des ganglions sympathiques favorise ainsi l'inhibition des canaux N par la norépinéphrine (Garcia et al., 1998). La nature de G γ utilisé dans de telles conditions semble déterminer l'efficacité du dimère G $\beta\gamma$ (Blackmer et al., 2005). Le groupement géranyl-géranyl modifiant G γ_2 semblerait plus efficace que la

farnésylation de $G\gamma_1$ à localiser $G\beta\gamma$ à proximité du canal. Contrairement à l'expression exogène de $G\beta$ qui suffit à induire l'inhibition des courants calciques, $G\gamma$ reste cependant inactif par lui-même. Le rôle actif de $G\beta$ dans le processus d'inhibition des canaux calciques est corrélée par l'importance de la nature de la sous unité considérée, $G\beta_1$ et $G\beta_2$ étant plus efficaces que les sous unités $G\beta_{3-5}$ (Garcia et al., 1998).

Initialement, la liaison de $G\beta\gamma$ aux $Ca_v2.0$ (Fig 6) a été circonscrite au niveau de la boucle connectant les domaines I et II (I-II) de la sous unité α_1 du canal (Bichet et al., 2000; De Waard et al., 1997; Herlitze et al., 1997; Zamponi et al., 1997). Cette région contient une séquence QXXER retrouvée également au niveau de l'AC et des GIRK (Chen et al., 1995) et constitue la cible d'autres régulateurs important de l'activité des $Ca_v2.0$: la sous unité β du canal qui régule à la fois les propriétés électrophysiologiques du pore α_1 et son transport vers des domaines précis de la membrane pré-synaptique (Bichet et al., 2000; Hanlon et al., 1999); PKC qui en phosphorylant le pore favorise son ouverture (Zamponi et al., 1997). Point de convergence de différentes voies de signalisation, la région I-II est donc importante dans la régulation de l'activité des $Ca_v2.0$. Des résultats ultérieurs ont néanmoins souligné l'importance d'autres domaines de α_1 dans son lien à $G\beta\gamma$, notamment ses régions N et C terminales cytosoliques (Catterall, 2000), complexifiant ainsi le modèle d'action de $G\beta\gamma$.

La complexité de l'action de $G\beta\gamma$ est particulièrement bien illustrée par le fait que le clivage de la syntaxin 1 (STX1) par la toxine botulique prévient la régulation des canaux de type N par $G\beta\gamma$. Ces résultats révèlent ainsi la connection fonctionnelle étroite de deux régulateurs important des canaux calciques, les protéines G et la machinerie moléculaire supportant l'exocytose des neurotransmetteurs (Catterall, 2000).

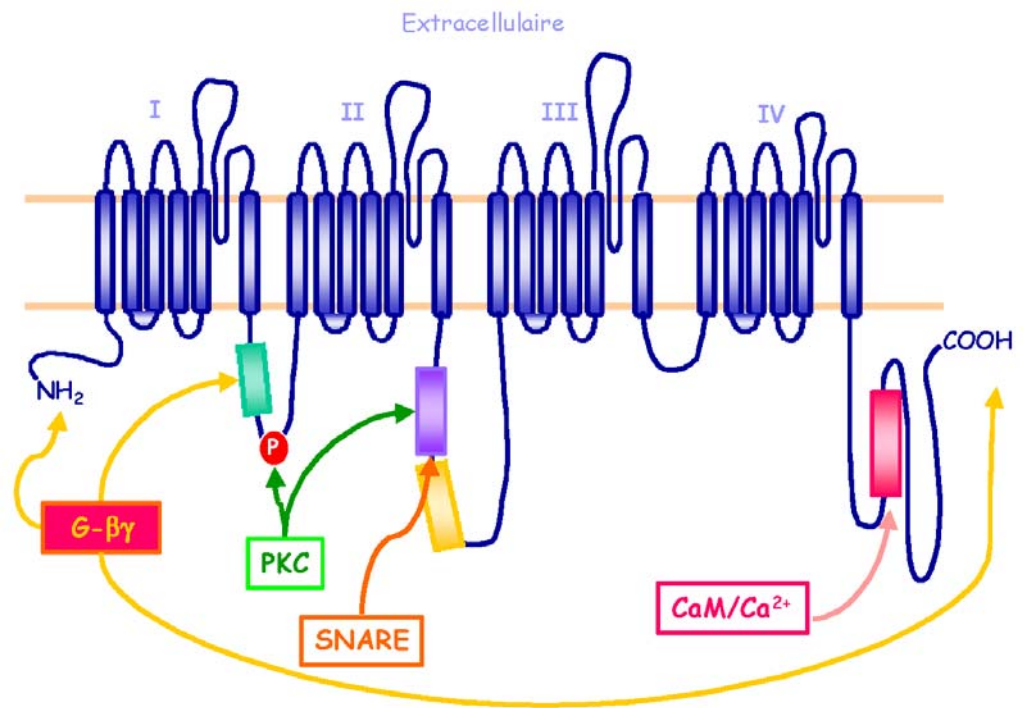


Figure 6. Représentation de la sous unité α d'un canal Cav2.0 et du site d'action des différents modulateurs de cette dernière

Classiquement, les STX participent au phénomène de fusion membranaire (Fig. 23), ultime étape de tout transport membranaire dans les cellules. Au cours de l'exocytose des neurotransmetteurs, STX1 va s'associer à deux autres protéines, SNAP-25 et VAMP, par l'intermédiaire de liaison de type superhélicoïdale ou *coiled coil* afin de rapprocher spécifiquement la membrane vésiculaire (contenant VAMP) de la membrane plasmique (contenant SNAP25 et STX1A) et favoriser la fusion membranaire. L'exocytose est étroitement dépendante de la concentration calcique intracellulaire (Fig 24). L'ancrage des vésicules contenant les neurotransmetteurs à proximité des canaux calciques, lieu de pénétration dans la cellule des ions calcium permettrait ainsi une conjugaison efficace de l'augmentation de la concentration calcique à la libération des neurotransmetteurs. En plus de réguler le mécanisme de fusion, STX1A et SNAP25 participent non seulement à l'ancrage de la vésicule au canal, mais aussi à la régulation de l'activité du canal et ce de deux manières : 1) en modulant le transport et la localisation membranaire du canal, 2) en inhibant l'activation du canal (Blackmer et al., 2001; Blackmer et al., 2005; Dolphin, 2003; Herlitze et al., 1997; Jarvis and Zamponi, 2001; Spafford and Zamponi, 2003; Zamponi, Bourinet, et al. 1997). L'interaction directe de $G\beta\gamma$ et de différents partenaires du complexe de la fusion membranaire, notamment STX1A (Jarvis et al., 2000; Jarvis and Zamponi, 2001) suggèrent ainsi une action couplée des protéines G et des protéines de fusion dans la régulation de l'activité du canal.

Finalement, en plus de moduler l'activité électrophysiologique du canal calcique, l'interaction entre $G\beta\gamma$ et la machinerie de fusion pourrait également avoir pour fonction de réguler le phénomène d'exocytose (Blackmer et al., 2001; Blackmer et al., 2005; Silinsky, 2004) en aval de ce dernier. L'activité de différents récepteurs tels que les récepteurs $GABA_B$ et adenosine, a été impliquée dans la modulation directe de l'exocytose des vésicules synaptiques (Wu and Saggau, 1997). Il n'est cependant pas clair si leur action se résume à moduler la conformation du dimère $G\beta\gamma$ ou si elle est plus directe.

Les protéines régulatrices de l'activité des GPCR

Les cellules ont développé des solutions relativement diversifiées afin d'assurer un contrôle précis du transfert d'information. La modulation de l'activité des protéines G par les protéines RGS, GEF, AGS en est un exemple et illustre le niveau de sophistication du contrôle qui peut être établi à chaque relais du signal : récepteur, protéine G ou effecteurs. Des protéines aux fonctions diverses vont participer à ces mécanismes de régulation. Schématiquement, leur action va se limiter à promouvoir ou défavoriser l'interaction du récepteur et de ses partenaires. Les protéines d'échafaudage font parties des protéines favorisant l'interaction entre les différents partenaires d'une cascade de transduction spécifique. En reliant simultanément chacun d'entre eux, elles vont stabiliser les complexes de signalisation et augmenter l'efficacité et la spécificité du signal. Les cas de InaD (Scott and Zuker, 1998) pour la rhodopsine, NHERF (Na⁺/H⁺ exchange channel regulating factor) dans le cas du récepteur β 2AR (Cao et al., 1999; Hall et al., 1998), Homer (Husi et al., 2000) et PICK-1 (Protein interacting with the C kinase 1) (Perroy et al., 2002) dans celui des récepteurs mGluR, illustrent bien cette idée. Parmi les protéines défavorisant le couplage du récepteur à ses partenaires et induisant une atténuation de la transmission du signal en provenance de ce dernier, on retrouve entre autres, les protéines kinases activées par des seconds messagers tels que l'AMPC ou le calcium et le diacylglycérol (DAG) (PKA et PKC respectivement), ainsi que les kinases plus spécifiques des GPCR, les GRK. En phosphorylant récepteurs, protéines G, effecteurs et protéines modulatrices, ces protéines kinases contrôlent la nature des interfaces protéiques et les interactions qui y correspondent. Elles vont ainsi tout à la fois, stimuler l'initiation de certaines voies de signalisation et constituer des pierres angulaires des mécanismes de rétrocontrôles assurant l'atténuation et la terminaison du signal initié par un récepteur donné. Ce mécanisme de désensibilisation spécifique d'un récepteur donné est dit homologue. Il peut également s'étendre à d'autres récepteurs et avoir des conséquences plus larges sur l'ensemble de la signalisation cellulaire, dites hétérologues, par l'intermédiaire de protéines kinases comme PKA ou PKC, aux multiples cibles potentielles. Autre protéine défavorisant l'interaction entre le récepteur et la protéine G, la β arrestine (β arr). En plus d'interférer stériquement dans

le couplage du récepteur à sa protéine G à l'issue de sa phosphorylation par les GRK, elle est également impliquée dans la régulation de la localisation du récepteur à la surface cellulaire et de son internalisation. Outre son rôle dans le transport membranaire des récepteurs, la β arrestine présente une activité d'échafaudage en arborant la capacité de lier de multiples partenaires autres que les seuls GPCR (Lefkowitz and Shenoy, 2005; Luttrell and Luttrell, 2004).

PKA et PKC

Activées toutes deux par des seconds messagers majeurs de la signalisation cellulaire, l'AMPC dans le cas de PKA et le calcium et le DAG dans le cas de PKC, ces kinases sont impliquées dans la régulation de nombreux aspects de la biologie cellulaire incluant la croissance, la différenciation, la motilité et la mort cellulaire. Cette importance est reflétée par la longue liste de protéines arborant une séquence de reconnaissance consensus pour l'une ou l'autre de ces kinases (R/K-R/x-x-S/T dans le cas de PKA; S/T-x-K/R dans le cas de PKC), et ce sans exclusivité. A titre d'exemple, chacun des récepteurs β 2AR et GABA_BR présente des motifs de phosphorylation pour ces deux kinases (Fig 27 et 29).

A l'état inactif, PKA est une holoenzyme tétramérique formée de l'association de deux domaines régulateurs constitutivement dimériques et de deux domaines catalytiques. La liaison de l'AMPC aux sous unités régulatrices initie la dissociation du complexe et l'activation de l'enzyme. La phosphorylation des unités régulatrices de type II par les unités catalytiques prolonge la durée de l'activation de ces PKA par rapport au PKA de type I (Tasken and Aandahl, 2004).

L'inactivation de PKC à l'état basal repose par contre sur un mécanisme intramoléculaire. Son activation dépendante de la production de DAG à l'issue de la dégradation de phosphatidyl inositol par la PLC est fortement stimulée en présence de Ca²⁺ et de phosphatidylsérine (PS) dans le cas des PKC conventionnelles (isotypes cPKC α , β _I, β _{II} et certaines cPKC δ) (Nakashima, 2002). D'autres types de PKC (PKC nouvelles : nPKC δ , ϵ , η et certaines nPKC θ) sont insensibles au calcium, voire au DAG (PKC atypiques : aPKC ζ , λ /i) (Ohno and Nishizuka, 2002).

Malgré leurs différences structurelles et fonctionnelles, PKA et PKC partagent une même dépendance vis à vis de la stabilité et la spécificité de leur association membranaire. Incapables d'une association membranaire stable, elles lient des protéines d'ancrage, AKAP (*A Kinase Anchoring Protein*) dans le cas de la PKA et RACK (*Receptor for activated C Kinase*) dans le cas de la PKC. De manière intéressante certaines AKAP, AKAP250 (Gravin), lient simultanément PKA et PKC à d'autres protéines (Lin et al., 2000), jouant un rôle d'échafaudage présentant des propriétés similaires à celui par exemple de InaD ou de PICK1 (Perroy et al., 2002; Scott and Zuker, 1998). L'existence de tels complexes permet ainsi d'imaginer comment l'extrême compartimentation des voies de signalisation est assurée et ce, jusque dans leur régulation (Steinberg and Brunton, 2001). Elle illustre également comment le rôle de plate-forme d'intégration joué par de nombreux effecteurs, tels que les AC ou les canaux calcique par exemple, peut être précisément orchestré (Catterall, 2000; Cooper, 2003; Tasken and Aandahl, 2004).

En phosphorylant les différents partenaires d'une cascade de signalisation [PKC régule également l'activité des protéines G (Ferguson, 2001)], PKA et PKC participent à la fois à des mécanismes de désensibilisation homologues et hétérologues.

GRK

Recrutées à l'issue de l'activation du récepteur, l'action de ces kinases est par définition circonscrite à des phénomènes de désensibilisation homologue. La famille des GRK comprend sept membres différents regroupés en trois sous familles en fonction de leur homologie de séquence: 1) GRK1 et GRK7 (Shichi and Somers, 1978; Weiss et al., 1998); 2) GRK2 (aussi désignée sous le terme de β ARK1 pour β AR kinase 1) (Benovic et al., 1986) et GRK3 (β ARK2) (Benovic et al., 1991); 3) GRK4 (Premont et al., 1996b; Sallese et al., 1994), GRK5 (Kunapuli et al., 1994; Premont et al., 1994; Sallese et al., 1994) et GRK6 (Benovic and Gomez, 1993). Toutes arborent un domaine homologue au RGS dans leur extrémité n-terminale (Carman et al., 1999) et un domaine catalytique central (Fig 7). Elles diffèrent essentiellement par leur extrémité c-terminale, alternativement modifiée par des

groupements lipidiques (acylation ou farnésylation) ou présentant un domaine de liaison au complexe $G\beta\gamma$ (Stoffel et al., 1994).

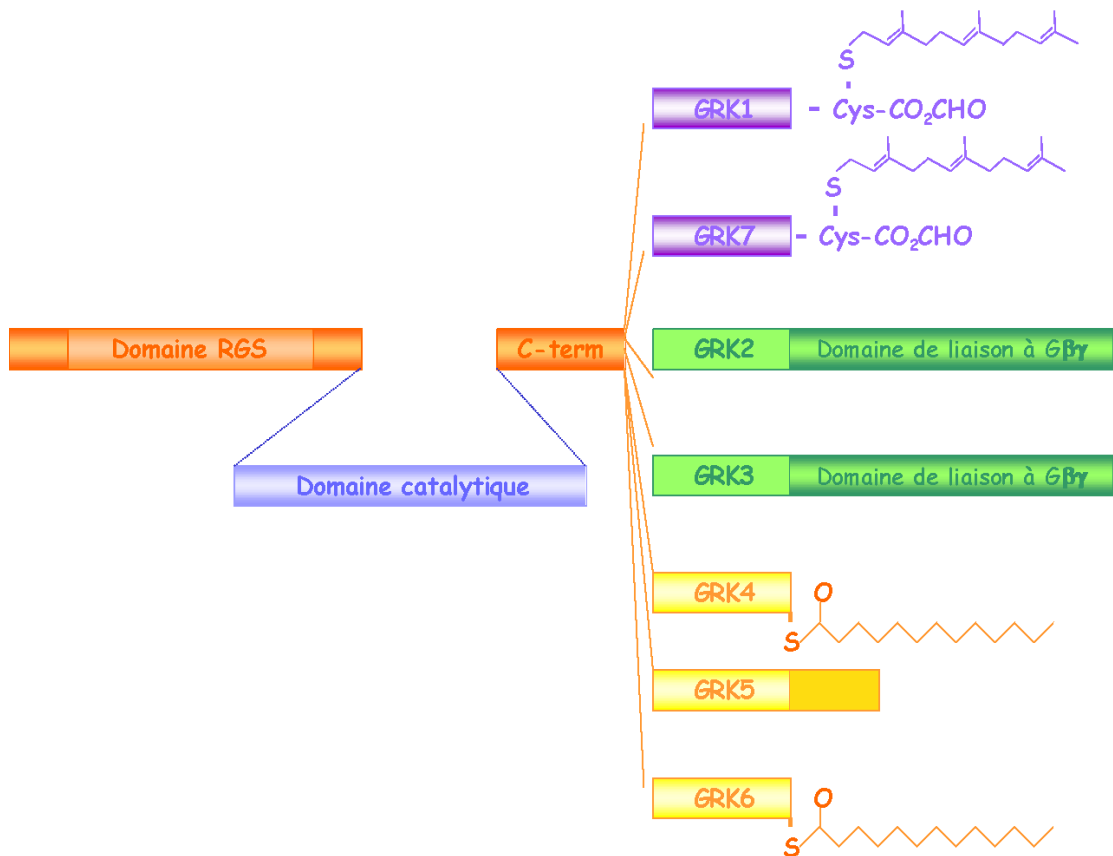


Figure 7. Représentation schématique des différentes protéines de la famille GRK (GRK1-GRK7).

Toutes partagent un même domaine RGS n-terminal ainsi qu'un domaine catalytique central. Elles se distinguent néanmoins par leur domaine c-terminal qui va définir leurs propriétés d'association aux membranes. GRK1 et GRK7 vont être farnésylées au niveau d'un motif CAAX. GRK2 et GRK3 vont quant à elles présenter un domaine d'homologie à la plextrine. GRK5 présente une séquence riche en résidus basiques lui conférant une affinité pour les phospholipides. Finalement GRK4 et GRK6 vont être palmitylées au niveau de résidus cystéines (Figure adaptée de (Ferguson, 2001)).

Certaines GRK résident dans le cytosol à l'état inactif, tandis que d'autres sont constitutivement associées aux membranes par l'intermédiaire de leur modification lipidique (Qanbar and Bouvier, 2003).

En phosphorylant le récepteur activé, elles favorisent son couplage à la β arr (Oakley et al., 2001) et son découplage subséquent de la protéine G. En addition à leur rôle de kinase, les GRK pourraient présenter une activité RGS et moduler le signal induit par certains récepteurs indépendamment de la phosphorylation du récepteur (Carman et al., 1999; Perroy et al., 2003). Par exemple, GRK4 est impliquée dans la désensibilisation du récepteur GABA_B dans les neurones de cervelet de manière apparemment indépendante de son activité kinase (Perroy et al., 2003). Cette absence de phosphorylation du GABA_BR lors de sa désensibilisation est en outre corrélée avec l'absence de recrutement de la β arrestine. Ces résultats sont ainsi consistants avec l'idée que l'affinité de la β arr pour un récepteur est déterminée par le degré de phosphorylation de ce derniers (Oakley et al., 2001). Les récepteurs modulés indépendamment de la phosphorylation par les GRK pourraient donc échapper au schéma classique de désensibilisation impliquant le recrutement de la β arr.

La régulation de leur expression (Perroy et al., 2003) ou encore de leur préférence vis à vis de récepteurs particuliers (Sorensen and Conn, 2003) semblaient jusqu'à tout récemment, être déterminants pour l'implication différentielle des GRK dans les processus de désensibilisation. Néanmoins, une spécificité au niveau de la nature des voies de signalisation que ces protéines kinases régulent, a été proposée (Carman et al., 1999; Kim et al., 2005a; Ren et al., 2005). Si les protéines GRK2 et GRK3 modulent préférentiellement les événements de phosphorylation, de recrutement de la β arr et d'endocytose des récepteurs activés, les protéines GRK5 et GRK6 contrôleraient plus particulièrement la stimulation des voies MAPK par la β arrestine à l'issue de son recrutement au récepteur (Kim et al., 2005a; Ren et al., 2005).

β arrestine

La dynamique de son recrutement

L'arrestine visuelle (arr1) a initialement été découverte à travers son rôle dans la désensibilisation de la rhodopsine (Pfister C 1985 Science). Depuis, trois protéines homologues, la β arr1 (arr2) (Lohse et al., 1990), la β arr2 (arr3 (Attramadal et al., 1992) et une seconde arrestine visuelle, arr4 ou X-arr (Murakami et al., 1993; Craft et al., 1994), ont été mises en évidence. Comme leur nom le suggère, les arrestines visuelles sont spécifiquement exprimées au niveau des photorécepteurs, tandis que β arr1 et β arr2 semblent ubiquitaires. Essentielles au mécanisme classique de désensibilisation des GPCR, les arrestines interfèrent stériquement au niveau de l'interface récepteur/protéine G à l'issue de leur recrutement par le récepteur activé. Ce faisant, elles induisent la désensibilisation fonctionnelle du récepteur. La cristallisation des arr1 (Hirsch et al., 1999) et arr2 (Han et al., 2001) a conduit à l'établissement d'un modèle décrivant le mécanisme de recrutement de ces protéines du cytosol vers le récepteur membranaire activé (Gurevich and Gurevich, 2003) (Gurevich and Gurevich, 2004; Vishnivetskiy et al., 1999). Evènement séquentiel, cette translocation implique différents sites de l'arrestine. L'interaction initiale entre l'arrestine et le récepteur activé mettrait en jeu des résidus polaires pointant au niveau des surfaces concaves de chacun des domaines en brin beta de la protéine (Fig 8). Les résidus K^{14/15} de l'arr1 (Gurevich and Gurevich, 2004), très conservés chez chacune des quatre arrestines ((Nakagawa et al., 2002), en feraient partie. L'arrestine exhibe néanmoins une faible affinité pour le récepteur activé et c'est la phosphorylation de ce dernier par les GRK qui favorise le passage de l'arrestine dans un état de haute affinité pour le récepteur. Ce changement conformationnel impliquerait le démantèlement d'un réseau de liaisons ioniques entre cinq résidus (D^{30/296/303} et R^{175/382}), enfouis à proximité de la zone charnière des domaines N et C de l'arrestine (Fig 8). En déstructurant ce réseau de résidus polaires, « *polar core* », les résidus phosphorylés du récepteur favoriseraient une conformation de l'arrestine exhibant une affinité supérieure vis à vis du récepteur (Vishnivetskiy et al., 1999).

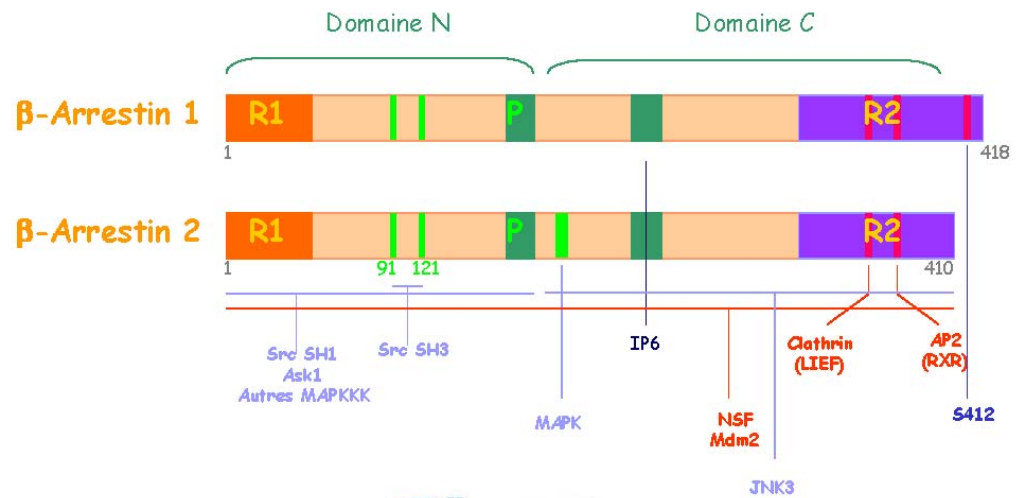
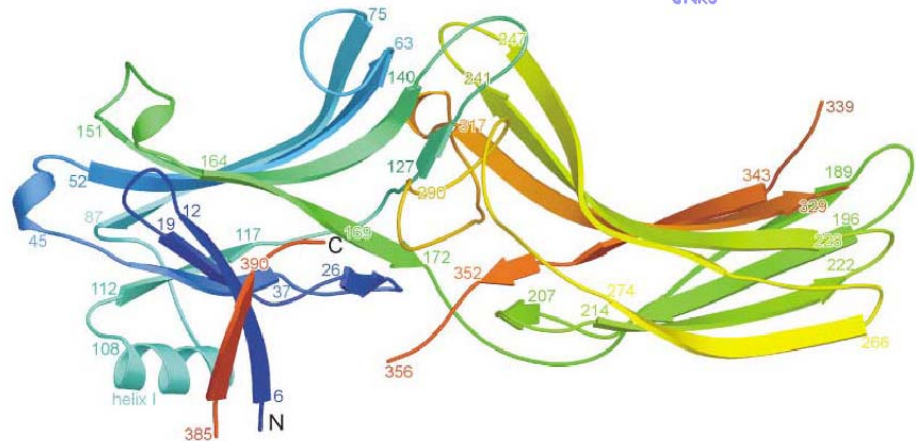
A**B**

Figure 8. Architecture des β arr1 et β arr2

A) Représentation schématique de l'architecture des β arrestines 1 et 2. Leurs domaines n- et c-terminaux présentent tous deux une structure modulaire en brin β représentée en B dans le cas de la β arr1 (modélisation tirée de (Han et al., 2001)). Le domaine n-terminal est essentiel à la reconnaissance du récepteur activé tandis que le domaine c-terminal constitue probablement un site de reconnaissance secondaire du récepteur. La portion distale du domaine n-terminal exhibe une séquence de reconnaissance des phosphates (P) qui est enfouie à l'état basal au niveau du cœur polaire de la protéine. Sa reconnaissance par la queue phosphorylée du récepteur induirait un changement conformationnel de la protéine. Les régions d'interaction des β arr avec leurs divers partenaires de signalisation sont également représentées. On retrouve notamment les prolines 91 et 121 importantes dans la reconnaissance par β arr1 du domaine SH3 de src, la séquence LIEF essentielle à la liaison de la clathrine et la séquence RXR liant l'adaptateur AP2. La sérine S⁴¹² phosphorylée par les ERK module l'interaction de la β arr1 à la clathrine et potentiellement à certains des composants de la voie MAPK (Adapté de (Clain et al., 2002; Lefkowitz and Shenoy, 2005)). B) Diagramme en ruban de la β arrestine 1 modélisée à partir de sa structure cristalline ((Han et al., 2001)). Les brins sont colorés du bleu vers l'orange en fonction de leur distance de l'extrémité n-terminale.

En plus d'augmenter l'affinité entre l'arrestine et le récepteur, ce changement conformationnel dévoilerait également des interfaces de liaison pour plusieurs partenaires des arrestines n'appartenant pas à la famille des GPCR. La diversité fonctionnelle de ces partenaires est très importante dans les cas des β arr1 et β arr2 (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Parmi eux, on retrouve la protéine adaptatrice AP2 (Laporte et al., 1999) ainsi que la clathrine (Goodman, Jr. et al., 1996) (Fig 8). L'interaction entre la β arrestine et ces deux protéines semble importante dans le processus d'internalisation des récepteurs désensibilisés. Cependant, en fonction de la stabilité de la liaison entre récepteur et β arrestine, ces derniers auront des destinées très différentes (Fig 9).

Le niveau de liaison entre la β arrestine et le récepteur détermine le transport de ce dernier

Les récepteurs liant fortement la β arrestine (également appelé de classe B; ex : le V2R) sont internalisés avec celle-ci et retenus dans des compartiments endosomaux intracellulaires où ils seront dégradés ou renvoyés vers la surface cellulaire par une voie lente de recyclage. Les récepteurs présentant au contraire une faible affinité pour la β arrestine (dit de classe A; ex : le β 2AR) sont, quant à eux, internalisés après s'être dissociés, puis rapidement recyclés vers la membrane plasmique (Fig 9). La stabilité de la liaison de la β arrestine au récepteur est entre autres déterminée par le niveau de phosphorylation par les GRK du récepteur (Oakley et al., 2001). Les récepteurs partageant une haute affinité pour la β arrestine (ex : Récepteur 1 de l'angiotensine II (AT1R), V2R ou Oxytocin receptor (OR)) vont être phosphorylés par des GRK au niveau de plusieurs segments riches en S/T présents dans leur portion c-terminale et localisés à une distance conservée du motif NPXXY de la région distale de leur TMVII (Oakley et al., 2001).

En dehors de la phosphorylation du récepteur un autre phénomène semble déterminant à l'affinité de la β arrestine pour le récepteur auquel elle est recrutée, l'ubiquitination (Shenoy and Lefkowitz, 2003).

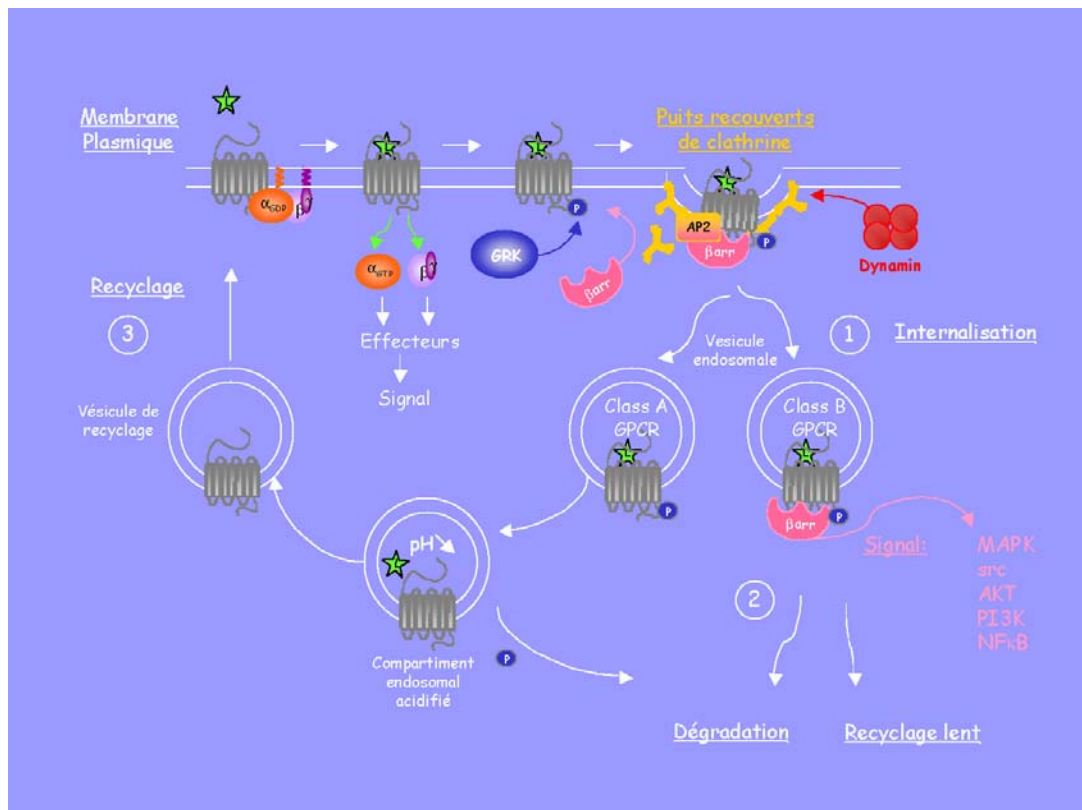


Figure 9. Les différentes voies d'internalisation empruntées par les GPCR

Le récepteur activé va induire le recrutement d'une GRK et sa phosphorylation subséquente. La β arr est alors recrutée au récepteur et favorise son internalisation au niveau des puits recouverts de clathrine (CCP) (1). On distingue alors deux types de comportements différents du récepteur : les récepteurs de classe B vont être retenus à l'intérieur de la cellule et dégrader ou à lentement recycler vers la surface (2). Les récepteurs de classe A vont quant à eux rapidement recycler vers la surface cellulaire à l'issue de leur endocytose (3). Contrairement aux récepteurs du groupe A, les GPCR du groupe B vont interagir stablement avec la β arr et co-internaliser avec cette dernière. Dans ce cas, la β arr va favoriser la phosphorylation des ERK1/2 mais inhiber leur translocation vers le noyau. Dans le cas d'une interaction transitoire avec le récepteur (groupe A), la β arr reste associée à la membrane plasmique en système hétérologue aussi longtemps que le ligand n'est pas ôté. (adaptée principalement des résultats de (Oakley et al., 1999; Oakley et al., 2000; Oakley et al., 2001)).

L'ubiquitination de la β arrestine

L'ubiquitination consiste en la modification covalente par une petite protéine de 8kDa, l'ubiquitine (Ubi). Conservée quasi parfaitement de la levure à l'homme, l'ubiquitine est ajoutée au niveau de une (monoubiquitination) ou plusieurs (multi-monoubiquitination) lysines de la protéine modifiée ou encore d'elle-même (polyubiquitination). Dans ce dernier cas, le motif d'ubiquitination est constitué d'une chaîne d'ubiquitines impliquant les résidus K¹¹, K²⁹, K⁴⁸ ou encore K⁶³ de l'ubiquitine (Weissman, 2001). Si plusieurs GPCR se voient ubiquitinés à l'issue de leur activation, le β 2AR (Shenoy et al., 2001) mais aussi le CXCR4 (Marchese and Benovic, 2001; Marchese et al., 2003), le V2R (Martin et al., 2003) et les récepteurs Ste2 (Hicke and Riezman, 1996) et Ste3 (Chen and Davis, 2002), ce phénomène semble particulièrement importante pour leur dégradation (Raiborg et al., 2003). Par contre, l'ubiquitination de la β arrestine en réponse à l'activation de récepteurs variés (Shenoy and Lefkowitz, 2005) serait en revanche essentielle à l'initiation de leur endocytose (Shenoy et al., 2001; Shenoy and Lefkowitz, 2003). La mutation de la E3-ubiquitine ligase, Mdm2 (Shenoy et al., 2001), responsable du transfert finale d'ubiquitine à la β arr (Fig 10) en réponse à l'activation du β 2AR, inhiberait ainsi l'internalisation du récepteur (Shenoy et al., 2001).

Soumise à une étroite régulation, la dynamique de l'ubiquitination de la β arr2 dépend de la nature du récepteur activé (Fig 11) (Shenoy et al., 2001; Shenoy and Lefkowitz, 2003; Shenoy and Lefkowitz, 2005). Dans le cas du récepteur β 2AR, récepteur ayant une faible affinité pour la β arrestine, l'ubiquitination de cette dernière est transitoire, diminuant après quelques minutes. Au contraire, dans le cas d'un récepteur exhibant une haute affinité pour cette dernière, le V2R ou le récepteur 1 de l'angiotensine II (AT1R) par exemple, l'ubiquitination de la β arr2 persiste plusieurs dizaines de minutes (Shenoy and Lefkowitz, 2003). L'ubiquitination de la β arrestine pourrait donc participer à la détermination de l'identité des voies d'internalisation empruntées par les récepteurs endocytosés. Consistant avec cette idée, une protéine chimère de fusion entre l'ubiquitine et la β arr2 (β arrUbi) lie stablement le β 2AR qui n'est plus recyclé vers la surface mais retenu dans l'endosome (Shenoy and Lefkowitz, 2003).

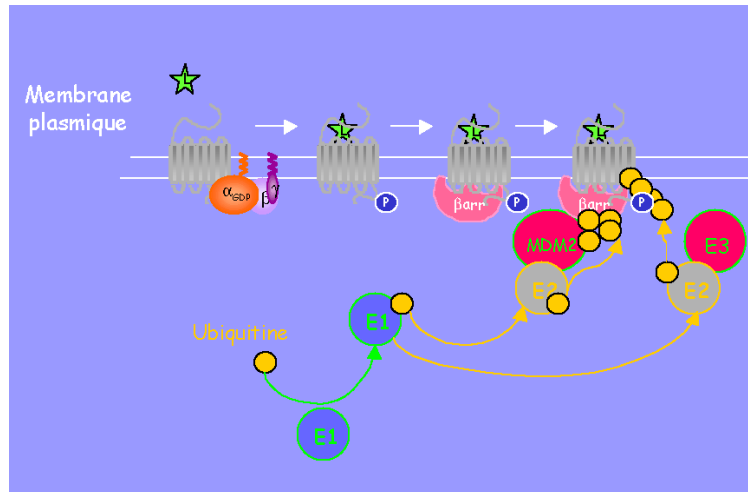


Figure 10. Représentation du mécanisme d'ubiquitination du récepteur β 2AR et de la β arr2.

A l'issue de la phosphorylation du récepteur par une GRK, le recrutement de la β arrestine au récepteur s'accompagne de son ubiquitination propre ainsi que de celle du récepteur. Différentes enzymes participent au mécanisme d'ubiquitination : L'enzyme E_1 d'activation de l'ubiquitine (représentée en jaune), l'enzyme E_2 de conjugaison de l'ubiquitine et la E_3 -ubiquitine ligase. Dans le cas de l'ubiquitination de la β arrestine, Mdm2 semble jouer le rôle de E_3 ligase (adapté des résultats de (Shenoy et al., 2001)).

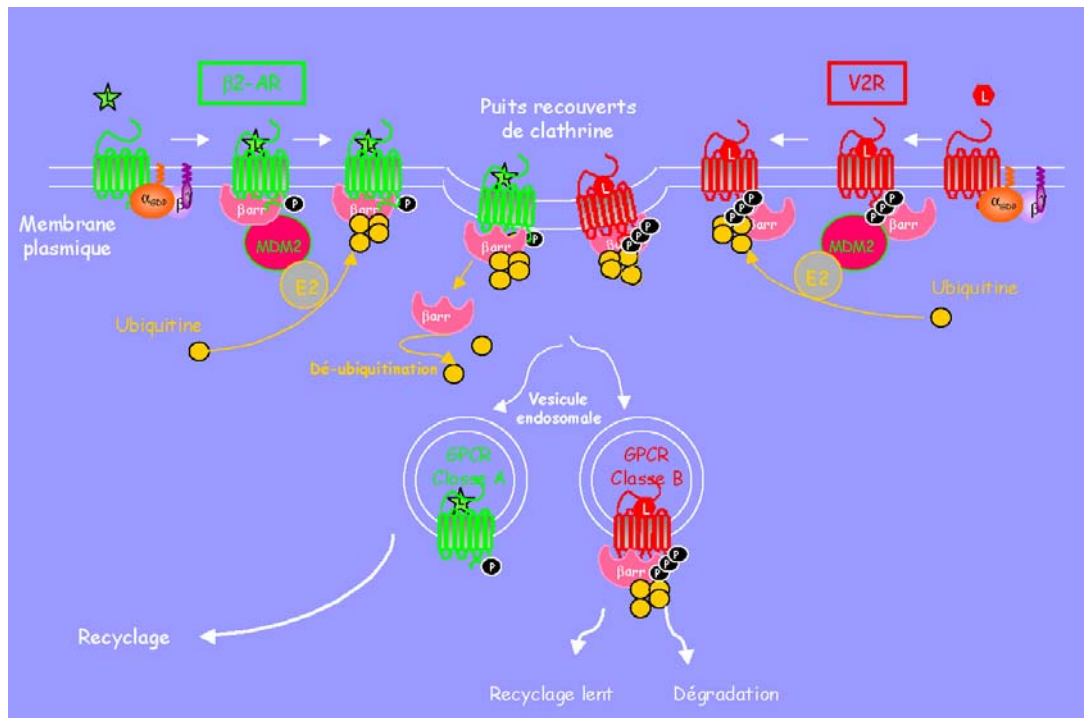


Figure 11. Illustration de la dynamique d'ubiquitination de la βarr.

En fonction de son activation et son association aux récepteurs du groupe A représentés par le β2AR et du groupe B représentés par le V2R, l'ubiquitination va différer. Dans tous les cas, l'ubiquitination de la βarr est induite par l'activation de ces deux classes de récepteurs. Dans le cas du β2AR, ce phénomène est néanmoins transitoire malgré la présence de l'agoniste et aboutit à une rapide dé-ubiquitination de la protéine adaptatrice probablement par une enzyme dé-ubiquitinase. Dans le cas du V2R, la modification de la βarr persiste. (adapté des résultats de (Shenoy and Lefkowitz, 2003)).

Conséquences de l'ubiquitination de la β arrestine sur la signalisation des GPCR

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les GPCR ne sont pas les seules protéines interagissant avec la β arrestine (Fig 8) (Lefkowitz and Shenoy, 2005). La clathrine et AP2 en sont des exemples, mais la β arrestine interagit également avec d'autres types de récepteurs –le récepteur de l'insuline (Lin et al., 1999) ou encore TGF β (Chen et al., 2003a)-, dishevelled (un composant de la signalisation du récepteur Frizzeld) (Chen et al., 2003b), de petites protéines G [ARF6 (Claing et al., 2001) et RhoA (Barnes et al., 2005)], des phosphatases [PP2A (Hupfeld et al., 2005)], l'inhibiteur du facteur nucléaire κ B (I κ B α) ((Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004)), ainsi que les tyrosines kinases de la famille src ((Barlic et al., 2000; Luttrell et al., 1999; DeFea et al., 2000a; DeFea et al., 2000b)) et les composants des cascades MAPK (kinases activées par des signaux mitogènes) nécessaires à l'activation des ERK (kinase régulées par des signaux extracellulaires) (Luttrell et al., 2001) ou de JNK3 (cJun kinase) (McDonald et al., 2000) [pour une liste plus détaillée (Lefkowitz and Shenoy, 2005)]. De manière intrigante, la capacité de la β arr2 à lier les modules protéiques de la cascade MAPK semble intimement liée à son état d'ubiquitination (Shenoy and Lefkowitz, 2005)). La stabilité de son ubiquitination détermine une activation intense et soutenue des protéines ERK à l'issue de l'activation d'un récepteur et prévient leur translocation nucléaire. Dans ces conditions, la stimulation des ERK conduit à l'induction de phénomènes cellulaires non mitogéniques, différenciation, stress...etc (Ahn et al., 2004; Luttrell et al., 2001). Un parallèle a donc été proposé entre l'appartenance d'un récepteur à la classe B et la stimulation soutenue des ERK aboutissant à des phénomènes non mitogéniques. L'identification des résidus de la β arr ubiquitinés à l'issue de différents récepteurs de cette classe a néanmoins démontré un niveau insoupçonné de spécificité de ce processus. En effet, en fonction de l'activation de l'AT1R ou du V2R, deux récepteurs appartenant à la classe B et ne recyclant que faiblement, l'identité des lysines impliquées dans l'ubiquitination de la β arr2 serait différente. Ces résultats (Shenoy and Lefkowitz, 2005) suggèrent que le changement conformationnel subi par la β arr à l'issue de sa liaison au récepteur pourrait différer en fonction de la nature du récepteur activé. Ces variations de conformation s'accompagneraient d'une spécificité au niveau des

résidus ubiquitinés de la protéine. Les conséquences de l'ubiquitination sur la capacité de liaison de la β arrestine à ses autres partenaires de liaison ne sont pas documentées, néanmoins, le fait qu'au contraire du V2R, l'AT1R induisent spécifiquement l'ubiquitination des lysines K¹¹ et K¹² de la β arr2 (résidus impliqués dans la reconnaissance du récepteur activé par l'arrestine) est intrigant. Ces différences dans le patron d'ubiquitination de la β arr pourrait donc avoir des conséquences quant à l'identité des protéines interagissant avec cette dernière à l'issue de l'activation d'un récepteur donné (Fig. 8) (Shenoy and Lefkowitz, 2005). Ce faisant, cette modification post-traductionnelle confèrerait un niveau supplémentaire de spécificité à la fonction de la β arrestine dans la régulation des GPCR.

Cette liste non exhaustive des protéines participant aux voies de signalisation associées aux GPCR souligne une caractéristique importante de ces voies de transduction, leur convergence. La grande diversité des récepteurs à 7TM contraste avec le nombre restreint de voies de signalisation auxquelles ils sont en réalité associés dans leur ensemble. Une voie de signalisation impliquant les mêmes effecteurs cytosoliques sera en conséquence utilisée pour transmettre des informations très différentes. A l'échelle du développement des organismes, ce principe est désigné par le terme co-option (Pires-daSilva and Sommer, 2003).

La signalisation associée à Hh impliquant entre autre le récepteur smoothed, est essentielle au développement antéropostérieur du disque imaginaire de l'aile chez la drosophile. Cette fonction ancestrale de Hh est conservée chez le papillon. Dans ce cas, Hh contribue également à la formation d'une nouveauté évolutive permettant d'éviter les prédateurs, les tâches en forme d'oeil (eyespot) (Keys et al., 1999) (Fig 12).

Cette exemple peut paraître anodin mais illustre néanmoins un point essentiel dans l'organisation des voies de signalisations cellulaires. Une même voie de

signalisation peut aboutir à la création de structures morphologiques et biologiques très différentes (Pires-daSilva and Sommer, 2003).



Figure 12. Papillon de la famille des lépidoptères.

P. coenia (Image obtenue sur le site internet Google). Ces papillons présentent des dessins en forme d'œil (eyespot) au niveau de la surface supérieure de leurs ailes, les protégeant des prédateurs.

Les mécanismes moléculaires permettant de générer la diversité biologique à partir d'un nombre restreint de modules de signalisation restent encore en grande partie méconnue. Néanmoins, certaines propriétés des protéines offrent des indices concernant la nature de ce processus; leur capacité à s'associer avec différents partenaires en complexes multimériques pourrait ainsi en être un exemple.

COMPLEXES MULTIMÉRIQUES ET SIGNALISATION

Que l'on s'intéresse au développement et à la croissance cellulaire, à l'adhésion cellulaire, à la réponse immunitaire, à l'apoptose ou à la régulation de l'activité neuronale, l'oligomérisation des différentes protéines impliquées semble, si ce n'est une règle, du moins une propriété fréquemment retrouvée dans les voies de signalisation. Une telle caractéristique se retrouve également dans les voies associées aux GPCR et ce à tous les niveaux de la voie : récepteur, protéine G, effecteurs et modulateurs. Dans quelle mesure cette capacité évolutivement conservée des protéines à constituer des complexes homo- ou hétéro-multimériques est-elle importante? Pourquoi? Quelles sont ses conséquences fonctionnelles? Ce sont ces questions ambitieuses qu'aborde cette section.

Structure quaternaire des acteurs de la signalisation des GPCR

Les récepteurs

Le principe selon lequel un GPCR monomérique active une protéine G qui à son tour stimule un effecteur est longtemps demeuré le modèle classiquement accepté de l'activation des voies de signalisation associées aux GPCR et reste à ce jour vivement défendu (Chabre et al., 2003). Néanmoins, le développement récent de technologies reposant sur un transfert d'énergie de fluorescence (FRET) ou de bioluminescence (BRET) (Angers et al., 2000; Mercier et al., 2002; Xu et al., 1999), les techniques de trans-complémentation, de co-immunoprécipitation et de cross-linking (voir références dans (Bouvier, 2001)) ont permis, au cours des dix dernières années, de générer nombre de résultats supportant l'existence de récepteurs dimériques ou oligomériques dans les cellules. La visualisation de l'organisation en rang de dimères de la rhodopsine exprimée dans des membranes de rétine de souris (Fotiadis et al., 2003) (Fig 13) suggère en outre que ces deux types d'organisation pourraient coexister simultanément. Un modèle reposant sur la structure cristallisée de la rhodopsine (Palczewski et al., 2000) et réconciliant l'ensemble de ces résultats, propose la présence de deux interfaces d'interaction du récepteur avec lui-même (Javitch, 2004): l'une symétrique, au niveau du domaine TMIV ou V correspondant à

A

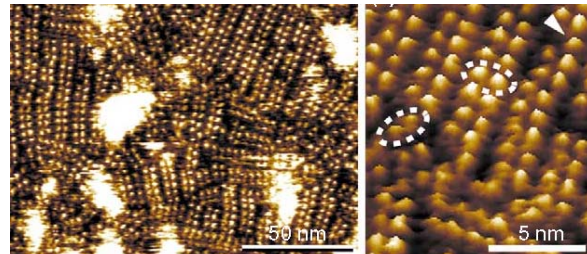
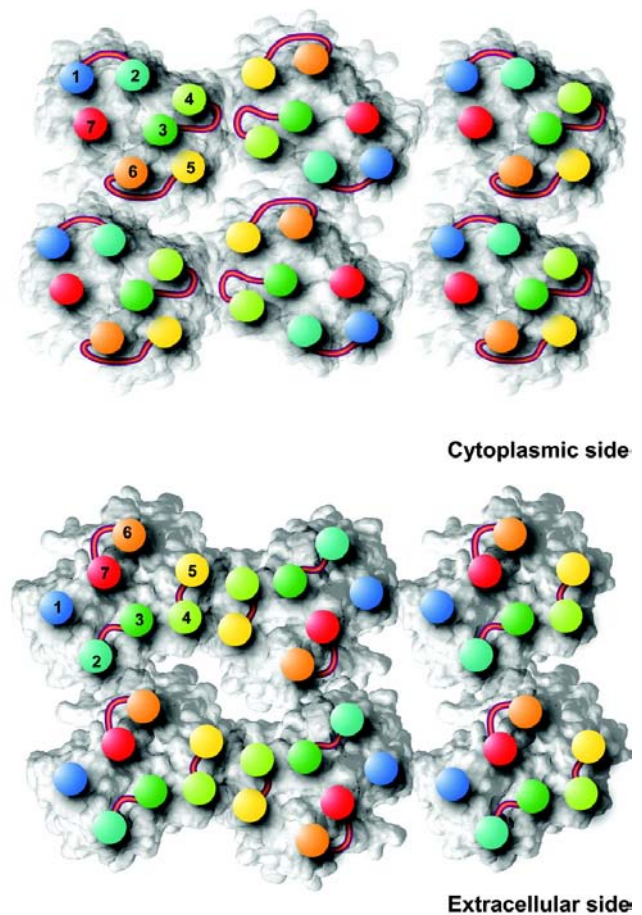


Figure 13. Organisation et topographie de la face cytosolique de la rhodopsine dans des membranes natives de rétines de souris.

A) Cette représentation met en évidence la concentration du récepteur qui présente un alignement en rangée de dimères (mis en évidence par les cercles pointillés). La flèche indique la présence occasionnelle de monomères de rhodopsine. B) Modélisation de l'arrangement de la rhodopsine visualisé en A) au niveau de la face cytoplasmique ou extracellulaire de la membrane. L'interface entre monomères prend place au niveau des domaines TM4 et TM5. La majorité des contacts entre deux dimères interviennent entre la boucle séparant les TM5 et TM6 et celle séparant les TM1 et TM2. (Fotiadis et al., 2003; Fotiadis et al., 2004) L'organisation des dimères de rhodopsine (Fotiadis et al., 2003) pourrait également suggérer une association multimérique du tri-complexe $\alpha\beta\gamma$ de la protéine G. La difficulté de purifier la protéine $G\alpha$ à l'état monomérique ou encore l'organisation symétrique de son cristal, révélatrice de sa dimérisation, seraient compatibles avec une telle hypothèse (Graber et al., 1992). Images adaptées avec la permission des Dr Fotiadis et Palzewski (Fotiadis et al., 2003; Fotiadis et al., 2004)

B



son organisation dimérique, l'autre asymétrique, formée par les boucles comprises entre ses TMV-VI et TMI-II respectivement et supportant l'interaction interdimérique.

Les protéines G

L'organisation oligomérique des protéines G hétérotrimérique est évidemment patente. Cependant, l'évolution du concept d'oligomérisation des récepteurs a soulevé des questions concernant la stœchiométrie du couple récepteur-protéine G fonctionnel. Un modèle comportant un dimère de récepteur et une protéine G hétérotrimérique pourrait en effet répondre aux contraintes structurales et stériques générées par un modèle dimérique de récepteur (Baneres and Parello, 2003).

Les effecteurs et autres protéines associées

Comme dans le cas des protéines G hétérotrimériques, l'organisation pentamérique des canaux calciques (Baneres and Parello, 2003; Catterall, 2000) et des récepteurs ioniques au GABA (Baneres and Parello, 2003; Macdonald and Olsen, 1994) ou à la glycine (Owens and Kriegstein, 2002), tétramérique des canaux potassiques rectifiant entrant (Baneres and Parello, 2003; Jan and Jan, 1997) ou des récepteurs ionotropiques au Glutamate (Bredt and Nicoll, 2003; Wenthold et al., 2003) est largement acceptée. A l'image des autres membres de la famille des protéines présentant une cassette de liaison à l'ATP comme le CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) (Ramjeesingh et al., 2003a; Ramjeesingh et al., 2003b), l'AC semble également dimériser (Cooper, 2003; Gu et al., 2002). Par ailleurs, les protéines modulatrices de l'activité des récepteurs, PICK1 (Xia et al., 1999), Homer (Xiao et al., 1998), NHERF (Lau and Hall, 2001; Shenolikar et al., 2001), RAMP (receptor associated modifying protein) (Hilairret et al., 2001), ainsi que la β arrestine (Schubert et al., 1999) semblent présenter une structure quaternaire.

Les avantages moléculaires de la multimérisation

L'accroissement du nombre de partenaires d'une protéine doit souvent s'accompagner d'une multiplication des ses interfaces d'interaction. En réponse à ce besoin, l'évolution semble avoir favorisé une organisation oligomérique des protéines aux dépens d'une augmentation de la taille des protéines. Dans une excellente revue de littérature, Goodsell (Goodsell and Olson, 2000) énumère les arguments théoriques et thermodynamiques ayant pu favoriser le développement d'une organisation quaternaire des protéines au détriment de leur augmentation de taille.

Éléments défavorables à l'augmentation de la taille des protéines

L'augmentation de la surface de solvation.

Thermodynamiquement, la fenêtre de variation de taille compatible avec une stabilité structurale des protéines semble limitée par l'augmentation de la surface de contact de la protéine avec le solvant pour deux raisons : elle favorise l'hydrolyse et induit une augmentation proportionnelle du volume hydratée de la protéine, défavorable en terme entropique (Bryant, 1996). L'augmentation de la surface de contact d'un dimère de protéine est ainsi deux fois moindre que celle correspondant à un doublement de la taille de cette même protéine.

Le degré de fidélité de la machinerie de traduction

L'incorporation de codons erronés ou terminateurs au moment de la transcription a été évaluée chez les procaryotes à une fréquence d'environ $5/10^4$ ou $3/10^4$ par codon, respectivement. Globalement ceci signifie que pour une protéine de 500 acides aminés, une protéine sur quatre présentera une erreur de séquence et une protéine sur 7 sera incomplète. En comparaison, toutes les protéines de 2000 acides aminés risquent de présenter au moins une erreur d'incorporation et leur traduction sera très souvent incomplète (Goodsell and Olson, 2000). De manière générale, les mutations ponctuelles n'altèrent que rarement la structure d'une protéine (Campbell-Valois F-X, 2005), néanmoins le récepteur V2 de la vasopressine (V2R) illustre particulièrement bien les effets néfastes que peuvent avoir de multiples mutations ponctuelles sur la fonction d'une protéine (Kim et al., 1998; Kim and Arvan, 1998;

Morello et al., 2000). A l'échelle évolutive l'augmentation moyenne de la taille des protéines pourrait ainsi s'en trouver limitée.

Éléments favorisant une organisation quaternaire des protéines

La stabilité structurale des oligomères

La majorité des protéines oligomériques solubles ou membranaires, comme les GPCR, présentent une organisation symétrique ou quasi symétrique (Goodsell and Olson, 2000). Comme le rappelle Goodsell, en dehors des qualités purement esthétiques des complexes symétriques, plusieurs biophysiciens ont mis en évidence certains des avantages associés à de tels assemblages. Cornish-Bowden et Koshland démontrent théoriquement que l'état d'énergie le plus stable d'un complexe oligomérique correspond à un arrangement symétrique (Cornish-Bowden and Koshland, Jr., 1971). Dans le même sens, Wolynes propose que l'oligomérisation symétrique diminue l'état de transition du repliement de chacune des sous unités (Wolynes, 1996). En limitant de facto le nombre de sous unités, la symétrie centrale des oligomères diminue l'incorporation de sous unités extranuméraires et de ce fait les phénomènes d'agrégation incontrôlée (Goodsell and Olson, 2000).

L'oligomérisation facilite le processus évolutif de sélection

Dès 1965, Monod propose un avantage évolutif à l'oligomérisation symétrique et plus particulièrement à la dimérisation (Monod et al., 1965).

« Dimeric interfaces are easier to create by mutations of existing monomers than are interfaces in complexes of higher symmetry where the probability of non productive pairing are necessarily higher..... Because of the inherent cooperativity of their structure, symmetrical oligomers should constitute particularly sensitive targets for molecular evolution, allowing much stronger selective pressures to operate in the random pursuit of functionally adequate structures. »

L'évolution de la structure d'une protéine résulte de l'action de pression de sélection thermodynamiques et fonctionnelles. Si cet équilibre aboutit fréquemment à une organisation quaternaire symétrique, la pression évolutive associée à la fonction d'une protéine peut s'avérer supérieure aux contingences structurales et mener au développement de structures asymétriques. Certaines protéines vont ainsi présenter

plusieurs axes de symétrie, voire une asymétrie comme dans le cas de la transcriptase inverse de HIV-1.

Les effets de la concentration moléculaire ou « *molecular crowding* »

Le paradigme prévalant actuellement à l'analyse des données biochimiques et biophysiques a mené à une compréhension relativement fidèle des propriétés chimiques et biophysiques des macromolécules au cours des dernières décennies, et repose sur différents prédicats : 1) le volume de réaction est infini, 2) la solution est diluée, 3) la concentration du substrat est très supérieure à celle de l'enzyme (ou encore celle du ligand par rapport à la concentration du récepteur), 4) la solution est précisément définie, 5) la solution est homogène (Luby-Phelps, 2000). Un nombre croissant d'études montrent que la réalité cellulaire échappe néanmoins aux conditions idéales du paradigme actuellement en vigueur par de nombreux aspects : 1) Le volume cellulaire est fini, 2) la concentration moyenne des seules macromolécules protéiques est d'environ 350g/L, 3) le volume réactionnel réel est en conséquence très restreint, 4) la diffusion l'est également, 5) le milieu est hétérogène.

Parmi les conséquences physiques des propriétés du cytosol (Tableau 2) (adéquatement représentées selon un modèle reposant sur les propriétés hydrodynamiques des particules solides (Hall and Minton, 2003)), l'une d'elle est l'augmentation du phénomène général d'agrégation des macromolécules. Que cette agrégation s'effectue au niveau d'interfaces structurées des protéines natives ou de zones hydrophobes révélées par la déstabilisation de ces mêmes protéines, elle repose dans tous les cas sur des interactions spécifiques. En ce sens, les conséquences du « *molecular crowding* » ne sont pas de créer *de novo* des interactions protéiques mais bien de les favoriser (Ellis, 2001). Concrètement, la constante d'équilibre entre les formes monomériques et dimériques d'une protéine de taille moyenne de 40kDa sera modifiée en faveur de la forme dimérique par un facteur de 8 à 40 (en fonction du volume spécifique de la protéine) quand son évaluation est réalisée dans un contexte cellulaire au lieu d'être réalisée dans des conditions *in vitro*.

| Caractéristiques cellulaires | | |
|---|---|---|
| Volume cellulaire moyen | Bactérie : 2.10^{-1} pL Hépatocyte : 4pL | Halling PJ 1989 TIBS |
| Membrane plasmique | 2000 μ m ² /cell | Alberts 1994 Mol. Biol. Cell (Book) |
| Membranes internes totales | 100 000 μ m ² /cell | Alberts 1994 Mol. Biol. Cell (Book) |
| Membrane du réticulum endoplasmique | 30000 μ m ² /cell | Mori H 1982 JCEM |
| Membranes mitochondriales | 2-4000 μ m ² /cell | Mori H 1982 JCEM |
| Cytosquelette | <u>Surface totale</u> : 69000-91000 μ m ² /cell. | Gershon ND 1985 PNAS |
| /réseau microtrabéculaire cellulaire | FA : 3cm/cell ; 4mg/cell FI : 1cm/cell. MT : 150 /cellules ; 50-100 μ m/MT | Bray et Thomas 1975 Biochem J Hiller G 1978 Cell |
| Diversité des protéines synthétisées | 10000-20000 | Alberts 1994 Mol. Biol. Cell (Book) |
| Concentration protéique totale moyenne | 350g/L | Lanni F 1985 JCB |
| Concentration protéique dans le lumen du ER | 100g/L | Kaufman R 2004 TIBS |
| Concentration ARN | 100g/L | Ellis RJ 2001 COCB |
| Caractéristiques moléculaires | | |
| Concentration nominale protéique | 1 copie/bactérie → 10nM 1000 copies /cell. eucaryote → 1nM | Halling PJ 1989 TIBS |
| Exemple de la calmoduline * | 38 μ M Affinité pour la myosin : 1nM | Tansey 1994 ; Zimmerman 1995 |
| Protons et acidification | <u>Endosome 250nm de diamètre :</u> pH 6 → 1 proton (endosome précoce) pH 5,5 → 48 protons (endosome tardifs) | Halling PJ 1989 TIBS Luby-Phelps K 2000 IntRevCytology |

*La calmoduline présente plusieurs dizaines de partenaires potentiels dans la cellule présentant des affinités pour cette dernière dans une fenêtre d'un ordre de grandeur. L'affinité de la myosin pour la calmoduline est un des exemples de ses partenaires cellulaires.

Tableau 2. La cellule en chiffres.

Les informations contenues dans ce tableau sont largement inspirées de plusieurs excellentes revues de la littérature décrivant entre autres la réalité de la concentration moléculaire dans la cellule ainsi que ses conséquences fonctionnelles. (Bray and Duke, 2004; Ellis, 2001; Hall and Minton, 2003; Luby-Phelps, 2000)

Dans le cas d'une protéine capable de tétramériser, la constante d'équilibre entre sa forme tétramérique et sa forme monomérique sera par contre modifiée en faveur de la tétramérisation par un facteur de 10^3 à 10^5 (Ellis, 2001) dans des conditions mimant la concentration moléculaire atteinte dans un contexte cellulaire. La visualisation des éléments cytosquelettiques dans les cellules eucaryotes (Medalia et al., 2002) ou encore l'évaluation de la concentration de l'hémoglobine (350g/L) (Kim et al., 1998; Kim and Arvan, 1998) au sein des hématies laissent aisément imaginer que les conséquences du « *molecular crowding* » soient non seulement réelles mais influencent également le processus de multimérisation des protéines cellulaires au sein du cytosol. L'évaluation de la concentration membranaire de la rhodopsine dans les membranes de rétines de souris (68000 récepteurs/ μm^2) (Fotiadis et al., 2003) illustre par ailleurs dans quelle mesure la concentration moléculaire a aussi vraisemblablement un impact au sein de l'environnement membranaire.

Le rôle de l'oligomérisation : le cas des GPCR

Stabilité structurale

La relation entre oligomérisation et stabilité structurale d'une protéine implique que toutes altérations de la capacité d'oligomérisation d'une protéine devrait avoir des répercussions sur la stabilité de sa structure tridimensionnelle et donc sur sa fonction.

Dans le cas des protéines membranaires et des GPCR, la stabilité structurale d'une protéine est reflétée par sa capacité à être convenablement transportée vers son lieu d'action, membrane plasmique ou tout autre organelle. Toute déstabilisation de cette dernière peut aboutir à une altération de son transport membranaire et à sa subséquente dégradation. Certaines pathologies, la fibrose kystique ou le diabète néphrogénique insipide par exemple, découlent apparemment d'une instabilité de la protéine, le canal CFTR ou le récepteur V2-vasopressine respectivement. Dans chaque cas, la protéine se voit retenue dans le réticulum endoplasmique (Bernier et al., 2004a; Kim and Arvan, 1998). L'utilisation d'agents pharmacologiques stabilisant une forme native des récepteurs mutants permet leur expression à la surface cellulaire

à des niveaux compatibles avec leur fonction physiologique (Bernier et al., 2004b). Bien qu'aucune corrélation entre l'instabilité du V2R ou du CFTR mutants et leur capacité d'oligomérisation n'ait jusqu'à présent été observée, l'oligomérisation des GPCR et d'autres protéines membranaires [canaux calciques, AC, GIRK, récepteur ionotropiques au glutamate (iGluR)] a été impliqué dans leur transport vers la membrane plasmique (Bichet et al., 2000; Greger et al., 2002; Greger et al., 2003; Gu et al., 2002; Kim and Arvan, 1998; Margeta-Mitrovic et al., 2000; Salahpour et al., 2004; Yuan et al., 2003). Ces observations sont donc consistantes avec l'hypothèse d'un rôle de l'oligomérisation dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle des protéines.

Allostérie

La notion de signalisation cellulaire revêt l'idée d'un transfert d'information. Le rôle de chacune des protéines d'une cascade de signalisation va donc être de conduire cette information. Au niveau moléculaire, ce phénomène s'effectue par la propagation de réarrangements correspondant à des changements conformationnels locaux ou plus vastes de la protéine (Luque et al., 2002). Cette cascade de changements conformationnels d'une région d'une protéine vers une autre, définit la notion d'allostérie (Kern and Zwietering, 2003). Au niveau d'un récepteur, la liaison d'un ligand ne repose généralement que sur un nombre restreint de résidus (Suel et al., 2003). La propagation du signal de liaison vers une nouvelle région du récepteur (son interface avec la protéine G par exemple) doit donc reposer sur une chaîne d'interactions coopératives au sein de ce dernier. Un tel processus requiert une distribution hétérogène des résidus supportant le phénomène d'allostérie et la stabilité de la protéine. Ces derniers vont d'une part assurer le fondement architectural de la structure tridimensionnelle de la protéine mais également générer le squelette nécessaire à une allostérie fonctionnelle (Suel et al., 2003; Luque et al., 2002). L'importance de la stabilité structurale des protéines dans le phénomène d'allostérie pourrait ainsi expliquer le lien étroit existant entre propagation de changements conformationnels, oligomérisation et signalisation (Bray and Duke, 2004; Goodsell and Olson, 2000; MONOD et al., 1965; Sourjik, 2004).

TRANSITIONS ALLOSTÉRIQUES ET SIGNALISATION

Définition

La nature même du processus de transduction repose sur la capacité d'une protéine à changer de conformation en réponse à la liaison de son ligand. Dans le cas des complexes oligomériques homologues ou hétérologues, la liaison d'un ligand à une sous unité du complexe va moduler les propriétés de liaison des autres unités protéiques. La liaison, selon une courbe sigmoïde, de l'oxygène à l'hémoglobine ou de la molécule de GABA au récepteur ionotropique au GABA illustre classiquement un tel phénomène (Christopoulos and Kenakin, 2002). Monod, Wyman et Changeux ont énoncé un modèle (le modèle MWC) décrivant ce phénomène de transition allostérique dans le cas de l'hémoglobine en faisant l'hypothèse que sous l'influence du ligand (en l'occurrence l'oxygène), les différentes sous unités de la protéine passe d'une conformation R (Relaxed) à une conformation T (Tensed) de manière à préserver la symétrie des interfaces entre les sous unités (Monod et al., 1965). Un autre modèle, proposée par Koshland, Nemethy et Filmer (modèle KNF) suppose que chaque sous unité change de conformation au moment où elle lie le ligand et que ce changement induit à la fois une modification conformationnelle des autres sous unités et/ou module l'interaction entre les sous unités (Koshland, Jr. et al., 1966; Koshland, Jr. and Hamadani, 2002). Chacun de ces modèles rend compte des paramètres de liaison de l'oxygène à l'hémoglobine, par contre seul le modèle KNF permet de décrire à la fois les cas de coopérativité positive comme dans le cas de l'hémoglobine, ainsi que ceux correspondant à une coopérativité négative comme dans le cas de la carbamoyl-phosphate synthase (Gerhart and Pardee, 1962) ou même neutre lorsque la courbe de liaison enzymatique peut être représentée selon une analyse classique de Michaelis Menten. Le modèle de représentation allostérique MWC pourrait ainsi être considéré comme un cas simplifié du modèle plus général KNF (Stevens and Lipscomb, 1992). Dans tous les cas, ces deux modèles décrivent le comportement de l'hémoglobine en considérant simplement deux types de conformations extrêmes de cette dernière. Des données ultérieures ont néanmoins démontré que cette transition

allostérique était vraisemblablement plus graduelle (Perutz, 1970; Perutz et al., 1998) et impliquait différents intermédiaires conformationnels de la protéine.

Le cas des récepteurs

Historiquement, la formalisation mathématique du comportement d'un ligand vis à vis de son récepteur a été développée durant la première partie du XX^{ème} siècle par Clark AJ et a donné lieu à la théorie des récepteurs (*Receptor theory*; Revue extensive à ce sujet par (Christopoulos and Kenakin, 2002; Kenakin, 2004)). Bien que le terme d'allostérie n'ait été employé une première fois qu'en 1961 (Christopoulos and Kenakin, 2002) lors d'études portant sur l'hémoglobine, le concept d'isomérisation conformationnelle d'un récepteur à l'issue de sa liaison à un ligand a été proposé dès les années 50. La structure oligomérique des récepteurs ioniques ayant été établie bien avant celle des GPCR, l'importance fonctionnelle de l'existence d'une isomérisation conformationnelle de ces récepteurs a été supportée par de nombreuses études (Armstrong et al., 2003). En dépit de la vision monomérique des GPCR, longtemps en vigueur, différentes publications ont également rapporté les effets allostériques d'un ligand ou d'une autre protéine sur la fonction d'un GPCR. L'un des exemples les mieux étudiés de la modulation des propriétés de liaison d'un ligand à un GPCR reste celui de la protéine G (De Lean et al., 1980) mais d'autres protéines ont également été impliquées dans un phénomène similaire : les protéines RAMP [*Receptor activity modifying protein*; (Foord and Marshall, 1999; McLatchie et al., 1998)] et RCP [*Receptor component protein*; (Evans et al., 2000; Luebke et al., 1996)] dans le cas du récepteur CRLR, Homer (Ango et al., 2001) dans le cas du mGluR ou Calcyone (Lezcano et al., 2000) dans le cas du récepteur D1 dopaminergique, en sont des exemples. La description de l'effet allostérique d'un facteur X sensible au GTP sur les propriétés de liaison d'un ligand du récepteur β 2AR a donné lieu à l'énoncé d'un modèle ternaire (De Lean et al., 1980) mettant en jeu trois partenaires, H, R et X (H étant le ligand ou l'hormone, R le récepteur et X le facteur sensible au GTP qui s'est bien évidemment avéré être la protéine G par la suite). Son extension a des modèles plus complexes (Modèle ternaire étendu, ETC

(Samama et al., 1993), modèle ternaire cubique, CTC, (Weiss et al., 1996) ou modèle probabiliste (Onaran and Costa, 1997) ; revue de l'ensemble de ces modèles par (Kenakin, 2004)) ont permis de rendre compte de comportement plus complexes des GPCR tel que l'activité constitutive ou la notion d'agoniste inverse.

Le modèle ternaire (Ternary Complex Model)

Les premières études de liaison mettant en compétition un antagoniste radiomarqué et différents agonistes du β 2AR ont rapidement mis en évidence différentes populations du récepteur : une population présentant une haute affinité pour l'agoniste et une autre présentant une basse affinité pour ce dernier (Kent et al., 1980; Lefkowitz et al., 1976; Maguire et al., 1976). Le passage de la population de haute affinité vers une basse affinité dépend de la présence de Magnésium (Mg^{2+}) et de GTP et s'avère associée à l'augmentation de l'activité catalytique de l'AC (un des effecteurs du β 2AR) dépendante de l'agoniste (Stadel et al., 1980). Au contraire d'un modèle uni-moléculaire où le récepteur subit une isomérisation à l'issue de sa liaison au ligand, un modèle reposant sur une réaction bi-moléculaire entre le récepteur R et un composant membranaire X (la protéine G) permet de décrire plus adéquatement les propriétés de liaison ligand-récepteur (De Lean et al., 1980). La formulation mathématique de ce modèle ternaire est identique à celle de modèles préalablement proposés par De Haen, Boyenaems ou Jacobs (Références citées par (De Lean et al., 1980)) décrivant la théorie des récepteurs membranaires mobiles. Dans le cadre de tels modèles, à l'issue de sa liaison au ligand, le récepteur diffuse latéralement dans la membrane afin de rencontrer la protéine G pour laquelle il exhibe une affinité augmentée. La théorie du modèle ternaire de De Lean ne précise cependant pas si la rencontre du récepteur et de la protéine G est soumise à un événement aléatoire de type « collisionnel » ou si elle est, au contraire, circonscrite à des régions particulières de la membranes au sein desquelles récepteur et protéine G interagissent de manière plus ou moins stable (De Lean et al., 1980). La distinction pharmacologique entre un modèle où les différents partenaires, récepteur, protéine G, AC sont préalablement couplés (*pre-coupled model*) ou bien interagissent à l'issue de leur diffusion latérale

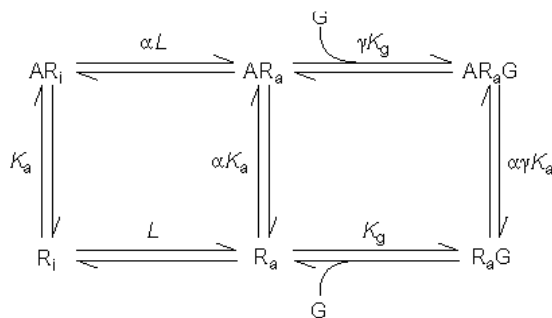
dans la membrane (*collisional model*) a fait l'objet de débats (Tolkovsky and Levitzki, 1978; Tolkovsky et al., 1982).

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, les données biochimiques produites au cours des trente dernières années suggèrent fortement que les différentes protéines d'une voie de signalisation soient le plus souvent circonscrites dans des zones particulières de la membrane ou microdomaines. La structure et l'intégrité de ces domaines reposerait à la fois sur les propriétés biophysiques des membranes et sur la capacité des protéines d'échafaudage à relier acteurs de la signalisation et réseau cytosquelettique. Qu'il s'agisse ou non d'une conséquence directe de cette compartimentation des membranes, nombres de données expérimentales suggèrent également que les protéines d'une même cascade de transduction s'organisent en complexes supramoléculaires ou signalosome (dans le cas des récepteurs, on parle aussi de réceptosome) très tôt à l'issue de leur synthèse (Rebois and Hebert, 2003). Ces observations semblent donc relativement incompatibles avec une vision collisionnelle du couplage moléculaire.

Modèle ternaire étendu et modèle cubique

L'avènement des techniques de clonage et l'utilisation de système de surexpression ont eu pour conséquence essentielle de permettre d'observer des phénomènes d'activité constitutive des récepteurs (Costa and Herz, 1989; Lefkowitz et al., 1993) ou encore de conceptualiser la notion d'agonisme inverse (Chidiac et al., 1994). En postulant que seul l'agoniste puisse mener à la formation d'un complexe ternaire, le modèle de De Lean ne permettait pas de décrire convenablement de telles situations. Ceci a donné lieu à la rationalisation d'un modèle étendu ou ETC (Samama et al., 1993) dans lequel le récepteur présente deux états, R_i ou R_a , en fonction de sa capacité à activer la protéine G (Fig 14). Chaque population arbore une affinité spécifique pour le ligand qui peut moduler en retour l'affinité du récepteur R_a pour la protéine G.

a) Modèle du complexe ternaire étendu étendu



b) Représentation cubique du modèle ternaire

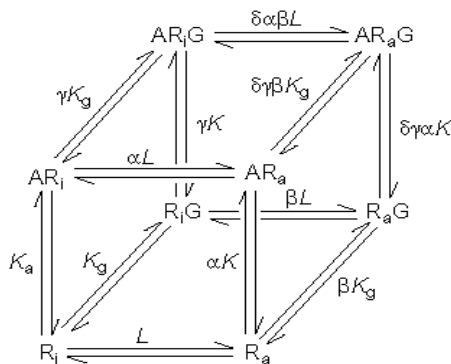


Figure 14. Modèle du complexe ternaire pour les GPCR.

A) Complexe ternaire étendu. Deux états différents du récepteur, inhibé (R_i) et actif (R_a) coexistent avec une constante d'équilibre allostérique L. La liaison de la protéine G à la forme active du récepteur R_a mène à la réponse physiologique. Le ligand A lie à chacune des formes du récepteur ainsi qu'à la forme R_a liée à la protéine G. La propensité du système à adopter spontanément une forme active est déterminée par L. L'affinité des ligands est donnée par la constante K_a et son efficacité par les deux termes a et g. a correspond à l'affinité du ligand pour la forme R_a du récepteur tandis que g correspond à l'affinité du complexe A/R_a pour la protéine G. (b) Représentation cubique du modèle du complexe ternaire. Les formes inactives du récepteur R_i et A/R_i peuvent dans ce cas interagir avec la protéine G sans pour autant conduire à un signal. b décrit l'affinité différentielle de la forme active du récepteur par rapport à sa forme inactive vis à vis de la protéine G (Kenakin, 2004).

Thermodynamiquement, le récepteur sous sa forme R_i devrait néanmoins être théoriquement capable d'interagir avec la protéine G. La prise en compte d'une telle situation a mené au développement d'un modèle plus complexe, le modèle cubique dans lequel le ligand peut moduler la liaison du récepteur à la protéine G, que le récepteur soit dans une forme active ou inactive (Weiss et al., 1996). Ce dernier modèle permet d'expliquer comment un antagoniste ou un agoniste inverse supposé lier préférentiellement la forme inactive (R_i) du récepteur, permet d'induire la formation d'un tri-complexe (LRG inactif) (Kenakin, 2004).

Le modèle probabiliste

Les différents modèles décrits ci-dessus permettent une description détaillée de l'efficacité d'un ligand donné mais nécessitent un nombre fini de conformations dans l'espace thermodynamique correspondant à chaque récepteur (Kenakin, 2004). Chaque conformation se voit attribuer une capacité de lier et d'activer la protéine G. Une approche totalement différente reposant sur une vision probabiliste (Onaran and Costa, 1997) pourrait permettre de décrire le comportement du récepteur sans une définition précise de ses différents états conformationnels. Dans ce modèle, le récepteur présente une multitude d'états dans un espace thermodynamique donné qui, à l'état basal se distribue de manière caractéristique (Fig 15). La liaison du ligand, de la protéine G ou de tout autre molécule modulant la conformation du récepteur, les protéines Homer (Ango et al., 2001) ou Calcyone (Lezcano et al., 2000) par exemples, va moduler la distribution des fréquences de ses différents états conformationnels. Un tel modèle permet également d'envisager les conséquences allostériques de l'oligomérisation des GPCR qui pourraient se révéler fonctionnellement très importantes (Bouvier, 2001; Christopoulos and Kenakin, 2002; Kenakin, 2004).

Cette vision probabiliste rejoint l'hypothèse relativement ancienne que toute protéine existe sous une forme d'états ou de sous états conformationnels présentant une distribution continue et dynamique (Frauenfelder et al., 1988) dont un échantillon va présenter une affinité pour un ligand donné. Cette notion d'ensemble

conformationnel fait également référence aux théories pionnières d'*energy landscape* ou de *funnel folding* (Freire, 2000; Wolynes, 1996) qui placent l'allostérie au cœur du mécanisme de repliement des protéines (Kern and Zuiderweg, 2003).

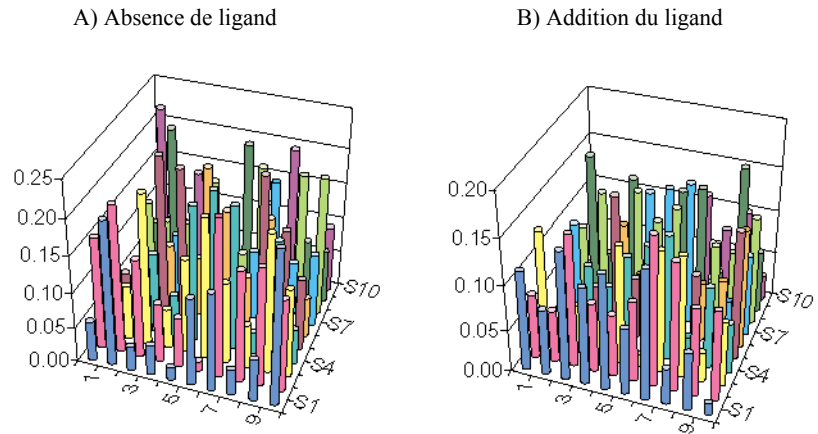


Figure 15. Modèle probabiliste.

Ce modèle suppose qu'à l'état basal le récepteur présente un panel de conformations constituant un champ conformationnel spécifiques de l'état inactif du récepteur. L'ajout du ligand va en modifier les propriétés en modulant la distribution de ces différentes conformations (Kenakin, 2004).

Quel que soit le type de modèle, ETC, CTC ou probabiliste, tous infèrent l'existence de différentes conformations du récepteur présentant une affinité différentielle vis à vis d'une variété de ligands (revue de littérature (Kenakin and Onaran, 2002)). Récemment, de plus en plus de données suggèrent l'existence d'un lien entre l'affinité d'un ligand, les champs conformationnels qu'il favorise et la nature des complexes protéiques associés à un récepteur (Azzi et al., 2003; Kohout et al., 2004; Martin et al., 2004; Rapacciuolo et al., 2003; Reversi et al., 2005; Rimoldi et al., 2003; Wei et al., 2003; Zamah et al., 2002). L'accès à la dynamique de ces champs conformationnels par l'intermédiaire des techniques de transfert de fluorescence (FRET ou BRET) inter ou intramoléculaire (Gales et al., 2005; Hoffmann et al., 2005) devrait permettre d'établir une corrélation de plus en plus solide entre les propriétés pharmacologique d'un ligand et la sous population spécifique de récepteur qu'il favorise. Ce type de données tendra certainement à un développement de médicaments de plus en plus spécifiques avec pour conséquence principale évidente d'en limiter les effets secondaires.

LOCALISATION MEMBRANAIRE

Le haut degré d'encombrement stérique dans le cytosol, la promiscuité des partenaires de signalisation et la stabilité de leur interaction au sein de complexes multimériques semblent fondamentalement déterminer l'efficacité de propagation et d'intégration de l'information dans les cellules. Dans un tel contexte, il est néanmoins difficile de définir comment le niveau de spécificité du signal constaté *in vivo* est atteint. Les avancées réalisées en génétique et en biologie cellulaire du développement ont apporté quelques indices à ce sujet et mis en exergue l'importance d'une composante spatio-temporelle essentielle à la régulation de la signalisation (Gonzalez-Gaitan, 2003; Miaczynska et al., 2004). Génétiquement, les gènes impliqués dans une même cascade de signalisation sont très souvent regroupés en cassette de gènes dans le génome et exprimés de concert (Pires-daSilva and Sommer, 2003). L'établissement rapide de cascades de signalisation complètes à une étape précise du développement d'un tissu pourrait trouver une explication élégante dans ce phénomène de *synexpression* (Niehrs and Pollet, 1999). Biochimiquement, la localisation précise des acteurs de la signalisation intracellulaire est également essentielle. Chez la mouche, le développement harmonieux des tissus épithéliaux ou de structures telles que l'œil, est en partie dépendante de la localisation cellulaire du récepteur Frz. Au cours du développement de l'aile, sa délocalisation du pôle distal du cortex apical des cellules, à l'issue de sa surexpression par exemple, conduit à une désorganisation de l'épithélium et au développement d'une aile présentant des poils orientés ératiquement (Schweisguth, 2004). Le récepteur Smo illustre également un contrôle étroit et dynamique de la localisation des acteurs des voies de signalisation. En présence de Hg, la translocation de Smo d'un compartiment endosomal vers la membrane plasmique, mène à l'activation de l'expression de gènes cibles du développement antéropostérieur qui sont évolutivement très conservés. La présence constitutive de mutants de Smo à la membrane plasmique (Zhu et al., 2003) conduit, entre autre, à l'apparition de carcinomes chez l'homme (Xie et al., 1998).

Cette régulation fine de la localisation intracellulaire de Smo dévoile l'existence d'un équilibre crucial entre séquestration et co-localisation des partenaires de la

signalisation. Elle illustre également l'importance de la dynamique des complexes de signalisation. Bien que le détail d'un tel mécanisme de contrôle reste mal défini, la caractérisation toujours plus détaillée des déterminants moléculaires de la structure dynamique des membranes et des propriétés des protéines modulant celle-ci a néanmoins permis des avancées majeures dans notre compréhension des liens existant entre signalisation et localisation. C'est le thème de la section qui suit.

LES MEMBRANES CELLULAIRES

Limite physique des cellules, la membrane plasmique constitue une cuirasse protégeant la cellule des transformations de son environnement tout en permettant les échanges de matières et d'informations nécessaires à sa survie. Comme les autres membranes cellulaires (dans les cellules eucaryotes), elle assure également un rôle essentiel de compartimentation et rend possible l'existence d'une composition différentielle des environnements qu'elle sépare.

La fonction des protéines membranaires, telles que les GPCR, va être étroitement liée à la nature et l'identité de la membrane au sein de laquelle elles sont enchâssées. Simultanément à leur synthèse, elles sont transloquées au sein de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) au niveau d'un pore aqueux formé par le complexe protéique sec61. Au sein du réticulum, la protéine soluble Bip/GRP78, membre de la famille Hsp70 (la plus abondante des chaperones du ER) s'associe avec ce translocon et assure un transfert unidirectionnel de la protéine naissante dans la membrane et le lumen (Matlack et al., 1999). Agissant séquentiellement avec les protéines calnexines et calréticulines, elles va également veiller au repliement adéquat de chaque protéine (Kaufman, 2004). Lorsque la protéine ne remplit pas les critères de qualité nécessaires à son transport ultérieur, elle est dés-enchâssée ou retro-transloquée de la membrane du RE (Tsai et al., 2002) puis dégradée au niveau d'un complexe protéique, le protéasome. Lorsque par contre, la protéine acquiert une conformation appropriée, elle est transportée vers un compartiment cible correspondant à son lieu d'action, qu'il s'agisse de la membrane plasmique ou de tout autre organelle. Sa présence n'est néanmoins que transitoire dans ce compartiment. En fonction des conditions, la protéine va être passivement (ex : récepteur de la

transférine) ou activement retirée de ce dernier (ex : récepteurs tyrosines kinases (RTK) ou GPCR en présence de leur ligand respectif) pour y être ultérieurement re-localisée (voie de recyclage) ou encore pour être dégradée par les machineries lysosomales ou protéasomales (voie de dégradation) (Rodriguez-Boulan et al., 2005). Les éléments définissant la dynamique du transport d'une protéine membranaire au cours des différentes étapes de son cycle de vie sont multiples. Sa capacité d'interaction avec les composants structuraux des membranes, le réseau protéique sous-membranaire constitué du cytosquelette et de protéines d'échafaudage ou encore la machinerie de transport membranaire vont en être des déterminants essentiels. En outre comme nous le verrons tout au long de ce paragraphe, en modifiant l'activité ou les interfaces d'interaction des protéines, les modifications post-traductionnelles (ex : glycosylation, palmytilation, isoprénnylation, myristoylation, phosphorylation, ubiquitination, nitrosylation...etc) vont également participer à la régulation de la localisation des protéines membranaires et de la signalisation. A ce sujet, un intérêt tout particulier sera donné au phénomène d'ubiquitination.

Composition et organisation des membranes biologiques

Protéines et lipides sont les composants chimiques principaux des membranes cellulaires. Les propriétés physico-chimiques des molécules de lipides vont en déterminer plusieurs caractéristiques dont leur organisation générale en bicouche. A la différence des membranes modèles, l'organisation des membranes biologiques est néanmoins maintenue dans un état très éloigné des conditions d'équilibre. Elles vont présenter à la fois une asymétrie transversale et une organisation latérale hétérogène.

Distribution asymétrique des lipides membranaires

La composition lipidique de chacun des feuillettes de la bicouche lipidique est différente et varie en fonction de la nature de la membrane considérée. Il existe environ 500 espèces de lipides dans les membranes. Ils peuvent être regroupés en trois familles principales chez les mammifères : glycéro-phospholipides, sphingolipides (SL) et cholestérol (Devaux and Morris, 2004). Glycéro-

phospholipides [dont les principaux sont les phosphatidyl-choline (PC), -sérine (PS) et -éthanolamine (PE)] et SL sont substitués par des acides gras dont la longueur et le niveau de saturation des chaînes aliphatiques est variable. Dans les érythrocytes, PS et PE sont essentiellement concentrés dans le feuillet interne de la membrane plasmique tandis que PC et SL se retrouvent exclusivement dans le feuillet externe (Devaux, 1991; Devaux and Morris, 2004). Les phosphatidyl-inositol (PI), constituants mineurs des membranes (ils représentent moins de 1% de l'ensemble des molécules lipidiques) sont quant à eux essentiellement localisés dans le feuillet membranaire interne (De Matteis and Godi, 2004). La distribution asymétrique des lipides dans les membranes est assurée par différentes protéines, des flippases et des translocases (Holthuis and Levine, 2005). Les phospholipases et les lipides kinases (ex : Phosphatidyl kinases) en modifiant localement la nature des lipides vont également en influencer la concentration (De Matteis and Godi, 2004). Si phospholipides, céramides (le squelette moléculaire des sphingolipides) et cholestérol sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, la synthèse des différents sphingolipides (sphingo-myéline et sphingo-glycolipides) s'effectue au niveau de l'appareil de Golgi (van Meer and Sprong, 2004). Ces molécules dont l'accumulation dans la membranes débute dans la région trans-Golgienne, se retrouvent essentiellement au niveau de la membrane plasmique et des endosomes. Dans le cas du cholestérol, sa localisation est déterminée par son affinité pour les sphingolipides et glycérophospholipides saturés et sa diffusion libre au travers de la bicouche lipidique (van Meer and Sprong, 2004). Finalement, la localisation des différentes espèces de PI résulte d'une régulation complexe reposant sur l'activité de kinases et de phosphatases précisément localisées dans la cellule (Wenk and De Camilli, 2004; De Matteis and Godi, 2004). Cette répartition spécifique pourrait avoir plusieurs rôles : définir l'identité des domaines membranaires, constituer un moyen de communication entre les organelles ou encore assurer une directionnalité au transport membranaire (Caroni, 2001; Wenk and De Camilli, 2004). Dans tous les cas, la distribution précise de l'ensemble de ces molécules de lipides et leur capacité de liaison et de régulation de l'activité de nombreuses protéines, leur confère un rôle crucial en terme de signalisation. L'exemple des adaptateurs de clathrine, AP1 et

AP2, impliqués dans la génération de vésicules membranaires permettant le transport de protéines cargos entre différents compartiments cellulaires illustre cette notion. Leur rôle différentiel dans la voie d'export du Golgi vers la membrane plasmique ou dans le processus d'internalisation de la membrane plasmique vers les endosomes précoces, respectivement, reposerait sur leur affinité pour des espèces de PI spécifiques. AP1 lierait préférentiellement les PI4P (Wang et al., 2003) enrichis au niveau du trans-Golgi et des vésicules d'exocytose, tandis que AP2 lierait plus spécifiquement les PI(4,5)P (Collins et al., 2002) présents dans la membrane plasmique.

L'organisation des lipides dans la membrane

Au contraire des stérols dont le corps cyclique et rigide présente une nature hydrophobe intrinsèque, l'hydrophobicité des autres classes de lipides est déterminée par la chaîne hydrocarbonée des acides gras qui les substituent. Les acides gras sont caractérisés par des chaînes aliphatiques de 12 à 24 carbones dont la longueur et le niveau d'insaturation va déterminer le point de fusion (T_M) des molécules qu'ils substituent. A longueur de chaîne égale, le point de fusion est d'autant plus bas que la chaîne est insaturée. A niveau d'insaturation équivalent, le T_M est d'autant plus bas que la chaîne est courte. Il existe ainsi un parallèle entre le T_M des lipides d'une membrane et le niveau de fluidité observée de cette membrane.

La nature des acides gras et du groupement polaire exhibé par une molécule lipidique lui confère un volume stérique ou une forme particulière (cône, cône inversé ou cylindre). In vitro, les différents lipides vont ainsi spontanément s'associer en une bicouche phospholipidique dont l'organisation latérale tend à minimiser l'énergie libre selon un principe logique de compensation de forme (Chernomordik et al., 1995). En fonction de leur forme, de leur T_M , de la température, de la concentration et des conditions d'hydratation, les lipides vont adopter des agencements ou phases de types lamellaires ($L\alpha$ ou L_D , phase désordonnée ou $L\beta$ ou L_O , phase ordonnée) qui sont les plus fréquemment retrouvées dans les membranes biologiques et des phases de types H_I ou H_{II} (micelles ou micelles inversées), essentielles lors des fusions membranaires observées au cours du transport vésiculaire par exemple (Fig 16).

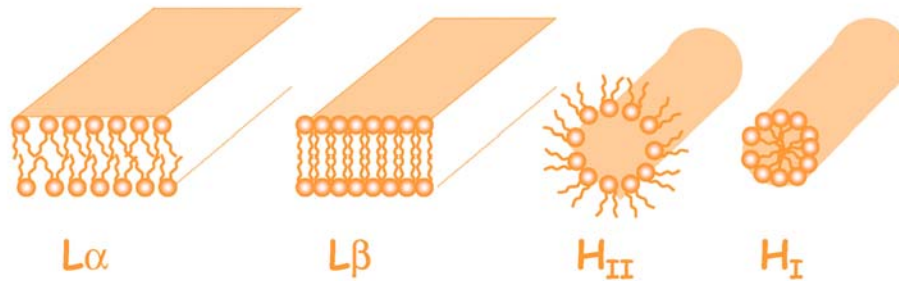


Figure 16. représentation schématique des différentes organisations adoptées par les molécules de lipide

La courbature élevée des membranes vésiculaires ou les remaniements nécessaires à la fusion membranaire vont être favorisées par des lipides présentant des forme non cylindriques tels que l'acide phosphatidique (H_{II}), les lysophospholipides (H_I) ou les acides gras (H_{II}) (Farsad and De Camilli, 2003; Wenk and De Camilli, 2004). Au contraire, des lipides présentant une forme cylindrique vont avoir tendance à s'organiser en un arrangement lamellaire ($L\alpha$ ou $L\beta$). Les sphingolipides en sont un exemple. Dans le cas du cholestérol, sa structure particulière lui confère la capacité d'induire des remaniements dans l'organisation des lipides membranaires en favorisant la transition des bicouches vers des structures de type micellaire (L vers H). La régulation dynamique et locale de la concentration de certains lipides (notamment les lysophospholipides et l'acide phosphatidiques) par l'intermédiaire des différentes phospholipases A2 (de Figueiredo et al., 2001), C (Basanez et al., 1997) ou D (Ktistakis et al., 1996) va ainsi se révéler essentielle dans le contrôle des phénomènes de transport membranaire.

Les microdomaines membranaires

En plus de maintenir une asymétrie transversale des membranes, les protéines, associées ou enchâssées dans les membranes, vont également influencer l'organisation latérale des lipides (Murata et al., 1995; Rothberg et al., 1992). La

cavéoline ou la protéine NAP-22 en liant le cholestérol avec une haute affinité, induisent par exemple son accumulation locale autour du site d'interaction de la protéine avec la membrane (Epanand et al., 2001). Les protéines de la famille tétraspanine (ex : CD81), essentielles au développement de la synapse neuromusculaire chez la drosophile ou à l'activation des lymphocytes T ou B en réponse à la présence d'un antigène régulent l'organisation latérale de la membrane en créant à la fois un réseau d'interactions protéiques et protéo-lipidiques (Hemler, 2003). Lipides et protéines membranaires maintiennent ainsi activement une structure hétérogène et dynamique des membranes cellulaires tant transversalement que latéralement.

Les rafts

Les modèles d'organisation latérale des membranes biologiques ont considérablement évolué au cours des trente dernières années. La mosaïque fluide au sein de laquelle protéines et lipides diffusaient passivement (Singer and Nicolson, 1972) s'est vu transformée en une mosaïque de microdomaines protéo-lipidiques de natures et de structures différentes (Mayor and Rao, 2004). Une telle compartimentalisation présageant de conséquences importantes sur l'organisation des voies de signalisation, la structure fondamentale de ces microdomaines et leur fonction dans la signalisation ont donc fait l'objet de recherches intenses.

Parmi les différents microdomaines, ceux ayant été les plus étudiés sont incontestablement les rafts. Caractérisés par leur composition en lipides substitués par des groupements acyles saturés (par exemple les SL) et en cholestérol, ils présentent une organisation lipidique de type L β (Fig 16). La séparation entre ces zones ordonnées et les régions plus fluides des membranes mènerait à une organisation latérale discontinue de la bicouche lipidique et à la formation de microdomaines. Cette vision reste néanmoins théorique puisque la coexistence de phases distinctes dans une bicouche lipidique, fondamentale à la théorie des rafts, n'a été détectée qu'*in vitro* dans des membranes artificielles. Dans les membranes natives, l'existence de ces microdomaines reste donc âprement discutée en raison notamment des difficultés techniques rencontrées pour les mettre en évidence. L'évolution de la

notion de rafts étant absolument indissociable des méthodologies employées pour les étudier, il apparaît donc essentiel de les présenter en détail.

Les méthodes de purification biochimique des rafts

Environnements rigides, la grande majorité des protéines est exclue de ces espaces lipidiques qui présentent ainsi une densité inférieure à celle des zones plus fluides de la membrane, beaucoup plus riches en protéines. En outre, l'organisation moléculaire ordonnée de ces domaines leur confèrent une résistance à la solubilisation par des agents détergeants non ioniques, tel que le TritonX100.

Ce sont sur ces deux qualités, résistance aux détergeants et faible densité, qu'à reposer le développement de la première technique biochimique de purification de ces microdomaines. Cette dernière peut être décrite en deux étapes, une lyse des composants membranaires à l'aide de TritonX100 puis leur résolution sur un gradient de densité. Cette méthode permet donc de purifier préférentiellement les fractions de la membrane présentant une résistance aux détergeants ou DRM. Aujourd'hui encore, cette méthode reste très utilisée. Cependant, la propriété des détergeants à induire la formation *de novo* de phases ordonnées dans les membranes solubilisées a conduit au développement d'une deuxième génération de méthodes de purification des rafts n'utilisant pas d'agents détergeants. Développées principalement par les groupes de Lisanti (Song et al., 1996) et Anderson (Smart et al., 1995), ces méthodes tirent parti de la résistance mécanique des phases lipidiques ordonnées à la déstabilisation induit par des traitements comme la sonication. A l'image de la méthode précédente, une seconde étape de gradient de densité est ensuite effectuée pour dissocier les fractions et compléter la purification. Dans ce cas, les fractions membranaires purifiées sont caractérisées par leur richesse en cholestérol et en sphingolipides (CEM).

Que la technique de purification repose ou non sur l'utilisation de détergeants, les fractions de faible densité vont être enrichies en molécules considérées comme caractéristiques des rafts dans les membranes biologiques, telles que les sphingolipides GM1 ou GM3 ou encore les protéines telles que la caveoline ou la flottiline (Simons and Ikonen, 1997; Song et al., 1996; Smart et al., 1995). Par contre, la répartition des protéines membranaires, récepteurs et autres protéines cytosoliques

associées aux membranes, vont dans certains cas considérablement diverger en fonction de la technique utilisée. La distinction des termes DRM et CEM sera ainsi essentielle dans la suite de ce travail.

Le recouplement de la taille des fragments membranaires purifiés à l'aide de ces différentes méthodes et celles de rafts particuliers de la membrane, les caveolae, visualisées par microscopie électronique (Rothberg et al., 1992), a conduit à l'hypothèse initiale que les rafts étaient des domaines d'environ 50 à 100 nm de diamètre (Simons and Ikonen, 1997; Dietrich et al., 2002; Pralle et al., 2000) (Fig 17). Ces prédictions ont néanmoins dû être revues avec le développement de techniques de fluorescence permettant d'étudier la distribution des composants des rafts dans des membranes natives.

Etude des rafts en condition native par la technique de FRET

En toute logique une organisation membranaire discontinue devrait s'accompagner d'une répartition hétérogène des protéines théoriquement résidentes des rafts, comme par exemple les protéines ancrées par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Brown and Rose, 1992). Ces hypothèses ont néanmoins été infirmées par plusieurs études s'intéressant à la répartition de ces protéines dans des membranes natives à l'aide de technique de FRET (Transfert d'énergie de résonance par fluorescence) (Kenworthy et al., 2000; Nichols, 2003a; Sharma et al., 2004; Varma and Mayor, 1998). Toutes ont conclu à une répartition relativement homogène des protéines liées à un GPI dans les membranes natives, qui seraient tout au plus regroupées en petits complexes protéiques. La détection de FRET entre différentes protéines de type GFP modifiées par un groupement GPI (Sharma et al., 2004) serait en effet consistante avec une organisation de ces protéines en complexes d'environ 10nm de diamètre (le rayon permissif pour détecter du FRET est d'environ 10nm) pouvant contenir entre 4 ou 5 protéines différentes. La présence de ces multimères dans des zones de la membrane riches en cholestérol est en outre corrélée par la sensibilité du signal de FRET à la concentration membranaire en cholestérol (Sharma et al., 2004).

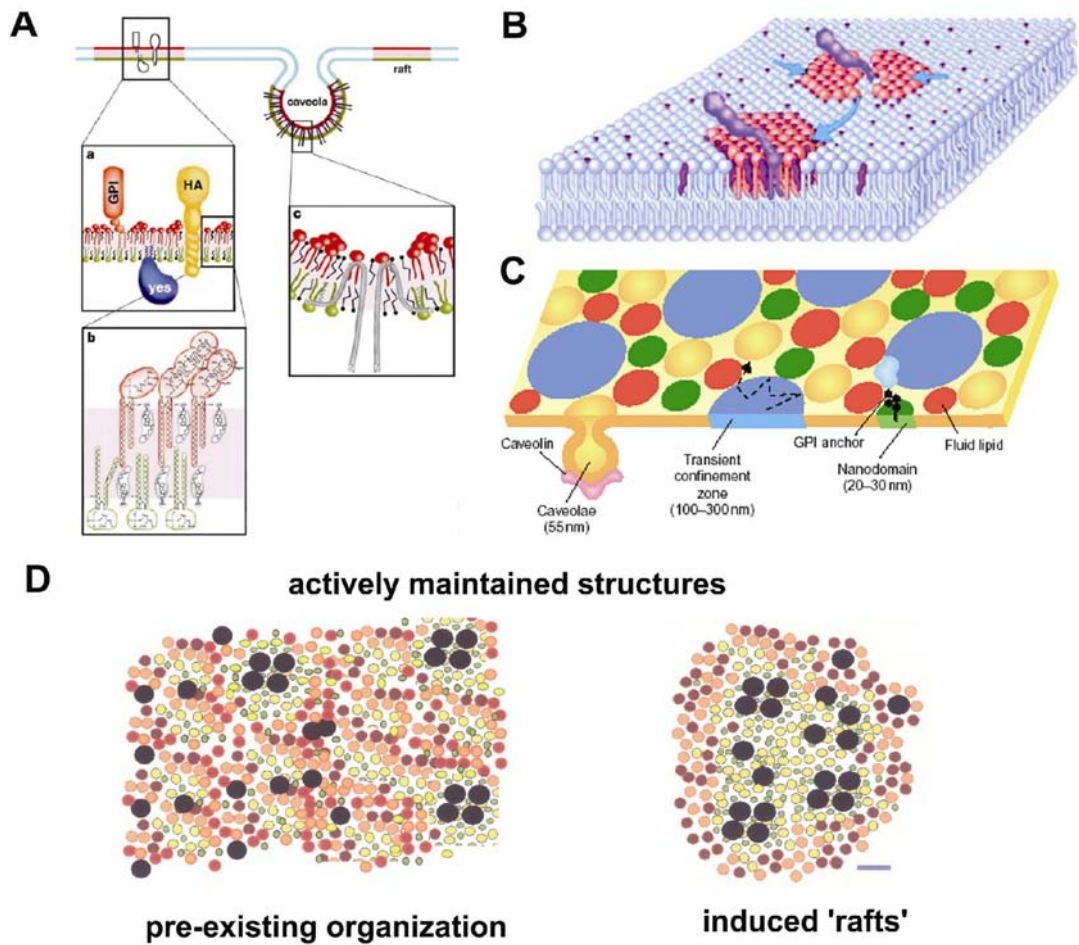


Figure 17. Les hypothèses concernant la structure et la régulation des rafts.

A) Représentation schématique de l'organisation des rafts et des caveolae membranaires la plus couramment citée (Simons and Ikonen, 1997). Dans ce modèle, les rafts sont décrits comme des structures relativement larges d'environ 50nm enrichis en cholestérol et en sphingolipide (SL). B) Anderson & Jacobson (Anderson and Jacobson, 2002) ont proposé une vision alternative des rafts qui seraient constitués de l'assemblage dynamique de complexes protéiques comprenant une dizaine de molécule encapsulées dans une coque lipidique (théorie des *lipid shells*) constituée préférentiellement de cholestérol et SL. Le recrutement de ces modules rafts pourrait être soumis à une régulation dynamique. C) Un autre point de vue est que la membrane est dans une large mesure constituée de rafts présentant diverses caractéristiques. L'ensemble de ces rafts va créer une mosaïque de microdomaines dont la proportion est dépendante de la concentration en cholestérol (Maxfield, 2002). D) Modèle est consistant avec les observations de la distribution latérale de protéines ancrées par un groupement GPI dans des cellules vivantes (Sharma et al., 2004). Il suggère que les protéines GPI existent à l'état basal sous une forme multimérique de type lipid shell qui co-existe avec des formes monomériques. La stabilisation de structures rafts de dimension plus large pourrait ainsi être activement régulée. Cercles noirs, protéines ancrées par un GPI; cercle rouge et rose, phospholipides préférant les zones non ordonnées; cercles jaunes, lipides associés aux rafts; vert, cholestérol. Barre d'échelle 5 nm. (Figure tirée de (Mayor and Rao, 2004) avec la permission des éditions *Blackwell Synergy*).

En réfutant l'existence de domaines stables de plusieurs dizaines de nm dans les membranes biologiques, comme cela été initialement proposé par le groupe de Simons (Simons and Ikonen, 1997), ces résultats viennent supporter la vision constellée des rafts imaginées par Anderson et Jacobson (Anderson and Jacobson, 2002) (Fig 17). Dans ce modèle, l'affinité de petits groupes de protéines pour des molécules de sphingolipides ou de cholestérol induirait la formation d'une coque lipidique (Théorie des *Lipid Shell*) localement ordonnée. L'association transitoire de ces structures unitaires de raft ou nanorafts, génèrerait des complexes protéolipidiques d'ordre supérieur, les rafts. Les rafts seraient néanmoins des structures très dynamiques. Cette idée est consistante avec la difficulté de détecter des agrégats de taille importante de protéines ancrées par un groupement GPI dans les membranes natives (Kenworthy et al., 2000; Nichols, 2003a; Sharma et al., 2004; Varma and Mayor, 1998). La démonstration que les diffusions latérales d'une protéine majoritairement associée aux rafts, CD59, et d'une molécule lipidique typiquement exclue des phases ordonnées, DOPE (dioleylephosphatidylethanolamine) sont identiques (Vrljic et al., 2002), peut également supporter cette vision dynamique et transitoire des rafts. Des résultats très similaires ont également été rapportés par le groupe de Lippincott-Schwarz (Kenworthy et al., 2004).

Il n'a certainement pas échappé au lecteur que l'ensemble de ces observations sont parfaitement compatibles avec l'absence pure et simple de rafts dans les membranes natives. Ce paradoxe récurrent s'agissant de l'existence des rafts d'un point de vu fondamental se heurte néanmoins à l'accumulation de données suggérant l'importance des rafts en terme biologique, notamment dans les mécanismes de transduction du signal. Dans l'une de ses dernières revues de littérature, Edidin n'a d'ailleurs pas manqué de souligner avec élégance ce paradoxe :

«Despite great reservations about the interpretation of classical operational definition of lipid raft components and function, we are left with ... the stubborn insistence by cells that raft lipids can be organized and segregated into membrane domains.» (Edidin, 2003)

Malgré les dissensions inhérentes à l'hypothèse des rafts, l'existence de ces microdomaines dans la membrane sera considérée dans la suite de ce travail, comme un prédicat aux différents raisonnements qui y seront développés.

La diversité des rafts

In vitro, des liposomes présentant une composition lipidique similaire à celle de chacun des feuillet membranaires arborent des organisations lipidiques distinctes. Une composition riche en SL, cholestérol et en phospholipides saturés, semblable à celle du feuillet externe, s'accompagne d'une coexistence de phases liquides L_D et L_O . Au contraire, aucune phase ordonnée n'est décelable avec une composition lipidique semblable à celle du feuillet interne (Wang and Silvius, 2001). La composition asymétrique des membranes résulte donc probablement en une asymétrie structurale de ces dernières.

Dans ce contexte, il est donc difficile d'expliquer le fait qu'une multitude de protéines cytosoliques s'associent à des structures du feuillet membranaire interne et exhibent des distributions membranaires semblables à celles des protéines résidentes des rafts. Parmi elles, la petite protéine G de la famille ras, H-ras, dont le groupement prényl-cystéine estérifié par un groupement méthyl (farnésylation) l'ancre à la membrane. Dans son état inactif, H-ras est associée à des fractions membranaires de faible densité (CEM) sensibles aux détergeants (Roy et al., 1999). Cette distribution dépendante du cholestérol se distingue de celle d'un mutant constitutivement actif de H-ras, H-rasG12V, et d'un isotype, K-ras, liés préférentiellement à des fractions membranaires de densité supérieure (Niv et al., 2002; Prior et al., 2001). Récemment, la capacité de chacune de ces trois protéines à se regrouper au niveau de microdomaines du feuillet membranaire interne a été visualisée par microscopie électronique (Prior et al., 2003). L'analyse statistique de leur distribution spatiale respective a indiqué que H-ras était préférentiellement concentrée au niveau de microdomaines de 40nm de diamètre, sensibles au cholestérol, au contraire de ceux associés aux protéines H-rasG12V et K-ras. Cette localisation de H-ras dans des régions circonscrites du feuillet interne sensibles au cholestérol est également supportée par la détection de FRET entre des protéines GFP modifiées de manière similaire à H-ras en fonction de la concentration membranaire en cholestérol (Zacharias et al., 2002).

Ces différentes données supportent donc l'idée qu'il existe dans le feuillet interne des membranes des microdomaines membranaires. En raison de la composition hétérogène des deux feuillets membranaires, ces microdomaines ne sont vraisemblablement pas enrichis en sphingolipides et cholestérol. Néanmoins, ils semblent être en mesure de conférer aux protéines cytosoliques qui leur sont associées des propriétés biochimiques et biophysiques relativement similaires à celles des protéines classiquement considérées comme résidentes des rafts, dans le feuillet externe.

Si la nature précise des microdomaines liant la protéine H-ras reste à définir, certaines régions de la membrane caractérisées morphologiquement illustre concrètement l'existence de microdomaines dans le feuillet interne, c'est le cas des caveolae.

Les caveolae

Supportant l'existence de rafts de nature diverse dans les membranes, ces structures invaginées sont caractérisées par leur enrichissement en cholestérol, SL et en caveoline (Rothberg et al., 1992) et se retrouvent dans de nombreux types cellulaires (Anderson, 1998). En plus d'être présentes à la membrane plasmique, la caveoline va également être localisées dans des structures intracellulaires spécifiques présentant un pH neutre définies sous le terme général de caveosome (Nichols, 2002a; Pelkmans et al., 2001). La caveoline compte trois isoformes (1, 2 et 3; 1 et 3 présentent une bonne identité de séquence contrairement à l'isoforme 2) qui vont essentiellement se différencier par leur pattern d'expression tissulaire (Razani et al., 2002). La caveoline 1 et 2 sont relativement ubiquitaires contrairement à la caveoline 3 préférentiellement exprimée dans les muscles cardiaques, striées et lisses (Tang et al., 1996; Song et al., 1996). La caveoline 1, l'isoforme de loin le plus abondant, présente une topologie non conventionnelle en épingle à cheveux constituée d'un domaine intra-membranaire séparant ses deux extrémités n- et c-terminales cytosoliques (Fig 17; (Kurzchalia et al., 1992)). Sa liaison au cholestérol et sa multimérisation atypique en polymère constitué de 16 cavéolines stabiliseraient la forme invaginée caractéristique des caveolae (Fernandez et al., 2002; Murata et al.,

1995) (Fig 17). L'association à la membrane de ces complexes de caveoline seraient en outre relativement statique et l'échange des monomères de caveoline entre eux serait très limité (Fernandez et al., 2002). La caveoline va également pouvoir interagir avec d'autres protéines présentant une localisation préférentielle dans les structures caveolae, les flotillines (Bickel, 2002) qui semblent suffisantes pour induire une invagination membranaire similaire à celle observée avec la caveoline. Comme nous le verrons dans le cas de la translocation du transporteur de glucose Glut4 dépendante de l'insuline, la flotilline, comme la caveoline, pourraient avoir un rôle régulateur important en terme de transduction du signal (Bickel, 2002; Kanzaki and Pessin, 2003).

Signal transmembranaire et rafts

L'existence de microdomaines présentant des compositions et des organisations moléculaires hétérogènes de part et d'autre de la membrane suggère une certaine indépendance structurale des deux feuilletts lipidiques. Cette notion est confirmée par l'absence de recouvrement des distributions spatiales de deux GFP, l'une modifiée par un groupement GPI et ancrée sur la face externe de la membrane, l'autre cytosolique, modifiée avec un motif CAAX farnésylé et palmitoylé (Prior et al., 2003). Ce manque de complémentarité entre les deux feuilletts membranaires semble incompatible avec un transfert de signal efficace entre les faces externes et internes de la membrane. L'exemple du mécanisme de recrutement de la tyrosine kinase de la famille src, Lyn, au récepteur FcεRI (un récepteur transmembranaire aux IgE exprimé chez certaines cellules hématopoïétiques) est ainsi très informatif quant à la nature des mécanismes moléculaires capables d'assurer la cohésion des deux feuilletts membranaires lors de la transduction du signal.

A l'état basal, FcεRI et Lyn sont associés de façon importante aux rafts. Pourtant, leur colocalisation membranaire est minime et seul le tiers des récepteur co-immunoprécipitent avec Lyn (Pyenta et al., 2001) (Fig 18A). En présence d'IgE, le récepteur subit une multimérisation et recrute massivement la kinase Lyn.

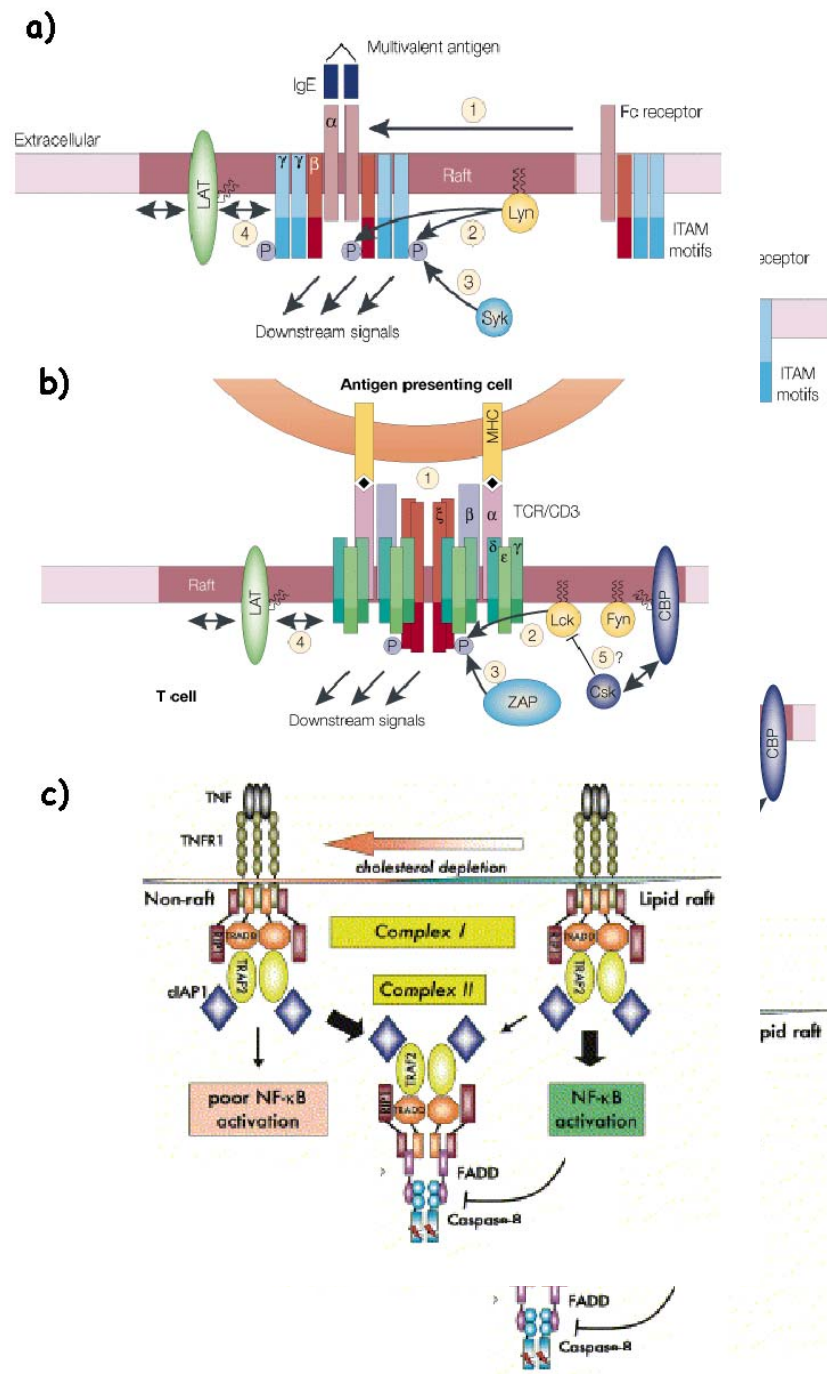


Figure 18. Importance des rafts au cours de la réaction lymphocytaire.

Le recrutement dans les rafts des tyrosines kinases de la famille Src, Lyn dans le cas du FcεRI (a), Lck ou Fyn dans le cas du TCR (b), va être essentiel à l'activation subséquente des voies de signalisation couplés à chacun de ces deux récepteurs (Cherukuri et al., 2001). c) Le recrutement du TNFR dans les rafts est également essentiel à la réponse lymphocytaire. Sa localisation dans les rafts va potentialiser l'activation de la voie NFκB et de l'apoptose par ce récepteur (Legler et al., 2003) par l'intermédiaire d'un complexe comportant la protéine TRAF2 (Muppidi et al., 2004).

Ce phénomène s'accompagne de l'augmentation de son association aux rafts et de la propagation du signal.

L'agrégation des récepteurs transmembranaires par l'anticorps favoriserait la stabilisation d'un foyer lipidique ordonné, créant une zone de haute affinité pour les molécules arborant une partition préférentielle dans les phases L_O telle que Lyn. Ce phénomène générerait ainsi la force motrice nécessaire à la coalescence transitoire des deux feuilletts membranaires et au couplage transmembranaire (Subczynski and Kusumi, 2003). Un mécanisme de couplage similaire peut ainsi être imaginé dans le cas de l'activation d'autres récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire, les récepteurs des lymphocytes T (TCR), B (BCR) ou encore le récepteur du TNF (TNFR; Tumor necrosis factor) (Fig 18).

Dans le cas où la coalescence transversale des rafts est induite par l'agrégation de protéines modifiées par un GPI, le mécanisme de couplage entre les deux feuilletts membranaires semble moins clair. Il a cependant été proposé que les chaînes aliphatiques saturées et très longues (24 carbones) retrouvées chez certains sphingolipides du feuillet externe, puissent supporter ce couplage transmembranaire en pénétrant partiellement dans le feuillet lipidique adjacent (mécanisme d'interdigitation lipidique) (Wang and Silvius, 2001).

Raft et signalisation

Des problèmes méthodologiques intrinsèques

Initialement identifiée comme un déterminant du potentiel oncogénique du virus du sarcome de Rous (Glenney, Jr., 1989; Glenney, Jr. and Zokas, 1989), la caveoline symbolise l'importance potentielle des caveolae et par inférence des rafts dans la régulation de la signalisation. Consistant avec cette notion, un nombre très important de protéines, récepteurs (Tableau 3) et effecteurs (Simons and Toomre, 2000), impliquées dans la signalisation semblent localisées dans des structures de types rafts ou caveolae à un moment ou un autre de leur cycle de vie cellulaire.

Tableau 3. Détails des propriétés d'association de divers récepteurs aux rafts.

| Récepteur | DRM | CEM | Ligand | Liaison à Cav. | Localisation (ME) | Internalisation | Références |
|--------------------|-------------------|----------|----------|-----------------|-------------------|-----------------|---|
| EGF | + ~60% | + | + | + | ? | + | Minea 1999 JBC; LiuP 1996 JBC; Hur 2004 JBC; Couet 1997 JBC; Sigismund 2005 PNAS; Puri 2005 MBC |
| Insulin | - | + | ? | + | ? | ? | Borg 1999 FA SEB; J; Vainio 2002 EMBO Rep; Yamamoto 1998 JBC |
| EphR | + | ? | ? | ? | ? | ? | Bruckner 1999 Neuron |
| NGF | + | ? | ? | ? | ? | ? | Huang 1999 JBC |
| PDGF | + | ? | ? | + | ? | ? | Liu 1996 JBC; Yamamoto 1999 Exp Cell Res |
| BDNF | + | ? | ? | ? | ? | ? | Günland 2004 Neuron |
| PCRF | + | ? | ? | ? | ? | ? | Montxi 1998 EMBO; Viola 1999 Science |
| TCR | + | ? | + | ? | ? | ? | Sheets 1999 JCB |
| FcεRI | + | ? | + | ? | ? | ? | Legler 2003 Immunity |
| TNF | + | ? | + | ? | ? | ? | Muppidi 2004 NImmuno |
| Fas | + | ? | + | ? | ? | ? | Di guglielmo 2003 NCB; Razani 2001 JBC |
| TGF | ? | ? | + | + | ? | + | Lasley 2000 JBC; Gines 2001 Mol Pharm |
| Adénosine A1 | ? | Variable | Variable | + | + | + | Ishizaka 1998 Hypertension; Ushimo Fukai 2001 BC |
| Ang II type 1 | + <10% | Variable | Variable | + | Non | ? | Fujita 2001 Cardio Res; Dreja 2002 ATVB |
| α1-adrénergique | ? | Variable | ? | + | ? | ? | Schwencke 1999 JCB; Xiang 2002 JBC; Rybin 2001 JBC; Ostrom 2001 JBC; |
| β1-adrénergique | ? | Variable | Non | Variable | ? | + | Rappaciolo A 2003 JBC |
| β2-adrénergique | ? | Variable | - | Variable | ? | ? | Schwencke 1999 JCB; Xiang 2002 JBC; Rybin 2001 JBC; |
| Bradykinin 1 | - | - | Variable | ? | ? | ? | Ostrom 2000 Mol Pharm |
| Bradykinin 2 | - | - | Variable | ? | ? | ? | Lamb 2002 Biochemistry |
| Calcium receptor | ? | + | Variable | ? | ? | + | Sabourin 2002 Mol Pharm |
| CCR2 | ? | ? | ? | + | ? | ? | De Weerd 1997 JBC; Haaseman 1998 JCS |
| CCR5 | 11-18% | ? | ? | ? | ? | ? | Kifar 1998 JBC |
| CXCR4 | - | ? | ? | ? | ? | Variable | Manes 2001 Semm Immuno |
| EDG1 | - | + | + | + | ? | ? | Manes 1999 EMBO J |
| Endothéline A | ? | ? | ? | + | ? | ? | Manes 2000 EMBO Rep; Percherancier 2003 JBC; Van buil 2003 JBC; Venkatesan |
| Endothéline B | 10-15% | + | ? | + | ? | ? | 2003 JBC; Nguyen 2002 Mol Pharm |
| GABAB | ? | ? | ? | ? | ? | ? | Igarashi 2000 JBC |
| Glucagon GLP1 | + | ? | ? | Co-localisation | ? | ? | Chun 1994 PNAS; Okamoto 2000 JBC |
| mGluR | + (Dreso)/- (Rat) | ? | ? | ? | ? | ? | Teixera 1999 EJB; Yamaguchi 2003 |
| GqRH | ~ | ? | ? | ? | ? | ? | Becher 2001 J Neurochem |
| M2-muscaminique | ? | + | Non | ? | ? | ? | Estall 2004 MBC |
| Oxytocin | + <10% | Variable | + | + | ? | + | Becher 2001 J Neurochem; Eroglu 2003 |
| Rhodopsine | + | + <10% | Non | + | ? | + | Navratil 2003 JBC; Pawson 2003 Endocrinology |
| Somatostatine SST2 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | Feron 1997 JBC; Rybin 2000; Dessi 2000 |

* Il est à noter ici que les données concernant l'effet du ligand sur la localisation de l'EGF dans les structures de types rafts est dépendante de la technique utilisée : les préparations de Smart vont détecter une diminution de la quantité de récepteur dans la fraction de faible densité. Par contre, à l'issu de l'activation, l'association de l'EGFR et de ses protéines associées va augmenter dans la fraction DRM.

DRM : Fractions légères résistantes au Triton X100 1% ; CEM : Fractions légères enrichies en cholestérol purifiées sans détergeant ; Ligand : effet de l'agoniste sur la localisation dans les rafts ; Liaison Cav : Co-immunoprécipitation du récepteur avec la cavoline ; ME : microscopie électronique ; (-) absence, (+) présence, (?) non déterminé, (α) ambigu.

Cette localisation des acteurs de la signalisation dans les rafts a tout d'abord été envisagée comme un moyen potentiel d'assurer spécificité et efficacité aux processus de transduction du signal. Cette hypothèse reste encore aujourd'hui très attractive et amène de nombreux groupes de recherche à étudier le rôle potentiel des rafts dans la signalisation de leur protéine préférée. Pour ce faire, la stratégie classiquement employée consiste à démontrer : 1) l'association de la protéine considérée aux microdomaines membranaires enrichis en cholestérol, généralement par une méthode de purification biochimique des rafts et plus rarement par l'intermédiaire de méthodes complémentaires, 2) démontrer que cet association est dépendante de la concentration membranaire en cholestérol, 3) évaluer le rôle de la concentration membranaire en cholestérol sur la fonction de la protéine.

Cette stratégie se heurte donc à deux problèmes principaux intrinsèques à l'étude des rafts eux mêmes: la diversité des microdomaines de type raft et les effets indépendants des rafts associés à la modulation de la concentration membranaire en cholestérol.

Les conséquences de la diversité des rafts

La démonstration de l'association d'une protéine aux rafts est par définition soumise aux mêmes contraintes théoriques et méthodologiques que l'étude fondamentale des rafts eux-mêmes. En considérant l'existence des rafts comme un prédicat, leur diversité reste cependant un problème absolument essentiel, auquel seules de rares études s'intéressent. Conséquence directe et concrète à cette diversité, les conclusions réalisées à l'issue d'une purification biochimique de rafts (qui reste la méthode la plus couramment utilisée pour suggérer la présence d'une protéine dans les rafts) se doivent de prendre en compte deux éléments essentiels: la comparaison des distributions membranaires d'une protéine donnée dans divers types de systèmes cellulaires est difficile; la comparaison des distributions membranaires de deux protéines différentes obtenues par des méthodes distinctes (ex : purification au TritonX100 comparée à l'une ou l'autre des méthodes de purification sans détergeant)

est le plus souvent infondée. Par ailleurs, mis à part les protéines modifiées par des groupements GPI ou évidemment les protéines étroitement associées à la structure des rafts comme la caveoline ou la flottiline, rares sont les protéines de la signalisation qui sont massivement associées aux microdomaines. En ce qui concerne les récepteurs membranaires (Tableau 3), une association supérieure à 50% à l'état basal est tout à fait exceptionnelle.

Signification des traitements modifiant le cholestérol membranaire

Des traitements visant à modifier la concentration membranaire en cholestérol sont très souvent réalisés afin de vérifier si la localisation membranaire de la protéine étudiée est dépendante du cholestérol. Ces traitements consistent ainsi à diminuer ou augmenter la concentration en cholestérol membranaire, à l'aide d'agents transporteurs de cholestérol comme les cyclodextrines [β -hydroxy-cyclodextrine (β CD) ou Méthyl- β -cyclodextrine (MBCD)] ou à déstabiliser la fonction du cholestérol membranaire en l'oxydant à l'aide de la cholestérol oxydase ou en le liant à l'aide de molécules comme la filipine, la nystatin ou la digitonine. Ces différents traitements semblent très efficaces pour déstabiliser la morphologie et la fonction des caveolae (Rothberg et al., 1992) et par inférence des microdomaines de type rafts. Néanmoins, le cholestérol est un composant général des membranes qui a vraisemblablement d'autres fonctions que son seul rôle dans les rafts. Les effets de la déplétion en cholestérol sur l'intégrité fonctionnelle des puits recouverts de clathrine (CCP), classiquement considérée comme indépendante de la présence des rafts dans la membrane, sont un exemple des effets secondaires associés à ces divers traitements. En conséquence, l'observation d'une corrélation entre la modification de la concentration en cholestérol et celle de l'activité ou du comportement d'une protéine donnée ne peut à elle seule démontrer la présence de cette protéine dans les rafts.

Ces contraintes méthodologiques étant énumérées, force est de constater que leur prise en compte rigoureuse ne permet en aucun cas d'établir un modèle général solide du rôle des rafts dans la signalisation à partir des données de la littérature. Peu

d'entre elles peuvent en effet être comparées sur des bases expérimentales solides. Néanmoins, l'importance fonctionnelle de la localisation dans les rafts de quelques exemples de protéines et plus particulièrement de récepteurs (Tableau 3) a fait l'objet de plusieurs publications. Dans ces rares cas, un schéma potentiel d'un rôle des microdomaines dans la signalisation semblerait s'esquisser.

Le rôle des rafts dans la signalisation des récepteurs membranaires

Dans ce paragraphe, différents exemples de récepteurs membranaires seront considérés, certains faisant évidemment parti de la famille des GPCR, d'autres appartenant aux familles des récepteurs à activité tyrosine kinase [ex : récepteurs de l'EGF (EGFR), de l'insuline (IR)] ou sérine/thréonine kinase [ex : récepteurs du facteur TGF β (TGFR; Transforming growth factor β)] et enfin des récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire tels que les récepteurs TCR, BCR ou TNFR. Parmi ces différents types de récepteurs, les récepteurs de la réponse immunitaire ou de l'EGF (Tableau 3) sont sans aucun doute ceux dont la localisation dans les rafts a été la plus étudiée. Le cas de l'EGFR sera donc décrit en détail dans ce paragraphe.

Les premières études portant sur les conséquences fonctionnelles de la localisation des récepteurs membranaires dans les rafts, se sont bien souvent intéressées aux effets du cholestérol sur l'activité de ces derniers.

Les effets du cholestérol

Dans le cas de la rhodopsine, le cholestérol inhibe les changements conformationnels menant à la forme active de ce récepteur (MRII) et altère son activité de liaison (Mitchell et al., 1990). Au contraire, les récepteurs de l'ocytocine (OR) ou des chimiokines tel que CXCR4, présentent une affinité pour leur ligand respectif potentialisée par le cholestérol membranaire (Gimpl et al., 1997; Nguyen and Taub, 2002). Cette relation entre capacité de liaison et concentration en cholestérol peut en outre être mise en parallèle avec les effets du cholestérol sur l'efficacité de couplage de ces différents récepteurs. Dans le cas de la rhodopsine, le cholestérol diminue l'efficacité de couplage entre la forme MRII du récepteur et sa

protéine G, la transducine (Mitchell et al., 2001). Par contre, le couplage des récepteurs CXCR4 (Popik et al., 2002; Nguyen and Taub, 2002) ou OR (Gimpl et al., 1997) à leur voie de signalisation respective serait étroitement dépendant de la présence du cholestérol dans la membrane.

Les effets du cholestérol sur l'activité d'une protéine pouvant être indicatifs de la fonction de la localisation de cette dernière dans des microdomaines enrichis en cholestérol, ces différentes données suggèrent que le rôle des rafts dans la signalisation des GPCR diverge en fonction de la nature du récepteur considéré. L'évolution des théories pharmacologiques offrent cependant l'opportunité de nuancer de telles conclusions. Du point de vu de la théorie probabiliste, l'ensemble de ces données pourrait aussi converger vers l'idée que l'environnement raft constitue, pour l'ensemble de ces récepteurs, un espace contraignant en terme conformationnel. Leur localisation dans ces microdomaines les conduirait ainsi à adopter un champ conformationnel particulier exhibant ou non une affinité élevée pour leur ligand respectif. La relation causale entre l'inhibition basale de la dimérisation de l'EGFR et sa localisation dans les microdomaines ordonnés (Mineo et al., 1996; Mineo et al., 1999) pourrait ainsi appuyer cette notion.

Comme nous l'avons déjà évoqué, en plus de présenter des propriétés de liaison particulières vis à vis de son ligand, un récepteur caractérisé par un champ conformationnel donné exhibe vraisemblablement une spécificité d'association pour ses divers partenaires de signalisation. La présence d'un récepteur dans les microdomaines pourrait donc s'accompagner de son association à des complexes de signalisation spécifiques. L'association différentielle des récepteurs OR ou $\beta 1$ adrénergique ($\beta 1AR$) à des protéines G distinctes en fonction de leur localisation membranaire est à ce titre très intéressante.

La spécificité des complexes

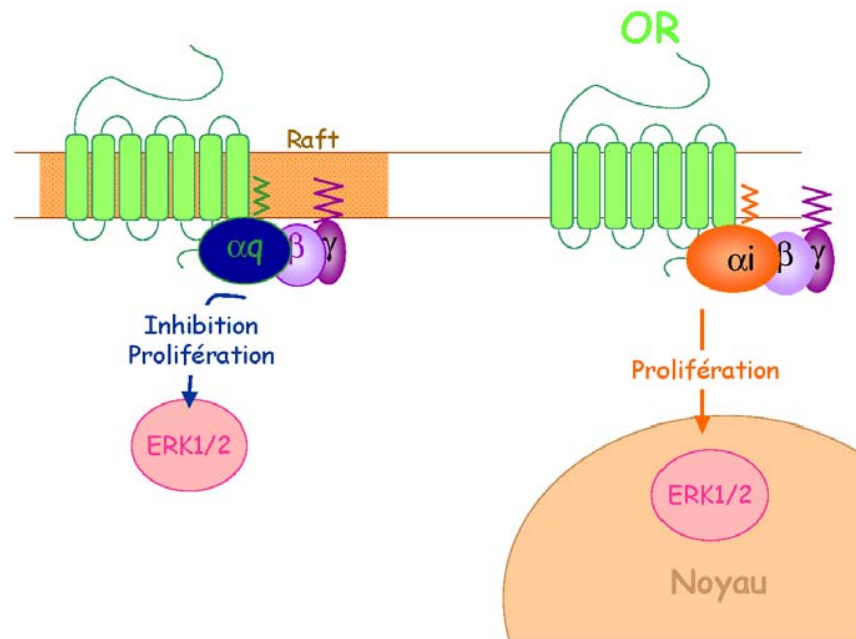
A l'état basal, la proportion d'OR retrouvé dans les fractions membranaires résistantes aux détergeants est inférieure à 10% (Tableau 3) et le récepteur est en mesure de coupler à la fois les protéines G_i/o et G_q/G_{11} . Une fois fusionné à la

caveoline 2 (OR_{CAV2}), le récepteur se retrouve par contre exclusivement localisé dans les rafts (Guzzi et al., 2002), lie l'oxytocine avec une plus grande affinité et est exclusivement couplé à une voie dépendante de Gq/G₁₁ (Fig 19A). De manière intéressante, les conséquences cellulaires de la stimulation de chacune de ces formes d'OR sont distinctes. Le récepteur OR_{WT}, un récepteur de classe B, lie stablement la β arr et induit la phosphorylation soutenue de ERK1/2, menant à un signal anti-prolifératif. Au contraire, la stimulation des MAPK par le récepteur OR_{CAV2} conduit à activer la prolifération cellulaire (Guzzi et al., 2002; Rimoldi et al., 2003). L'effet du cholestérol sur l'affinité de l'OR pour l'oxytocine et son couplage à la protéine Gq serait ainsi favorisé par la présence du récepteur dans les rafts. En dehors de ces microdomaines, le récepteur adopterait une conformation distincte présentant une moins grande affinité pour l'oxytocine mais une association préférentielle avec la protéine Gi (Fig 19A).

L'exemple du récepteur β 1 adrénergique (β 1AR) illustre également un lien potentiel entre la localisation du récepteur et son affinité différentielle pour certaines protéines G. A l'état basal, le β 1AR semble préférentiellement couplé la protéine Gs. A l'issue de son activation le β 1AR est désensibilisé, phosphorylé à la fois par GRK et PKA puis internalisé par une voie dépendante de la clathrine. Un mutant du récepteur dépourvu de site de phosphorylation pour GRK (β 1AR_{GRK-}) est également désensibilisé à l'issue de son activation et ce aussi efficacement que son homologue sauvage. Par contre, il va être internalisé par une voie sensible à la filipine, un agent liant le cholestérol membranaire (Rapacciuolo et al., 2003). Ces derniers résultats pourraient suggérer que la phosphorylation du β 1AR par PKA détermine son internalisation par une voie dépendante des rafts ou des caveolae (Rapacciuolo et al., 2003) (Fig 19B). Il a récemment été proposé que, comme le β 2AR (Daaka et al., 1997), le β 1AR verrait son affinité pour la protéine Gi augmentée à l'issue de sa phosphorylation par PKA (Martin et al., 2004). Ce couplage à la protéine Gi aboutirait entre autres à la stimulation de la voie MAPK (Martin et al., 2004).

Ce lien entre spécificité de couplage et localisation n'est évidemment pas restreint aux seuls récepteurs à 7TM et ceci est illustré par les exemple des récepteurs de l'insuline (IR) et du TGFR.

A)



B)

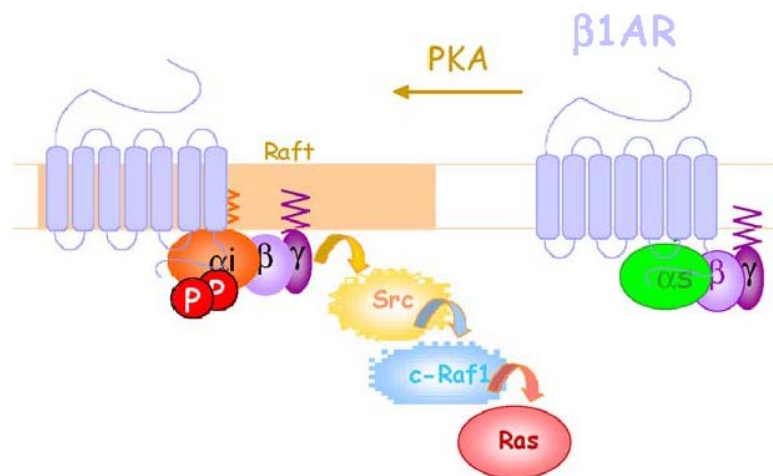


Figure 19. Rôle des rafts dans la signalisation des récepteurs oxytocin et $\beta 1$ -adrénergique

A) Le cas du OR. En fonction de sa localisation au niveau des caveolae, ce récepteur va stimuler des voies MAPK induisant ou non la prolifération (Guzzi et al., 2002; Rimoldi et al., 2003). B) Le cas du $\beta 1$ AR. La phosphorylation du récepteur par PKA aboutirait à son couplage à la protéine G_i (Martin et al., 2004) ainsi qu'à la translocation du récepteur dans des structures de types rafts pour y être internalisé (Rapacciuolo et al., 2003). Le couplage à G_i conduit à l'activation de la voie MAPK par le $\beta 1$ AR.

L'IR ne semble que partiellement associé aux rafts à l'état basal et sa stimulation aboutit à l'activation de deux voies différentes : l'une indépendante de la présence du récepteur dans les rafts et mettant en jeu la protéine kinase Akt/PKB, l'autre dépendante des rafts et régulant de manière directe la translocation du transporteur de glucose Glut4 à la surface membranaire. Dans ce dernier cas, la présence d'insuline induit le recrutement aux rafts de la protéine Cbl et sa phosphorylation subséquente par le récepteur. Dans cet état phosphorylé, Cbl lie les protéines CAP, CrkII et C3G (Baumann et al., 2000). Par l'intermédiaire de son activité GEF, C3G active une protéine présente de manière constitutive dans les rafts, la protéine G monomérique TC10 de la famille Rho (Watson et al., 2004). Cette dernière stimulerait alors la translocation du transporteur de glucose Glut4 à la membrane. Ce dernier événement serait, entre autres, régulé par le recrutement du complexe exocyste Exo70/Sec6/Sec8 par TC10 au niveau des rafts (Inoue et al., 2003) (Fig 20A).

Dans le cas du TGFR, sa présence dans les rafts s'accompagne aussi de sa liaison à un complexe protéique particulier. En dehors des structures raft/caveolae, le récepteur s'associe au complexe SMAD2/SARA et active la transcription. Dans les caveolae, son association au facteur SMAD7 a au contraire un effet inhibiteur sur la transcription. De plus, la liaison de SMAD7 au facteur SMURF2 appartenant à la famille des E3 ubiquitine ligases, induit l'entrée du TGFR dans une voie de transport membranaire aboutissant à sa dégradation (Di Guglielmo et al., 2003) (Fig 20B).

Ces différents exemples pointent vers l'idée que les rafts puissent influencer la spécificité d'association d'un récepteur membranaire à un complexe ou une voie de signalisation précis. Néanmoins, la question d'une dynamique entre les différentes populations d'un récepteur donné à la membrane reste sans réponse. Cette problématique particulière pourrait néanmoins être illustrée par le cas de l'EGFR.

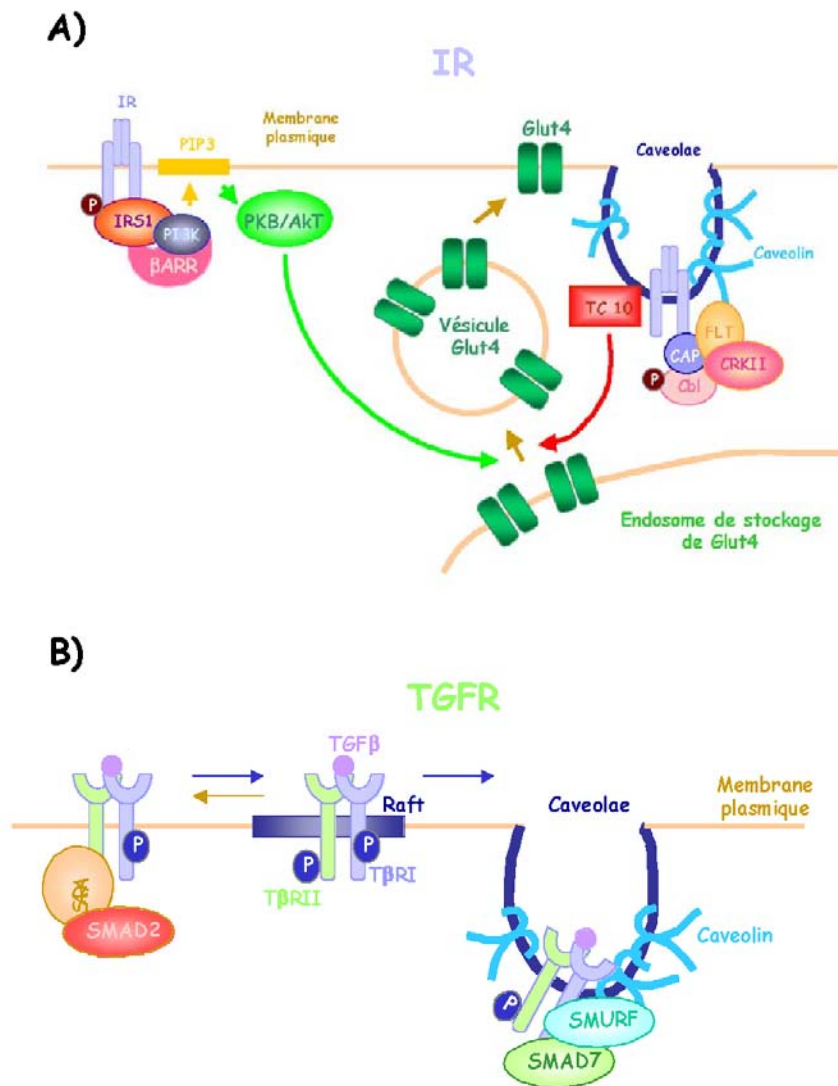


Figure 20. Spécificité de signalisation de divers récepteurs dans les rafts.

A) Le cas du récepteur à l'insuline. L'insuline régule la translocation du transporteur de glucose par l'intermédiaire de la voie PI3K ou par une voie alterne impliquant la E3-ligase Cbl et la protéine G monomérique TC10 (Kanzaki and Pessin, 2003). La formation de ces complexes dépend de la présence du récepteur dans les rafts. B) Le cas du TGFR. En fonction de sa localisation dans des structures rafts ou non-rafts, ce récepteur va être associé à l'enzyme E3-ligase SMURF et au facteur de transcription SMAD7 ou à la protéine d'échafaudage SARA et à SMAD2 (Di Guglielmo et al., 2003).

La dynamique des complexes

L'EGFR est constitutivement associé aux microdomaines membranaires dans une proportion de 60% (Mineo et al., 1996; Mineo et al., 1999). Son activation s'accompagne de son autophosphorylation et du recrutement des protéines src (Hur et al., 2004), Raf (Mineo et al., 1996) et de la E3-ubiquitin ligase Cbl (de Melker et al., 2004a; de Melker et al., 2004b; Lafont and Simons, 2001; Levkowitz et al., 1998) dans les rafts (Fig 21). Entre 3 et 30min après sa stimulation par l'EGF, le récepteur est délocalisé des microdomaines et internalisé (Mineo et al., 1999). A l'image des mécanismes survenant lors de l'activation des récepteurs BCR et TCR (Crotzer et al., 2004; Stoddart et al., 2002), ces deux événements, sortie des rafts et internalisation, seraient étroitement régulés par l'activité kinase de src. En phosphorylant la clathrine à l'issue de l'activation de l'EGF (Wilde et al., 1999), src stabiliserait la polymérisation des molécules de clathrine au voisinage des microdomaines rafts et permettrait la translocation du récepteur dans ces structures (Crotzer et al., 2004; Stoddart et al., 2002). L'internalisation de l'EGF dans les puits recouverts de clathrine pourrait alors permettre l'induction ou l'amplification de certaines cascades de transduction comme celles des MAPK ou de la PI3K (Vieira et al., 1996). L'association dynamique du récepteur de l'EGF aux microdomaines membranaires détermine donc à la fois l'initiation du processus de transduction mais aussi sa propagation. Cette localisation dynamique a aussi été proposée dans le cas des récepteurs de la réponse immunitaire ou du TNFR. Au contraire de l'EGFR, la stimulation de ces derniers induirait dans un premier temps leur translocation dans les rafts. Comme nous l'avons déjà évoqué dans le cas du FcεRI (Fig 18), cette translocation initiale serait essentielle à la transduction du signal et se poursuivrait par leur sortie des rafts et leur internalisation par une voie dépendante de la clathrine (Pyenta et al., 2001; Crotzer et al., 2004; Stoddart et al., 2002; Stoddart et al., 2005).

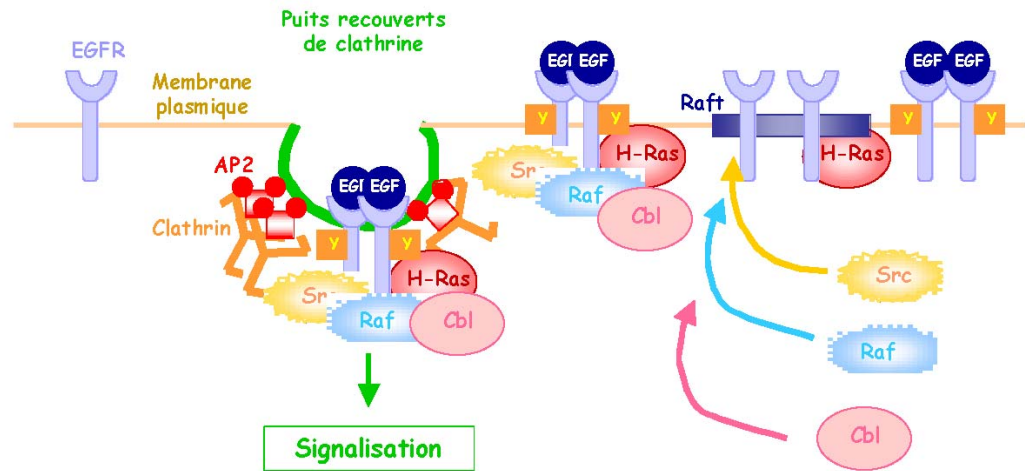


Figure 21. Rôle des rafts dans la signalization de l'EGFR

A l'état basal, 60% des molécules d'EGFR sont présentes dans des structures rafts sous une forme monomérique. En présence d'EGF, l'activation du récepteur conduit à sa dimérisation et à son autophosphorylation (Mineo et al., 1996). Ce phénomène s'accompagne d'une part de sa sortie des rafts mais également du recrutement de diverses protéines au niveau des rafts. Le recrutement de Src, Raf et Cbl est ici représenté (Hur et al., 2004; Mineo et al., 1996; Puri et al., 2005). Ces protéines vont induire la stimulation de la protéine G monomérique H-Ras. Sous sa forme GTP, celle-ci va également sortir des rafts (Roy et al., 2002). L'internalisation du récepteur par la voie des puits recouverts de clathrine serait essentielle à l'ultime phosphorylation des protéines ERK1/2 (Vieira et al., 1996).

Cette capacité des rafts à lier dynamiquement certains récepteurs pourrait également avoir un rôle dans l'influence des différentes voies de signalisation entre elles. La transactivation du récepteur de l'EGF par la famille des GPCR en est un exemple. La stimulation de l'EGFR par les récepteurs B2R ou AT1R dépendrait ainsi de l'association transitoire de ces récepteurs aux rafts (Hur et al., 2004; Ushio-Fukai et al., 2001; Olivares-Reyes et al., 2005). Des mécanismes similaires peuvent être envisagée pour d'autres GPCR, comme par exemple les récepteurs de l'endothéline (ET1A) et du LPA (Daub et al., 1996; Luttrell et al., 1996; Luttrell et al., 1997). De manière intéressante, la stimulation de l'EGFR par ces récepteurs ne s'accompagne pas d'une sortie de l'EGFR des rafts (Mineo et al., 1999). S'il est relativement clair que les GPCR peuvent induire à la fois la transactivation de l'EGFR et son internalisation (Kim et al., 2003; Pierce et al., 2000), ces résultats pourraient ainsi suggérer que les mécanismes impliqués dans le contrôle de ce dernier événement diffèrent de ceux induits classiquement par l'EGF.

L'existence d'une dynamique des populations de récepteur entre les compartiments rafts et non rafts de la membrane pourraient suggérer l'idée d'un rôle des rafts dans les mécanismes de remaniement des complexes de signalisation. Ce rôle des microdomaines membranaires pourrait être au moins partiellement, lié à l'enrichissement dans ces structures des phospholipides de type PI(4,5)P2 (Caroni, 2001). Leur reconnaissance par diverses protéines dont celle de la famille GAP-43 (CAP23/NAP22/MARCKS) induirait une réorganisation du réseau d'actine associé aux rafts (Caroni, 2001) (Laux et al., 2000). Cette association au cytosquelette des rafts est essentielle à la régulation spatio-temporelle de la signalisation y prenant place. Comme cela sera abordé plus tard, différentes protéines d'échafaudages (protéines à domaines PDZ ou à domaine FERM de liaison à l'actine) vont également participer à assurer ce lien entre raft et cytosquelette (Golub et al., 2004).

Ces différents exemples sont donc représentatifs du ou des rôles potentiels des microdomaines membranaires dans le contrôle de la signalisation cellulaire.

Cependant, comme évoqué précédemment, les problèmes méthodologiques associés au concept même de raft semblent, telle une épée de Damoclès, menacer la vraisemblance de ces diverses analyses, aussi captivantes soient-elles.

CYTOSQUELETTE ET PROTÉINES D'ÉCHAFAUDAGES

Le réseau cortical d'actine

Dans les membranes cellulaires, la diffusion des composés membranaires, lipides et protéines, est diminuée de 5 à 50 fois par rapport à celle observée dans des liposomes. En outre, une polymérisation minimale de ces composés, *in vivo*, induit un ralentissement supplémentaire de leur diffusion d'un facteur 5 à 40, en fonction du composé observé (Iino et al., 2001; Murase et al., 2004). Selon un modèle brownien, la diffusion latérale, dans une bicouche lipidique continue, d'un composé subissant une tetramérisation devrait être diminué par 1,1, tandis que celle d'un polymère de 100 molécules devrait être diminuée de 1,4 (Kusumi et al., 2005). Le déplacement des éléments constitutifs des membranes dans des conditions cellulaires est donc en apparence radicalement différent de celui observé dans des conditions artificielles. Ces conclusions qui reposent sur des données de FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) ou de SPT (*single particle tracking*) à basse résolution (1 images / 30 ou 300ms), ont été bousculées par la publication de nouveaux résultats obtenus par SPT à une résolution considérablement augmentée. En un tour de force technique permettant l'acquisition de 40000 images par sec (1 image /25µs), le groupe de Kusumi a clairement démontré que la diffusion latérale d'un lipide insaturé localisé dans le feuillet extracellulaire, DOPE, était inhomogène. Son comportement peut être décrit en deux phases : une phase répondant aux caractéristiques d'un mouvement brownien classique circonscrit au sein de domaines de la membrane plasmique; une autre phase beaucoup plus lente qui correspondrait au saut du composé d'un microdomaine membranaire à un autre (modèle *hop diffusion*) (Fujiwara et al., 2002). Au sein d'un domaine membranaire donné, la diffusion latérale de la molécule DOPE atteint une vitesse de 9µm²/s, similaire à celle observée dans des liposomes

reconstitués. Cette vitesse est considérablement diminuée par le passage de la molécule entre deux compartiments adjacents. Un traitement rapide à la cytochalasine D induit une augmentation de la zone de diffusion rapide de DOPE d'un coefficient 4 (Murase K 2004 Biophys J), suggérant que la diffusion compartimentalisée de DOPE dépendrait de l'intégrité du cytosquelette d'actine. En fonction de la densité du réseau sous-membranaire d'actine, spécifique à chaque type cellulaire, la maille du réseau varierait de 30 à 230nm, définissant en conséquence la taille des compartiments membranaires (Murase K 2004 Biophys J). De manière intéressante, le déplacement latéral de la molécule n'est pas dépendant de l'existence de rafts dans la membrane, de domaines protéiques extra-membranaires ou encore de composés présents dans la matrice extracellulaire. Le fait que des protéines membranaires diverses, récepteur à la transferrine (Sako and Kusumi, 1994), CD44 (Kusumi et al., 2005), les E-cadhérines (Sako et al., 1998) ainsi que les récepteurs à 7TM, ste2 et δ -opioïde (Kusumi et al., 2005; Suzuki et al., 2005) présentent toutes des déplacements latéraux similaires à celui décrit pour la molécule DOPE, rend probablement généralisable le modèle de *hop diffusion*. Ces données suggèrent en outre que la présence d'une protéine dans des zones ordonnées de la membrane ou nanorafts ne limite pas sa diffusion latérale dans la membrane quand bien même sa mobilité au sein du nanodomaine peut, elle, s'avérer contrainte. Il est cependant aisé d'imaginer que la stabilisation transitoire des rafts par l'intermédiaire de leur liaison au réseau cytosquelettique sous membranaire, aura des conséquences importantes sur la mobilité des protéines contenues dans ces structures. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la fugacité de l'existence de ces structures constitue probablement un frein important à l'évaluation de leur impact sur la diffusion latérale des protéines qui y sont localisées.

L'une des difficultés du modèle de *hop diffusion* réside dans la localisation cytosolique du cytosquelette. Comment le réseau cytosquelettique cytosolique peut-il circonscrire la mobilité de composés présents dans le feuillet externe de la membrane plasmique? Nakada et al. ont récemment proposé un modèle décrivant la contrainte transmembranaire apposée par le réseau cytosquelettique au cours du développement

neuronal (Nakada et al., 2003). Les neurones présentent deux domaines membranaires distincts, somato-dendritique et axonal. Chez le rat, une barrière physique membranaire, le segment initial, est constituée à la base de l'axone, une dizaine de jour après la naissance. La diffusion d'une molécule de DOPE est radicalement supprimée par la formation du segment initial. Ce phénomène est corrélé à l'expression et la concentration au niveau du segment initial de molécules de G-ankyrin et de canaux sodiques immobiles à 85% (type II/Nav1.2) (Nakada et al., 2003). En liant des molécules de G-ankyrin, les molécules de canaux sodiques s'associent au réseau d'actine et sont en conséquence immobilisées. Cette perte de mobilité des protéines transmembranaires à l'issue de leur liaison au cytosquelette pourrait stériquement propager la contrainte diffusionnelle appliquée par le réseau d'actine sur la face cytosolique de la membrane. Le temps de résidence d'un composé, dans une région donnée de la membrane, devrait en conséquence, s'en trouver augmenté. Dans le cas du segment initial, la contrainte générée par l'immobilisation de canaux sodiques, le long du squelette d'actine, semble relativement stable. Une immobilisation transitoire des protéines membranaires devrait cependant avoir des conséquences stériques similaires sur la diffusion locale des composés de la membrane (Théorie des *membrane skeleton fences and the anchored-transmembrane protein pickets*) (Kusumi et al., 2005; Suzuki et al., 2005).

De ces différentes données, émerge un modèle de membrane compartimentalisée par le réseau d'actine sous membranaire. La liaison stable ou transitoire des protéines membranaires à ce réseau résulterait en la formation d'une barrière physique transmembranaire (*anchored-transmembrane protein pickets*) circonscrivant chacun des compartiments membranaires. Protéines et lipides présentent une diffusion répondant aux critères browniens au sein d'un domaine donné et une diffusion ralentie lors de leur passage vers un compartiment adjacent. La capacité de ces composants à passer une barrière va être étroitement dépendante de leur niveau de polymérisation. Les complexes multimoléculaires verront leur temps de résidence au sein d'un compartiment d'autant augmenté qu'ils seront d'une taille importante (Kusumi et al., 2005; Murase et al., 2004).

Les protéines d'échafaudage

Les protéines à domaines PDZ

Les contraintes imposées par le réseau cortical sous-membranaire limitent la mobilité latérale des complexes protéiques. En plus d'assurer l'efficacité de signalisation, l'oligomérisation des récepteurs membranaires et la formation de signalosomes favorise leur immobilisation dans des régions particulières des membranes. L'organisation des synapses neuronales et plus particulièrement des zones post-synaptiques reflète l'importance fonctionnelle de ce phénomène. Dans le cas des synapses excitatrices, les récepteurs au Glutamate, métabotropiques et ionotropiques (GluR) (NMDA et AMPA) sont en perpétuel mouvement entre des zones extra-synaptiques et la grille synaptique (Choquet and Triller, 2003). Leur stabilisation à ce niveau dépend en grande partie de leur liaison à une variété de protéines d'échafaudage à domaine PDZ, PSD95, SAP97, GRIP/ABP, PICK1, Homer ou Shank. La liaison de GluR2, une des sous unités des récepteurs AMPA, aux protéines GRIP/ABP va ainsi stabiliser sa localisation au niveau de la grille synaptique (Osten et al., 1998; Osten and Ziff, 1999). Au contraire, sa liaison à PICK1 favorise, selon un mécanisme dépendant de PKC, la redistribution extra-synaptique du récepteur et permet son internalisation. PICK1 lie GluR2 par l'intermédiaire de deux séquences distinctes dans sa portion terminale cytosolique. Une séquence c-terminale classiquement reconnue par les domaines PDZ (SVKI) et capable d'interagir également à l'état basal avec GRIP/ABP (Daw et al., 2000); une autre non-PDZ (KRMKVAKNAQ ou pep2m), liant PICK1 (Hanley et al., 2002) et une protéine AAA ATPase classiquement impliquée dans la régulation du processus de fusion membranaire, NSF (Nishimune et al., 1998; Noel et al., 1999; Osten and Ziff, 1999). Les qualités de chaperonne moléculaire de NSF lui confère la capacité de dissocier les interactions protéiques (Whiteheart and Matveeva, 2004). Dans le cas présent, NSF et son co-facteur SNAP (soluble NSF attachment protein) dissocieraient constitutivement PICK1 de GluR2 (Hanley et al., 2002) garantissant sa localisation synaptique. En déstabilisant l'interaction entre un échafaudage protéique et un récepteur, NSF modulerait, entre autre, la capacité de diffusion latérale du

récepteur GluR2 entre la zone extra-synaptique et la grille synaptique (Gardner et al., 2005; Steinberg et al., 2004) (Fig 22).

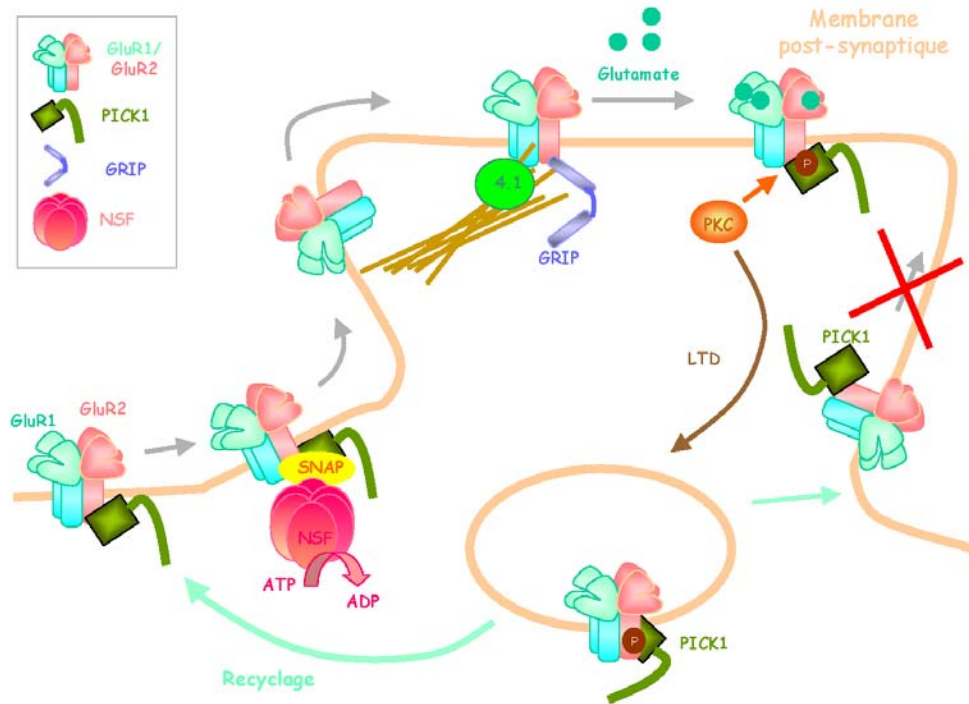


Figure 22. Mécanisme de régulation de l'expression à la surface des récepteurs AMPA au glutamate contenant les sous unités GluR1 et GluR2.

Le récepteur GluR2 lie les protéines à domaines PDZ, GRIP et PICK1 par l'intermédiaire d'une séquence consensus présente dans sa queue c-terminale (SVKI) (Bredt and Nicoll, 2003). GRIP va stabiliser l'expression des récepteurs AMPA au niveau de la grille synaptique, comme d'ailleurs la protéine 4.1 qui en reliant GluR1 au cytosquelette immobilise le canal. La liaison de PICK1 à GluR2 serait initiée par la phosphorylation de la S⁸⁸⁰ du site consensus PDZ par PKC. La formation du complexe PICK1/GluR2 favorise l'internalisation du canal et le phénomène de dépression à long terme (LTD). PICK1 lie également GluR2 au niveau d'un décapeptide interne de sa queue c-terminale qui constitue également un site de liaison pour la AAA ATPase NSF. Le recyclage du récepteur à la surface serait dépendant de cette dernière et de son cofacteur β SNAP, qui en dissociant le complexe PICK1/GluR2 (Hanley et al., 2002) permettraient la diffusion latérale de ce dernier jusque dans la grille synaptique (Gardner et al., 2005; Steinberg et al., 2004). NSF interviendrait également dans l'insertion initiale du récepteur dans la grille synaptique à l'issue de sa synthèse.

Si les cellules neuronales illustrent particulièrement bien l'importance de la compartimentation membranaire et de la mobilité latérale des protéines, il est évident que la régulation de ces phénomènes est probablement essentielle dans tous les types cellulaires. Le canal échangeur Na^+/H^+ NHE3 qui régule l'absorption du Na^+ dans le tubule proximal du rein ou dans l'intestin présente également une localisation membranaire que son association à de méga complexes protéiques va réguler (Li et al., 2001). En liant le domaine PDZ2 de NHERF1 et NHERF2 (Yun et al., 1997), le canal NHE3 va se voir impliqué dans différents complexes déterminant subséquentement sa fonction. En reliant le canal à PKC (Lee-Kwon et al., 2003) et à α -actinin-4 (Kanai et al., 2000), NHERF2 sensibilise NHE3 au calcium. Dans les tubules proximaux rénaux, NHERF1/2 permettent également l'association de NHE3 à la protéine Ezrin qui va lier le cytosquelette d'actine et recruter avec une basse affinité PKA (Yun et al., 1998). La modulation de l'interaction de NHE3 à NHERF va réguler la taille des complexes protéiques impliquant le canal et en conséquence son activité et sa mobilité (Yun et al., 1997; Cha et al., 2004).

NHERF participe également à la régulation de l'activité d'autres protéines, dont des GPCR. Par l'intermédiaire d'un motif consensus de reconnaissance de domaine PDZ (DSLL), NHERF interagit avec le récepteur β 2AR (Cao et al., 1999; Hall et al., 1998) et la protéine RAMP3 (Bomberger et al., 2005a), une protéine liée constitutivement au récepteur CRLR et régulant le transport membranaire et les propriétés pharmacologiques de ce dernier. Dans les deux cas, NHERF paraît impliqué dans la régulation du recyclage de ces récepteurs (Cao et al., 1999; Gage et al., 2001; Bomberger et al., 2005a) vers la surface membranaire à l'issue de leur désensibilisation et de leur internalisation. De manière intéressante, le β 2AR et le CRLR via son association à RAMP3, interagissent également avec NSF (Cong et al., 2001; Bomberger et al., 2005b), qui régulerait lui aussi le routage membranaire de ces deux récepteurs à l'issue de leur internalisation. Ces observations sont réminiscentes du lien fonctionnel observé dans le cas de la régulation de la diffusion membranaire latérale du récepteur GluR2 par PICK1 et NSF (Hanley et al., 2002) qui contrôleraient la localisation du canal au niveau de la grille synaptique (Fig 22). Bien qu'aucune donnée n'établissent un rôle direct de NSF dans la modulation de

l'interaction du β 2AR ou du CRLR à NHERF, ce parallèle pourrait refléter l'existence d'une inter-connection fonctionnelle entre NHERF et NSF dans la régulation de la distribution membranaire latérale de ces deux récepteurs.

Les protéines à domaine FERM

La propriété de NHERF à lier par son domaine c-terminal, des protéines de la superfamille des protéines à domaines FERM (Four point one, ERM) telles qu'euzrin, illustre le lien entre cytosquelette et protéines d'échafaudage dans la compartimentation membranaire. Les protéines à domaine FERM peuvent néanmoins interagir directement avec certaines protéines membranaires. L'interaction de GluR1 (Fig. 21) ou des récepteurs D2/D3 dopaminergiques (D2/D3R) à la protéine 4.1 régule leur expression à la surface cellulaire (Binda et al., 2002; Coleman et al., 2003). La phosphorylation des protéines ERM par PKC (Simons et al., 1998), PI4P5K (Matsui et al., 1999) ou encore GRK2 (Cant and Pitcher, 2005), conduit à leur activation. Dans cette conformation active, elles peuvent alors lier la F-actine et diverses protéines NHE1, CD43, CD44, ICAM1, ICAM2, Syndecan2 (Bretscher et al., 2002a). De manière intéressante, certaines protéines constitutivement présentes dans les fractions membranaires résistantes aux détergeants, telles que la protéine Cbp (Itoh et al., 2002), recruterait la protéine euzrin dans les rafts.

Les filamines

D'autres protéines liant l'actine présentent la capacité de relier les protéines de la signalisation au réseau cytosquelettique, par exemple la famille des filamines (Stossel et al., 2001). Leur interaction à des GPCR a été plusieurs fois rapportée dans la littérature et on y retrouve les récepteurs dopaminergiques D2 et D3 (D2/D3R) (Li et al., 2000; Li et al., 2002; Lin et al., 2001), le récepteur de sensibilité au calcium (CaR) (Awata et al., 2001; Hjalm et al., 2001; Zhang and Breitwieser, 2005), mGluR7 (Enz and Croci, 2003) ou le récepteur à la calcitonine (Seck et al., 2003). Dans le cas des récepteurs dopaminergiques, la liaison à la filamine semble essentielle au couplage de ces récepteurs à la protéine G (Li et al., 2000; Kim et al., 2005b). Par ailleurs, en interagissant avec la caveoline, la filamine stabiliserait leur association à

des microdomaines membranaires de type raft/caveolae (Stahlhut and van Deurs, 2000). Une hypothèse similaire a également été proposée dans le cas du récepteur CaR (Kifor et al., 1998) et son interaction avec la filamine serait en outre essentielle à son couplage à la voie MAPK (Awata et al., 2001; Hjalm et al., 2001). Dans certains cas, comme par exemple pour le récepteur de l'insuline, la liaison du récepteur à la filamine va inhiber son couplage aux MAPK (He et al., 2003). Ces résultats illustrent la capacité des protéines d'échafaudage à assurer la spécificité du couplage de divers types de récepteurs, GPCR ou autres [ex : les récepteurs à l'insuline ou les intégrines (He et al., 2003; Calderwood et al., 2001)].

Diffusion latérale et transport membranaire

L'ensemble de ces exemples illustre dans quelle mesure régulation de la mobilité latérale et formation de complexes protéiques sont étroitement liées en terme de régulation de la signalisation membranaire. Le déplacement latéral de ces complexes dans la membrane va également être déterminant pour leur transport de ou vers la membrane plasmique. Le cas du récepteur GluR2 en est un exemple (Fig. 21). Lors de son incorporation initiale dans la membrane plasmique à l'issue de sa synthèse ou de son recyclage, le GluR2 doit diffuser latéralement de la zone extrasynaptique des dendrites vers la grille synaptique pour y exercer son activité. Une fois stimulé, il doit au contraire sortir de la grille synaptique pour être internalisé. Les protéines NSF et PICK-1 en régulant la localisation latérale de GluR2 contrôle ainsi son transport entre la surface membranaire et les compartiments endosomaux (Fig 22).

La localisation dynamique des récepteurs BCR ou TCR entre des zones fluides de la membrane, les rafts et les puits recouverts de clathrine, suggère à nouveau l'importance de la diffusion latérale dans le contrôle du transport de ces récepteurs (Crotzer et al., 2004; Stoddart et al., 2002; Stoddart et al., 2005). Leur sortie des zones ordonnées de la membrane vers les puits recouverts de clathrine semble, comme dans le cas de l'EGFR (Vieira et al., 1996; Mineo et al., 1999; Wilde et al., 1999), importante non seulement pour leur internalisation à l'issue de leur activation mais aussi potentiellement à la propagation du signal (Stoddart et al., 2002; Stoddart et al., 2005).

La localisation des différents composants de la machinerie d'internalisation dépendante de la clathrine est représentative du lien étroit existant probablement entre diffusion et transport des protéines membranaires. Des expériences de microscopie effectuées sur des dendrites démontrent la distribution selon des zones concentriques de taille croissante des adaptateurs de clathrine (AP2), de la clathrine et finalement de la dynamine autour de la grille synaptique (Racz et al., 2004). Chacune des ces protéines se concentre dans des régions de plus en plus éloignées de la grille synaptique. Ces données suggèrent que les protéines cargos doivent graduellement s'éloigner de la synapse afin d'être efficacement internalisées. La démonstration que l'assemblage des treillis de clathrine à la membrane s'effectue en des zones discrètes de cette dernière supporte également cette idée (Gaidarov et al., 1999). L'importance de la diffusion des cargos membranaires ne semble pas restreinte aux mécanismes de transport associés aux clathrines. L'incorporation des cargos protéiques au sein de vésicules mantelées par les complexes COPI/II, lors de leur transport de ou vers les membranes du réticulum endoplasmique, nécessiterait également leur diffusion latérale (Holthuis and Levine, 2005).

LE TRANSPORT MEMBRANAIRE

La structure intrinsèque des membranes et l'interaction entre les membranes et le cytosquelette, module la signalisation en limitant ou en favorisant la rencontre des différents acteurs protéiques. La régulation dynamique de la localisation de ces derniers, par la machinerie de transport, joue ainsi un rôle clef dans le contrôle de la formation des complexes multimériques.

A l'issue de leur activation, nombre de récepteurs membranaires, GPCR, RTK, récepteurs ionotropiques vont être désensibilisés, puis internalisés et transportés vers le compartiment endosomal pour y être alternativement recyclés ou dégradés. En plus de contrôler l'accès du récepteur à son ligand, le phénomène d'endocytose va dans certains cas permettre la stimulation par divers types de récepteurs (GPCR, RTK ou TGF), de certaines cascades de signalisation telles que la cascade des MAPK ERK1/2

(Ceresa et al., 1998; Daaka et al., 1998; Vieira et al., 1996; Sorkin and von Zastrow, 2002) ou encore celle des facteurs de transcription SMAD (Di Guglielmo et al., 2003).

L'endocytose dépendante de la clathrine a pendant longtemps été considérée comme la principale voie d'internalisation de la majorité des récepteurs membranaires. Aujourd'hui, un nombre croissant de données suggèrent que d'autres routes d'internalisation, celle des rafts et des caveolae par exemple, puissent également jouer des rôles très importants dans le transport et la régulation de ces protéines membranaires (Chen and De Camilli, 2005; Damm et al., 2005; Di Guglielmo et al., 2003; Lamaze et al., 2001; Le et al., 2002; Pelkmans and Helenius, 2003; Pelkmans and Zerial, 2005; Pelkmans et al., 2005; Rapacciuolo et al., 2003; Sigismund et al., 2005; Stoddart et al., 2005).

Bien que reposant vraisemblablement sur des machineries protéiques différentes (Pelkmans and Helenius, 2003), l'ensemble de ces mécanismes d'internalisation suivent un schéma similaire s'effectuant en trois étapes : la formation de structures tubulo-vésiculaires à l'issue du recrutement de cargos protéiques, le transport des vésicules le long des microtubules et leur fusion avec une membrane cible.

L'endocytose

Le bourgeonnement vésiculaire

Qu'il s'agisse du bourgeonnement vésiculaire ou de la fusion membranaire, ces événements nécessitent des remaniements locaux de l'organisation de la bicouche phospholipidique. L'étape intermédiaire à chacun de ces phénomènes consiste en l'accolement transitoire des deux bicouches lipidiques qui conduit à un agencement rappelant la structure de micelle inversée H_{II} . A l'issue du bourgeonnement vésiculaire, la membrane vésiculaire doit adopter un niveau de convexité radicalement différent de celle de sa membrane d'origine. Différents mécanismes à la fois extrinsèques et intrinsèques aux membranes vont favoriser ce phénomène. Comme mentionné précédemment, la nature des lipides membranaires module la capacité de courbature des membranes et certaines protéines associées à ces dernières

en influencent également les propriétés. Le cytosquelette et les protéines manteaux (ex : clathrine et COPI/II) associées aux membranes en sont des exemples.

La force mécanique extrinsèque générée par le cytosquelette et ses protéines associées (microtubule et kinésine par exemple) est suffisante à la création in vitro de réseaux tubulaires de membrane (Dabora and Sheetz, 1988; Roux et al., 2002). Par ailleurs, la clathrine (Nossal, 2001) et par inférence les complexes protéiques COPI et COPII (Farsad and De Camilli, 2003) contrôlent le bourgeonnement vésiculaire en stabilisant probablement la courbature membranaire. Si les complexes COPI/II sont impliqués dans la formation des vésicules naviguant entre le ER et l'appareil de Golgi (Lee et al., 2004a), la clathrine recouvre quant à elle les vésicules naissant du Golgi, de la membrane plasmique ou encore du réseau endosomal (Rodriguez-Boulant et al., 2005). En fonction du compartiment cellulaire considéré et de sa composition lipidique, la clathrine s'associe à des protéines hétéromériques formant des complexes adaptateurs (AP) différents, AP1, AP2, AP3 ou AP4 (McMahon and Mills, 2004a). Comme nous l'avons déjà mentionné, le complexe AP1 lie préférentiellement aux membranes trans-golgiennes en raison de leur enrichissement en PI4P (Wang et al., 2003) tandis que AP2 préférera les zones concentrées en PI(4,5)P à la membrane plasmique (Collins et al., 2002). La caveoline, quant à elle, définit un type de vésicule présentant une composition caractéristique des rafts, et favorise la courbature membranaire en concentrant localement le cholestérol (Murata et al., 1995). Contrairement aux autres types de protéines impliquées dans le transport, la caveoline est en permanence associée à la membrane et participe au transport de protéines cargo entre différents compartiments : ER, Golgi, membrane plasmique et enfin caveosome, un compartiment endosomal enrichi en caveoline qui serait partiellement connecté avec le compartiment endosomal précoce (Nichols, 2002b; Pelkmans et al., 2004).

La formation des vésicules mantelées de clathrine

Un événement dynamique

Hexamère constitué de trois chaînes polypeptidiques de 180kDa et de trois chaînes plus légères de 35kDa, la clathrine arbore une structure caractéristique en

triskélium. Son association à la membrane dépend de sa liaison à d'autres protéines comme les complexes AP1-4 ou d'autres tels AP-180 ou disabled-2 (McMahon and Mills, 2004b). Une fois qu'un assemblage de 30 à 40 triskélium de clathrine s'est formé à la membrane, l'évolution de ce dernier dépend de la présence de cargo protéique dans le puit naissant (Ehrlich et al., 2004). En absence de cargo, l'assemblage se désorganise rapidement. En présence de cargo, l'assemblage de clathrine est par contre stabilisé et l'invagination de la membrane croît au fur et à mesure que de nouveaux triskélium sont ajoutés aux complexes. Une fois pleinement formée, la vésicule mantelée de clathrine est alors libérée de la membrane par l'activité de la dynamine (Keyel and Traub, 2004; Kirchhausen, 2000; McMahon and Mills, 2004a). L'ensemble de ce processus durerait environ une minute (Keyel and Traub, 2004; Ehrlich et al., 2004).

Le recrutement des cargos : le cas de AP2

Le recrutement des cargos protéiques semble donc constituer un événement essentiel à la maturation de la vésicule recouverte de clathrine (Ehrlich et al., 2004). A la membrane plasmique, différentes protéines auraient donc un rôle d'adaptateur entre les protéines cargos et le réseau de clathrine recouvrant les puits invaginés (Motley et al., 2003). Parmi ces adaptateurs, le complexe AP2 est certainement celui ayant été le plus étudié. Il a été impliqué dans le recrutement et l'internalisation de diverses protéines présentes à la surface membranaire dont différents type de récepteurs, GPCR mais aussi récepteurs à activité tyrosine kinase ou à la transferrine (Laporte et al., 1999; Nesterov et al., 1995a; Sorkin et al., 1996a). Comme évoqué précédemment, le recrutement de AP2 à la membrane est dépendant de la présence de PI(4,5)P sans lesquels l'efficacité de l'adaptateur semble restreinte (Honing et al., 2005). Essentielle au recrutement et à la reconnaissance des cargos, la sous unité μ_2 lie les PI(4,5)P ainsi que différents motifs peptidiques consensus, dileucine, NPXY ou YXX ϕ (Owen and Evans, 1998). La mutation de la tyrosine ³²²NPLIY du β 2AR ou de son motif di-leucine ³³⁹LL altère ainsi son internalisation en présence d'agoniste (Barak et al., 1994; Gabilondo et al., 1996; Gabilondo et al., 1997). En dehors de ces motifs consensus, μ_2 reconnaît des groupes d'arginines. La mutation d'un tel motif

dans le cas du récepteur $\alpha_1\text{b}$ -adrénergique inhibe également son internalisation (Diviani et al., 2003).

A l'état basal, l'affinité de AP2 pour les séquences de type NPXY ou YXX ϕ est faible et différents éléments peuvent l'augmenter : les PI(4,5)P [PI(4,5)P et PI(3,4,5)P] évidemment, mais aussi la liaison de l'adaptateur à la clathrine (Rapoport et al., 1997). D'autres protéines paraissent également accroître l'affinité d'AP2 pour les cargos, la β arrestine évidemment qui lie la sous unité β_2 de AP2 (Laporte et al., 2000) mais aussi d'autres protéines, telles eps15 ou epsin (Benmerah et al., 1998; Aguilar and Wendland, 2005; Legendre-Guillemin et al., 2004).

Différentes voies d'endocytose dépendantes de la clathrine

Bien qu'AP2 constitue un élément important dans l'endocytose des protéines présentes à la membrane plasmique, il n'en est pas pour autant irremplaçable. L'inhibition de son expression à l'aide de RNAi n'altère ainsi que partiellement l'internalisation dépendante de la clathrine du récepteur de l'EGF ou des LDL (Motley et al., 2003). Ces résultats sont également consistants avec l'absence d'effet de la délétion du signal YXX ϕ de l'EGFR (Nesterov et al., 1995b; Sorkin et al., 1996b) ou de la mutation de la sous unité μ_2 sur l'internalisation de ce dernier (Nesterov et al., 1995c). Dans l'ensemble, ces observations alimentent l'idée que différents adaptateurs protéiques peuvent participer au recrutement des protéines cargos et qu'il existe fort probablement plusieurs voies d'endocytose dépendantes de la clathrine (Motley et al., 2003; Cao et al., 1998).

L'internalisation dépendante des rafts et/ou des caveolae

Contrairement à la voie dépendante de la clathrine, les mécanismes associés à l'internalisation par l'intermédiaire des rafts ou des caveolae sont nettement moins bien définis (Pelkmans and Helenius, 2003; Nabi and Le, 2003; Nichols, 2003b). Différentes données supportent l'idée qu'en dehors de la présence de la caveoline, ces deux voies jouent des rôles similaires (Pelkmans and Helenius, 2003; Damm et al., 2005; Di Guglielmo et al., 2003) et favorisent, dans les deux cas, l'accumulation des cargos au niveau du caveosome (Damm et al., 2005). La présence de la caveoline

semble néanmoins ralentir la dynamique du processus d'internalisation en stabilisant la vésicule naissante à la membrane, la fameuse caveolae (Damm et al., 2005; Nabi and Le, 2003). Nécessitant la réorganisation du cytosquelette et divers processus de phosphorylation (Pelkmans and Helenius, 2003; Pelkmans et al., 2002), l'internalisation par l'intermédiaire des caveolae serait donc un événement plus contrôlé que celle ne dépendant que des rafts (Nabi and Le, 2003).

L'idée qu'une population de récepteur membranaire puisse utiliser en parallèle la voie d'internalisation des clathrines et/ou celle dépendante des rafts/caveolae en fonction de ses partenaires protéiques a été illustrée à plusieurs reprises au cours des dernières années (Chen and De Camilli, 2005; Di Guglielmo et al., 2003; Puri et al., 2005; Rapacciuolo et al., 2003; Sigismund et al., 2005; Stoddart et al., 2005). Ajouté au contrôle différentiel de ces voies d'internalisation par des kinases régulant par ailleurs, divers types de récepteurs (GPCR, RTK...etc) (Pelkmans and Zerial, 2005; Pelkmans et al., 2005), ces données supportent l'existence d'un lien entre la spécificité des voies de transport d'un récepteur et son association à des complexes protéiques particuliers. Des données récentes concernant le récepteur de l'EGF suggèrent que le phénomène d'ubiquitination constitue l'interface entre transport et signalisation (Chen and De Camilli, 2005; Sigismund et al., 2005) (Fig 23).

La régulation de l'internalisation par le phénomène d'ubiquitination

En présence d'EGF, l'EGFR va induire le recrutement à la membrane de différentes protéines dont src (Mineo et al., 1999) et la E3 ubiquitin ligase cbl (Stang et al., 2004). Comme src (Wilde et al., 1999), l'activité ubiquitin ligase de Cbl a été à plusieurs reprises impliquées dans l'internalisation du récepteur de l'EGFR (de Melker et al., 2004a; de Melker et al., 2004b; Levkowitz et al., 1998; Waterman et al., 1999). En plus de participer à l'internalisation de l'EGFR, Cbl catalyserait la multi-monoubiquitination du récepteur (Haglund et al., 2003; Stang et al., 2004). La présence de l'EGF conduirait en outre à stimuler la monoubiquitination de plusieurs protéines impliquées dans la régulation de l'endocytose des récepteurs, eps15, epsin ou encore Hrs (Klapisz et al., 2002; Raiborg et al., 2003; van Delft et al., 1997).

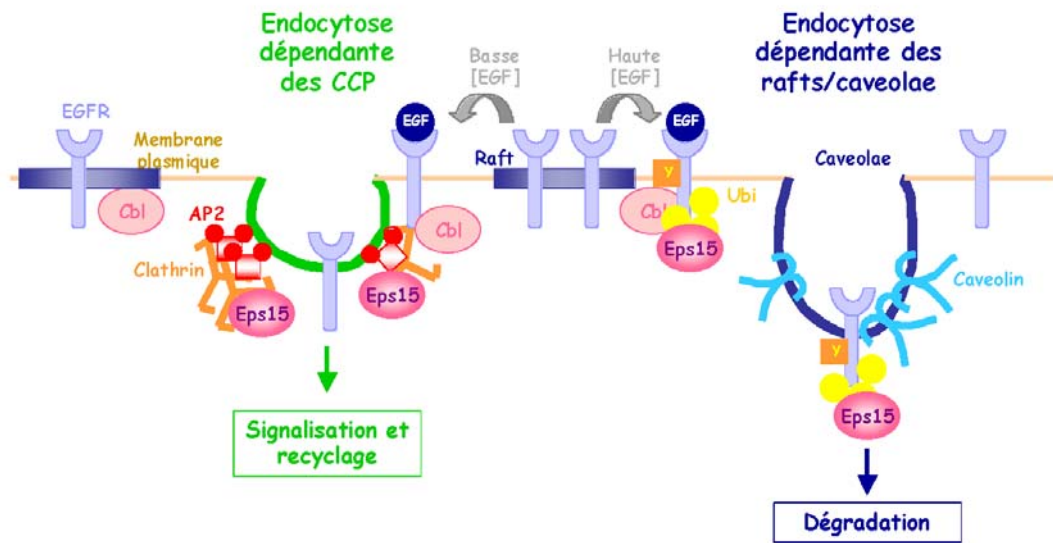


Figure 23. Implication de la voie d'internalisation Raft/caveolae dans la dégradation du récepteur de l'EGF. A basse concentration de ligand, le récepteur internalise essentiellement par la voie de la clathrine et recycle ensuite vers la membrane plasmique. En présence de concentrations élevées d'EGF, le récepteur va en outre internaliser par une voie dépendante des rafts/caveolae (Sigismund et al., 2005). Son activation et son autophosphorylation au niveau de Y1045 induit sa liaison directe à la E3-ligase Cbl (Grovdal et al., 2004) et son ubiquitination (Haglund et al., 2003). La protéine eps15 lie alors le récepteur par l'intermédiaire de ses groupements ubiquitine et participe à son endocytose. La liaison de Eps15 à l'ubiquitin inhibe sa liaison à la clathrine. Dans le cas de l'internalisation dépendante de la clathrine, les propriétés de liaisons des protéines Cbl et Eps15 au récepteur diffèrent : Cbl lierait le récepteur par son domaine RING tandis que Eps15 ne le lierait par directement (de Melker et al., 2004a; de Melker et al., 2004b).

L'ensemble de ces protéines présentant des domaines UIM de liaison à l'ubiquitine (Polo et al., 2002), leur implication dans la reconnaissance des cargos protéiques a rapidement mené à l'hypothèse que l'ubiquitination des récepteurs constituait un signal d'internalisation (Hicke, 2001a; Raiborg et al., 2003). La nature de la voie d'internalisation de ces cargos ubiquitinés est néanmoins l'objet d'intenses débats. Comme dans le cas du récepteur Ste2 de la levure (Hicke and Riezman, 1996), l'internalisation de l'EGFR ubiquitiné a longtemps été considéré dépendant de la clathrine (Stang et al., 2004; Raiborg et al., 2002; Haglund et al., 2003; Le Roy and Wrana, 2005). Des données récentes supportent pourtant clairement l'idée que ces récepteurs ubiquitinés n'internaliseraient pas selon un mécanisme dépendant de la clathrine, mais plutôt par l'intermédiaire d'une voie dépendante des rafts ou des caveolae (Chen and De Camilli, 2005; Sigismund et al., 2005). Les propriétés de liaison des protéines epsin et eps15 à l'ubiquitine seraient cruciales dans ce processus. En liant l'ubiquitine, ces protéines ne effectueraient plus un rôle d'adaptateur vis à vis des protéines des puits recouverts de clathrine (Chen and De Camilli, 2005). Au contraire, elles inhiberaient le recrutement de l'EGFR ubiquitiné vers la voie impliquant la clathrine (Chen and De Camilli, 2005; Sigismund et al., 2005) et favoriseraient son internalisation par une voie dépendante des rafts/caveolae et sa dégradation subséquente (Fig 23). Les données de Sigismund et al. montrent néanmoins clairement que ce phénomène n'interviendrait qu'à de hautes concentrations d'EGF (10-100 ng/ml). A basse concentration de ligand (1ng/ml soit 0,2nM), l'absence d'ubiquitination du récepteur conduirait à son internalisation par une voie dépendante de la clathrine (Sigismund et al., 2005). L'ubiquitination des protéines cargos déterminerait donc leur internalisation par une voie alternative à la clathrine aboutissant à leur dégradation. Si l'ubiquitination des récepteurs membranaires a été associé à leur dégradation dans de nombreux cas (Raiborg et al., 2003) depuis plusieurs années, l'implication des caveolae et des rafts dans ce processus est relativement récente et n'est encore supporté directement que par de rares publications (Chen and De Camilli, 2005; Di Guglielmo et al., 2003; Sigismund et al., 2005). Cependant, l'association aux rafts des E3 ubiquitin ligase, Cbl et Nedd4 (Lafont and Simons, 2001) ou Smurf2 (Di Guglielmo et al., 2003) et leur implication

dans l'ubiquitination de nombres de récepteurs également associés aux rafts/caveolae, l'EGFR (Mineo et al., 1996; Mineo et al., 1999), le CXCR4 (Marchese et al., 2003; Manes et al., 2000) ou le TNFR (Muppidi et al., 2004) par exemple, sont des arguments appuyant cette hypothèse. Il sera ainsi intéressant dans l'avenir d'évaluer si cette notion peut s'appliquer à un plus large spectre de récepteurs membranaires, en commençant notamment par ceux pour lesquelles des voies d'internalisation alternatives à la seule voie de la clathrine ont été décrites (Chen and Davis, 2002; Rapacciuolo et al., 2003; Stoddart et al., 2005; Allen et al., 2005; Hynes et al., 2004a; Raposo et al., 1989).

Le phénomène de fusion membranaire

Quelle que soit la machinerie protéique assurant la formation de la vésicule membranaire, celle-ci va à l'issue de son transport, fusionner avec la membrane d'un compartiment cible. Comme le bourgeonnement vésiculaire, ce phénomène est étroitement régulé.

La machinerie de fusion membranaire

La machinerie moléculaire supportant ce phénomène de fusion repose en grande partie sur les protéines SNARE (Chen and Scheller, 2001). *In vitro*, ces protéines sont à elles seules en mesure d'assurer la fusion de liposomes membranaires (Bock and Scheller, 1999) en interagissant par des liaisons de types super-hélicoïdales d'une grande promiscuité. *In vivo*, l'interaction entre les différentes protéines SNAREs est par contre beaucoup plus spécifique et les partenaires d'interaction d'un couple de SNARE donné présentent une localisation très précise au sein des cellules (McNew et al., 2000).

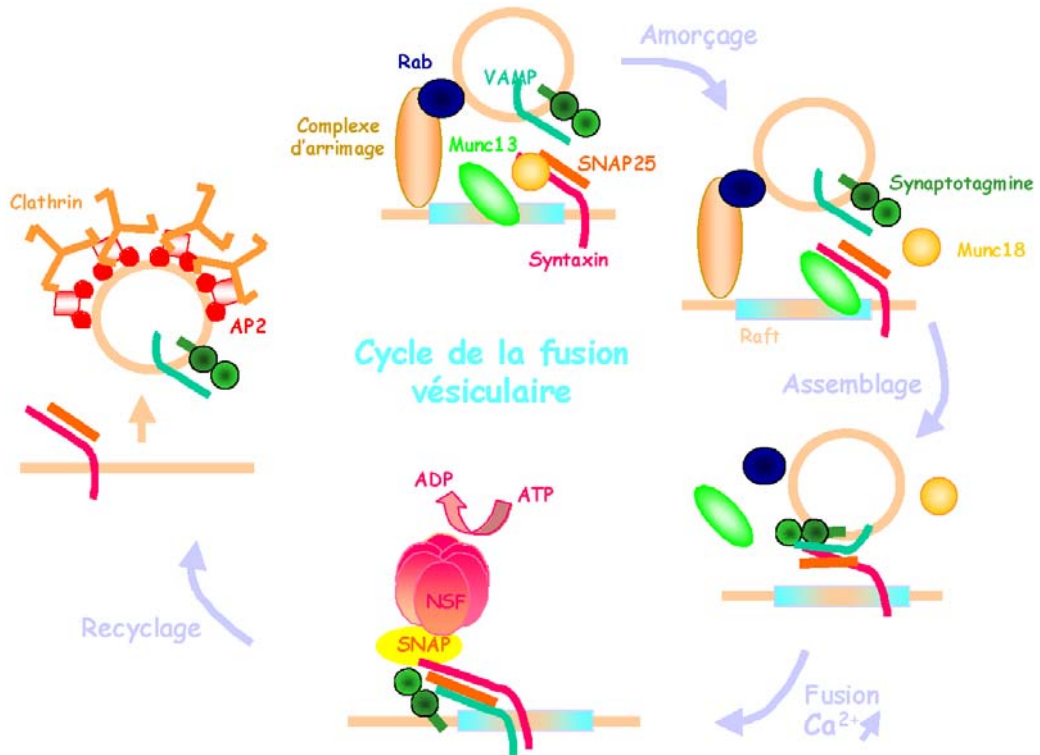


Figure 24. Mécanisme de fusion membranaire lors de l'exocytose des neurotransmetteurs.

Ce phénomène se déroule en quatre étapes : arrimage, amorçage, assemblage et fusion. L'arrimage va être assuré par une machinerie complexe comprenant entre autres, les protéines Rim et Sec6/Sec8/Exo70 qui constitue l'exocyste (Bowser et al., 1992; Hsu et al., 1999). L'exocyste semble présenter une association membranaire préférentielle avec les zones membranaires de type raft. A ce stade, la syntaxin est liée à Munc18 dans une conformation inactive. L'étape d'amorçage du processus de fusion est dépendante de l'activité de la protéine G monomérique Rab3 et s'accompagne d'une dissociation de Munc18 de la Syntaxin qui s'associe alors à Munc13. L'étape d'assemblage consiste en la formation du triple complexe SNAP25/Syntaxin/VAMP relié par l'intermédiaire de quatre domaines zipper de leucine ou *coiled coil*. Il a été proposé que ces complexes se localisent préférentiellement au niveau de structure rafts (Lafont et al., 1999). Lorsque la concentration en calcium augmente, le domaine C2B de la synaptotagmine peut alors lier les PI(4,5)P2 et induire le phénomène de fusion membranaire (Brunger, 2001). Les protéines de la membrane vésiculaire se localisent alors au niveau de la membrane plasmique. La protéine AAA ATPase NSF et son co-facteur SNAP qui favorisent l'étape d'assemblage du triple complexe SNARE, moduleraient également son désassemblage et par la même le recyclage de VAMP et synaptotagmine. Cette étape de recyclage est probablement dépendante des puits recouverts de clathrine et assure le renouvellement du pool vésiculaire.

Un nombre important de protéines participent ainsi au contrôle de la spécificité des interactions et de la localisation des SNARE (Brunger, 2001). Parmi eux, les protéines G de type rab (Zerial and McBride, 2001) et la protéine NSF et son cofacteur SNAP (Whiteheart and Kubalek, 1995) jouent des rôles essentiels. Comme les SNAREs, les différentes protéines rab arborent une localisation cellulaire très spécifique, déterminant leur fonction (Zerial and McBride, 2001). Les protéines NSF et SNAP semblent quant à elles impliquées dans la régulation de divers phénomènes de fusion membranaire (transport vésiculaire intracellulaire [Revue par (Rothman, 1994; Whiteheart and Kubalek, 1995)], sécrétion de neurotransmetteurs (Brunger, 2001), dé-granulation dans les neutrophiles (Matsushita et al., 2003) ou au niveau des épithélia intestinaux, réaction acrosomale du spermatozoïde...etc) s'effectuant en des compartiments distincts des cellules. Leur rôle est de moduler la dynamique de l'interaction en *trans* des SNARE présents au niveau de la membrane cible (ex : SNAP25 et STX1 dans le cas de la libération des neurotransmetteurs), et du SNARE présent au niveau de la membrane vésicule, VAMP. Ce faisant, SNAP et NSF régulent non seulement la formation de ce complexe durant l'étape d'attachement ou de *priming* vésiculaire, mais également la dissociation du complexe VAMP/SNAP25/STX1, à l'issue de la fusion (Littleton et al., 1998) (Fig 24). Cette dernière étape est importante dans la maintenance de l'asymétrie membranaire et le recyclage des SNAREs vésiculaires.

La protéine NSF

La plupart des activités cellulaires connues de NSF semblent dépendantes de son activité ATPasique (Whiteheart and Matveeva, 2004). Comme d'autres AAA ATPases, telles que P97/Cdc48 (une protéine initialement impliquée dans la régulation des fusions membranaires homologues), elle présente deux domaines de liaison à l'ATP (Brunger and DeLaBarre, 2003) incluant des motifs conservés Walker A/ Walker B (Walker et al., 1982) caractéristiques des protéines de la famille ABC (Fig 25).

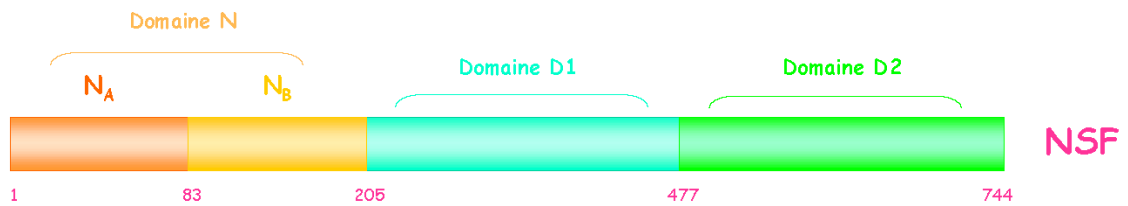


Figure 25. Représentation de l'organisation moléculaire de la protéine NSF.

Organisée en hexamère, chaque monomère présente un domaine N-terminal essentiel à la liaison de nombreux partenaires, dont SNAP et deux domaines ATPasique D1 et D2. Le domaine D1 est essentiel à la fonction de chaperonne moléculaire de NSF tandis que le domaine D2 est impliqué dans l'hexamérisation de la protéine. Contrairement au domaine D1, le domaine D2 présente une activité ATPasique très limitée (Whiteheart and Matveeva, 2004).

Si l'intégrité du domaine D2 détermine l'hexamérisation de NSF, l'activité ATPasique du domaine D1 est essentielle à sa fonction de chaperone. Sa liaison à SNAP lorsqu'il est associé aux SNARE stimule l'activité ATPasique du domaine D1 (Fig. 25) et les changements conformationnels en découlant. La modulation de ce phénomène par l'intermédiaire de mécanismes de phosphorylation par PKC (Matveeva et al., 2001) ou des tyrosines kinases de la famille src (Huynh et al., 2004), ou de nitrosylation (Matsushita et al., 2003) (Fig. 25) positionne NSF comme la cible potentielle de différentes voies de signalisation (Morgan and Burgoyne, 2004). Sa phosphorylation par PKC (S²³⁶) ou src (Y⁸³) inhibe sa liaison au complexe SNARE/SNAP et en conséquence la sécrétion vésiculaire, en altérant principalement le renouvellement du pool vésiculaire (Matveeva et al., 2001) (Fig 26). La nitrosylation de NSF, au niveau de ses résidus C²¹, C⁹¹ et C²⁶⁴, module par contre l'activité ATPasique de la protéine (Matsushita et al., 2003; Morrell et al., 2005). Jusqu'à présent, ces modifications post-traductionnelles ont été impliquées dans la modulation de la fonction de NSF au cours de la dé-granulation des cellules hématopoïétiques (Huynh et al., 2004; Matsushita et al., 2003) ainsi que dans la modulation du transport du récepteur GluR2 en réponse à la stimulation du récepteur ionotropique au NMDA dans les neurones (Huang et al., 2005).

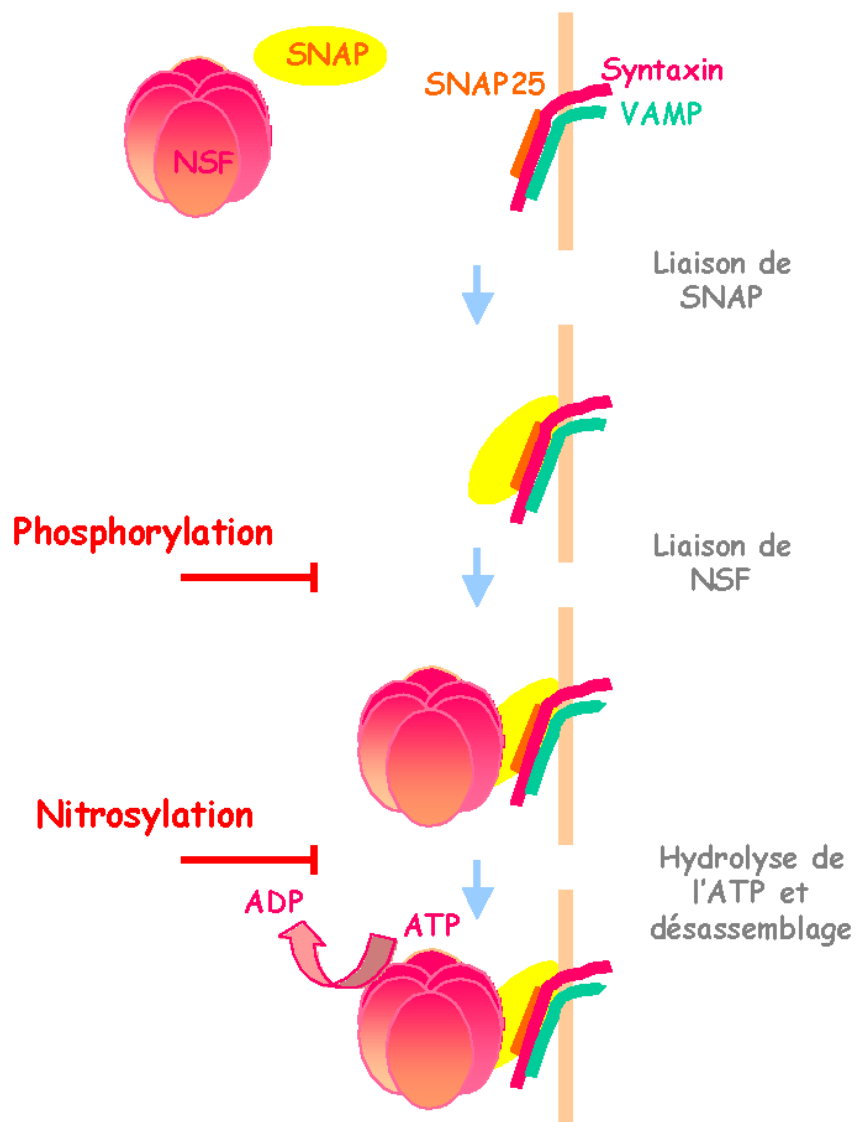


Figure 26. Mécanisme d'action de NSF au cours du désassemblage du complexe SNARE et les phénomènes le régulant.

A l'issue de la liaison de SNAP au triple complexe SNAP25/VAMP/Syntaxin, NSF le lie. Ayant à la fois un rôle de facteur d'échange ATP et d'activateur de l'ATPase de NSF, cette liaison mène au désassemblage du triple complexe initial. Dissociée de ses homologues membranaires, VAMP peut alors être recyclé par la voie des puits de clathrine. La phosphorylation de NSF au niveau de S²³⁶ par PKC ou de Y⁸³ par les protéines tyrosines kinases de la famille Src va inhiber la capacité de liaison de NSF à SNAP. Sa nitrosylation va par contre moduler l'activité ATPasique de son domaine D1.

Le contexte cellulaire semble être largement favorable à la formation de complexes protéiques multimériques impliquant les différents acteurs de la signalisation. C'est cependant grâce à une extrême compartimentation et au développement de mécanismes de régulation dynamiques des interactions protéiques que la composition précise de ces complexes paraît garantie. Les rafts et les mécanismes de contrôle des interactions protéiques par l'intermédiaire de protéines chaperones, par exemple ou de modifications post-traductionnelles, telles que l'ubiquitination, semblent donc concourir à la spécificité de ces complexes. Au-delà de la spécificité, ces différents mécanismes cellulaires devraient en théorie également influencer l'efficacité de la transduction du signal. C'est à cette première problématique générale que nous nous sommes intéressés dans ce travail par l'intermédiaire de deux GPCR différents, le récepteur β 2-adrénergique et le récepteur GABA_B.

Localisés de manière concomitante à ses partenaires de signalisation dans des microdomaines membranaires de type rafts, le récepteur β 2-adrénergique apparaissait comme un modèle pertinent pour déterminer les répercussions de la co-compartimentation membranaire sur l'efficacité de signalisation d'un récepteur à 7TM.

La fonctionnalité du récepteur GABA_B étant strictement dépendante de son hétérodimérisation, son interaction potentielle avec la protéine NSF -une chaperone régulant classiquement les interactions protéiques- offrait un modèle doublement intéressant en raison de la modulation potentielle par NSF de l'intégrité de l'hétérodimère ou des complexes de signalisation lui étant associés. Dans tous les cas, le récepteur GABA_B semblait approprié pour l'étude des conséquences de la modulation des complexes sur l'efficacité de transfert du signal.

A l'instar des protéines chaperones comme NSF, les modifications post-traductionnelles semblent jouer un rôle important dans la régulation dynamique des complexes de signalisation. L'ubiquitination est à ce titre particulièrement intéressante en raison de sa capacité à contrôler à la fois les interactions protéiques mais aussi, le transport et la dégradation des protéines ubiquitinées. Son influence

émergeante dans la fonction de la protéine adaptatrice β arrestine et dans la détermination des capacités de liaison de cette protéine, la positionne ainsi comme un phénomène clef de la régulation de l'activité d'une majorité de GPCR. De manière très intéressante, l'ubiquitination de la β arrestine va néanmoins être étroitement dépendant de la nature du récepteur induisant sa translocation à la membrane. Transitoire dans le cas des récepteurs de classe A comme le β 2AR, elle devient en revanche persistante dans le cas des récepteurs de classe B comme le V2R. Ces observations soulignent donc l'existence hypothétique d'une relation étroite entre la dynamique de l'ubiquitination de la β arrestine et ses capacités d'interaction fonctionnelles, non seulement vis à vis des récepteurs, mais également vis à vis de la trentaine de ses partenaires protéiques potentiels n'appartenant pas à la famille des GPCR. C'est donc dans l'optique d'étudier ce lien que nous avons développé une méthode nous permettant de suivre en temps réel et dans des cellules vivantes, à la fois la dynamique de l'ubiquitination de la β arrestine, mais aussi l'évolution de son interaction avec des partenaires potentiels. Afin d'établir la faisabilité de cette méthode reposant sur la technologie du transfert d'énergie par résonance de bioluminescence ou BRET, nous avons étudié l'influence de l'activation des récepteurs β 2AR ou V2R sur le statut d'ubiquitination de la β arrestine tout en suivant l'évolution de la translocation de la β arrestine au récepteur, dans le cas du V2R.

L'objet de ce dernier chapitre d'introduction sera donc de présenter les propriétés physiologiques et moléculaires de chacun des trois récepteurs étudiés dans cette thèse, c'est à dire les récepteurs β 2-adrénergique, V2-vasopressine et $GABA_B$. Nombreuses des caractéristiques des deux premiers récepteurs ayant été évoquées au cours des premiers chapitres de cette introduction, nous n'en ferons qu'une présentation relativement brève et ciblée. La littérature concernant le récepteur $GABA_B$ sera néanmoins envisagée plus en détail en raison non seulement de son clonage plus récent, mais aussi de l'intérêt de ces informations vis à vis de l'analyse des résultats présentés dans la publication n°2.

LES TROIS RÉCEPTEURS MODÈLES

LE RÉCEPTEUR β_2 -ADRÉNERGIQUE

La conservation de l'homéostasie d'un organisme est essentielle dans un environnement en perpétuel changement. Le système nerveux sympathique joue un rôle essentiel dans cette adaptation. Les réponses métaboliques et physiologiques au système sympathique sont médiées par l'action des cathécolamines, la norépinéphrine et l'épinéphrine, à travers leur liaison aux récepteurs adrénergiques. En fonction de leurs propriétés pharmacologiques, les récepteurs adrénergiques peuvent être répartis en trois sous-familles distinctes, les récepteurs α_1 , α_2 et β -adrénergiques (Barki-Harrington et al., 2004).

Les tissus cardiaques expriment à la fois les récepteurs α_1 et β -adrénergiques. Néanmoins, ce sont les récepteurs β -adrénergiques qui participent principalement au contrôle et à la régulation des fonctions cardiaques. On distingue trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques, les récepteurs β_1 -, β_2 - et β_3 -adrénergiques (β_1 AR, β_2 AR et β_3 AR), mais ce sont les isotypes β_1 AR et β_2 AR qui sont principalement exprimés dans le cœur à un ratio d'environ 80-20, respectivement (Rockman et al., 2002).

Signalisation

Chacun de ces deux récepteurs présente un couplage préférentiel à la protéine Gs qui conduit à l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et subséquentement de la PKA. Cette stimulation de la kinase serait un élément déterminant dans l'activation des canaux calciques de type L et de la régulation de la contractilité cardiaque par les β -adrénergiques (Barki-Harrington et al., 2004; Steinberg and Brunton, 2001). La voie AMPc semble être la cascade de signalisation dominante des récepteurs β -adrénergiques, néanmoins leur efficacité de couplage vis à vis de l'AC diffère considérablement (Steinberg and Brunton, 2001). Qu'il s'agisse de la souris (Xiang et al., 2002a) ou du rat (Rybin et al., 2003), la part du β_1 AR dans l'augmentation de l'AMPc intracellulaire est

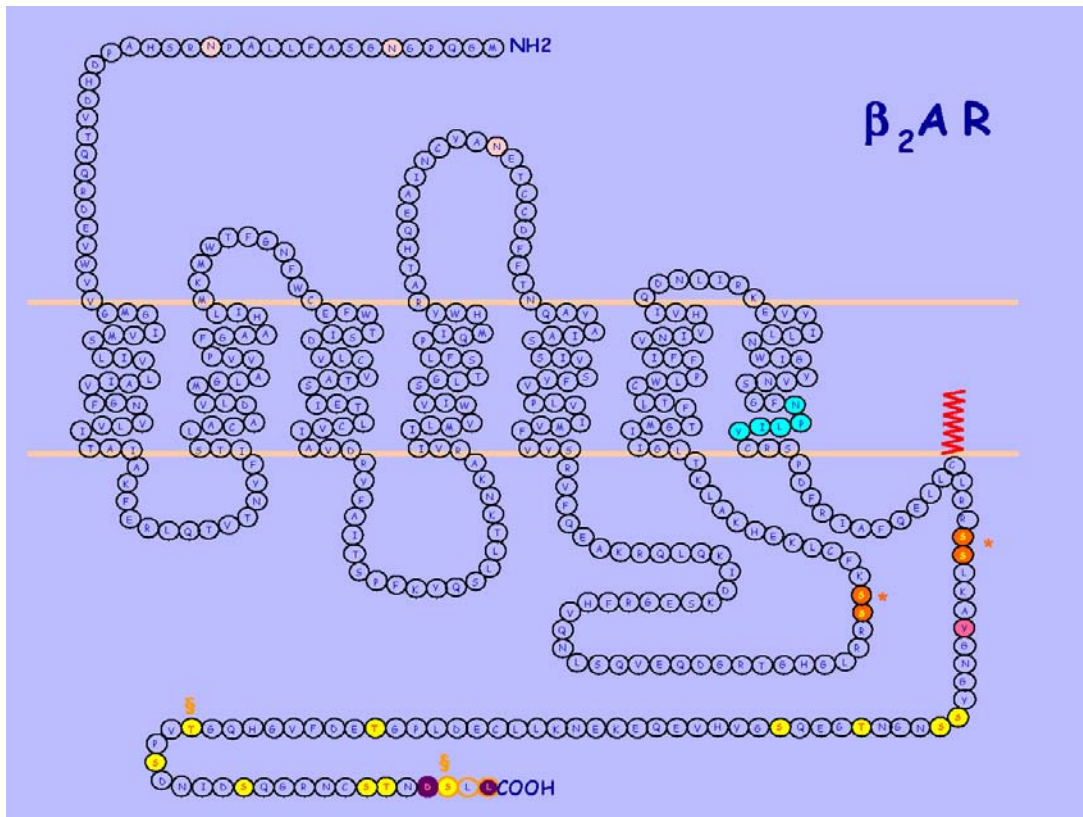


Figure 27. Séquence du récepteur β_2 AR.

Différents sites de régulation importants sont présentés sur cette figure. Les sites de glycosylation du récepteur sont indiqués en rose pâle. Le motif NPXXY en turquoise. Le site de palmytilation au niveau de la C³⁴¹ du récepteur. Les sites PKA en orange sont indiqués par une *. Les sites de phosphorylation GRK (2 et 5) sont mis en évidence en jaune. Les sites spécifiques de GRK5 sont indiqués par §. Le résidu Y³⁵⁰ phosphorylé par le récepteur à insuline est indiqué en fushia (Valiquette M 1995 EMBO; Wang HY 2000 JBC). Le motif de reconnaissance PDZ c-terminal DSSL (entouré en orange) est impliqué dans la reconnaissance de NHERF. Les résidus D⁴¹⁰ et L⁴¹³ (en violet) sont essentiels à son interaction. La mutation de nul de ces quatres résidus n'altère la liaison du récepteur à la AAA ATPase NSF (Cong et al., 2001). Seule la délétion du motif PDZ inhibe cette interaction.

nettement supérieure à celle du β_2 AR. Indépendamment de sa plus faible expression par rapport au β_1 AR, le couplage à l'AC du β_2 AR semble beaucoup plus régulé. Reflétant ce contrôle étroit, l'augmentation de la concentration cytosolique d'AMPc en réponse au β_2 AR s'effectue dans des zones très précises des cellules cardiaques (Zaccolo and Pozzan, 2002).

Cette régulation de l'activité du β_2 AR pourrait être dépendante de sa capacité de couplage à la protéine Gi (Xiao et al., 1995; Abramson et al., 1988) dans le cœur. Ce changement d'affinité vis à vis de Gi résulte de la phosphorylation du β_2 AR par PKA (Daaka et al., 1997) au niveau de ses S^{345/346} (Moffett et al., 1993). Si comme nous l'avons évoqué, β_1 AR peut également faire l'objet d'une régulation similaire vis à vis de son couplage à Gi (Martin et al., 2004), elle n'interviendrait pas dans le contexte cardiaque (Steinberg and Brunton, 2001).

Le couplage du β_2 AR à la protéine Gi a donc été impliqué dans la régulation de la contractilité cardiaque (Xiang et al., 2002a; Xiang and Kobilka, 2003). Néanmoins, le rôle de la protéine Gi dans la limitation de l'augmentation d'AMPc par le β_2 AR semble beaucoup plus contesté (Rybin et al., 2003; Zhou et al., 1997). Si l'AMPc détermine fortement le niveau de contractilité cardiaque, cette dernière ne semble pas nécessairement constitué un reflet fidèle des processus de couplage du récepteur à l'AC.

Compartimentation membranaire

Autre hypothèse ayant été proposée pour rationaliser les différences de couplage à l'AC des récepteurs β_1 AR et β_2 AR, est la compartimentation membranaire différentielle de ces deux récepteurs dans les cardiomyocytes. En accord avec cette idée, le β_2 AR a été localisé en système hétérologue (Schwencke et al., 1999), comme dans les cardiomyocytes (Ostrom et al., 2001; Rybin et al., 2000; Xiang et al., 2002a), dans des structures caveolae et semble co-immunoprécipiter avec la caveoline (Ostrom et al., 2001; Rybin et al., 2000; Xiang et al., 2002a). Les données pharmacologiques appuient en outre l'idée que la distribution préférentielle du β_2 AR

dans les caveolae soit à la source de son couplage restreint à l'AC en comparaison du β_1 AR. En effet, la déplétion en cholestérol par l'intermédiaire de la filipine ou de la cyclodextrine, conduit à une augmentation de l'efficacité de couplage du récepteur β_2 AR (Rybin et al., 2000; Rybin et al., 2003; Xiang et al., 2002a) tandis qu'elle ne semble pas influencer l'activité du β_1 AR (Rybin et al., 2000). L'analyse de la distribution du β_1 AR à l'état endogène dans les cardiomyocytes de rat, suggère d'ailleurs que la population de récepteur localisé dans les caveolae, soit nettement inférieure à celle du β_2 AR (Rybin et al., 2000).

De manière consistante avec l'idée que la compartimentation du β_2 AR soit essentielle au contrôle de son efficacité de couplage à l'AC, la délétion d'un motif de reconnaissance de domaine PDZ, présent dans sa queue c-terminale, s'accompagnerait de son augmentation de couplage à la voie d'AMPC (Xiang and Kobilka, 2003).. En outre, cette activité du récepteur mutant serait nettement moins influencée par un traitement de déplétion en cholestérol membranaire à la filipin que son homologue sauvage (Xiang et al., 2002a; Xiang and Kobilka, 2003). Ces résultats suggèrent que la liaison à ce niveau de protéines, telle que NHERF, puisse être importante dans le contrôle de la compartimentation et dans la régulation de l'on activité du β_2 AR. La capacité d'interaction de NHERF et d'une protéine liant à la fois le cytosquelette mais également la PKA, l'ezrin (Bretscher et al., 2002b; Hall et al., 1998), pourrait ainsi être responsable de l'importance du motif PDZ du β_2 AR. L'absence de compartimentation précise dans la cellule du récepteur, pourrait en outre conduire à une altération de son couplage à la phosphodiesterase PDE4 limitant l'augmentation d'AMPC en réponse à la stimulation du β_2 AR dans le cœur (Xiang et al., 2005; Baillie et al., 2003; Perry et al., 2002).

L'ensemble de ces données suggèrent que la régulation précise de la signalisation complexe du β_2 AR est dépendante de sa compartimentation membranaire. Cette hypothèse très attrayante se heurte néanmoins à l'observation d'une co-compartimentation du récepteur et de ses partenaires de signalisation dans les caveolae, les protéines Gs, Gi, l'AC, la PKA (Chang et al., 1994; Oh and Schnitzer, 2001; Razani et al., 1999; Rybin et al., 2000). Il est très intéressant de

s'arrêter quelques lignes sur la nature des expériences ayant conduit à ces observations de co-compartimentation. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent d'introduction, les différentes méthodes biochimiques de purification des rafts/caveolae, ne permettent vraisemblablement qu'une piètre résolution quant à la diversité des microdomaines de type rafts présents dans les cellules. L'ensemble des données soutenant l'hypothèse d'une co-distribution du β 2AR et de ses partenaires de signalisation dans les caveolae ou les rafts (Rybin et al., 2000; Schwencke et al., 1999; Xiang et al., 2002a) reposent sur la seule technique de Song (Song et al., 1996). Ainsi, les résultats de co-compartimentation apparente pourraient ne résulter que d'un simple manque de résolution de cette technique de purification.

Régulation de l'activité et désensibilisation

La compartimentation basale des complexes de signalisation influence potentiellement l'efficacité de transfert de l'information entre les différents partenaires mis en présence. Néanmoins, l'association dynamique du β 2AR à des protéines particulières est également essentiel à la régulation de son activité de couplage à la protéine Gs. Parmi elles on retrouve bien évidemment, les kinases GRK et la β arrestine. Comme nous l'avons vu précédemment, à l'issue de son activation, la conformation du récepteur est reconnue par une GRK qui vient alors phosphoryler ce dernier. Ce phénomène induit le recrutement de la β arrestine, décrit préalablement, mais également dans le cas de GRK2, le recrutement de la PI3K (Naga Prasad et al., 2001). Cette dernière régulerait le phénomène d'internalisation du récepteur en favorisant le recrutement du complexe récepteur- β arrestine dans les puits recouverts de clathrine par le complexe adaptateur AP2 (Naga Prasad et al., 2002) et ce de manière dépendante à son activité protéine kinase (Naga Prasad et al., 2005).

LE RÉCEPTEUR V2-VASOPRESSINE

Comme les récepteurs V1a/b, le récepteur V2 lie la vasopressine (AVP) dont la libération contribue à réguler l'osmolarité sanguine. Exprimé spécifiquement dans le rein, il est couplé, à l'image du β 2AR, à la protéine Gs (Laszlo et al., 1991). Le comportement du V2R se distingue néanmoins largement de celui du β 2AR, par plusieurs points. Sa conformation active constitue un site de reconnaissance pour la protéine GRK5 dont l'activité kinase conduit à la phosphorylation des sérines S^{362/363/364} et à la désensibilisation fonctionnelle du récepteur (Innamorati et al., 1998). Cet événement de phosphorylation augmente l'affinité de la β arrestine pour le V2R qui arbore ainsi les propriétés des récepteurs de classe B (Oakley et al., 1999; Oakley et al., 2001). Au contraire du β 2AR, de classe A, la désensibilisation du V2R s'accompagne de son internalisation et de sa rétention intracellulaire.

Physiologiquement, le V2R semble dévoué à la régulation de l'expression à la surface apicale des tubes collecteurs, d'un canal à eau, l'aquaporine de type 2 (AQP2). En présence d'AVP, la stimulation du récepteur active la PKA qui induit la translocation de l'AQP2 à la membrane plasmique en phosphorylant le résidu S²⁵⁶ (Fushimi et al., 1997; Katsura et al., 1997).

De manière intéressante, les événements de transport membranaire assurant la translocation de l'AQP2 semblent très similaires à ceux impliqués dans la translocation du Glut4 en réponse à l'insuline (Kanzaki and Pessin, 2003). A l'état basal, les deux protéines sont présentes, bien que dans des proportions différentes, dans des vésicules prêtes à fusionner avec la membrane plasmique. Reposant sur un mécanisme de fusion membranaire classique, la machinerie protéique assurant la translocation de ces vésicules et leur fusion à la membrane plasmique est tout à fait similaire à celle impliquée dans les processus d'exocytose des neurotransmetteurs ou encore de la dégranulation. La syntaxine 3, SNAP-23 et VAMP-2 seraient dans ce cas spécifiquement impliqués (Inoue et al., 1998; Brown, 2003; Ward et al., 1999). Finalement, l'observation que l'AQP2 s'associe avec des structures rafts pourrait également être réminiscente de l'implication de ces microdomaines dans la régulation

de l'expression de Glut4 par l'exocyste (Randhawa et al., 2004; Mastick and Falick, 1997; Kanzaki and Pessin, 2003). Il est donc particulièrement intrigant d'observer que le V2R, un récepteur présent dans la membrane basolatérale des tubes collecteurs (une membrane qui est d'ailleurs dépourvu en théorie de microdomaines de type raft), semble en mesure de réguler par l'intermédiaire de la PKA la translocation d'une protéine au niveau de la face apicale de ces même structures. L'étroite compartimentation de la voie de l'AMPc qui semblait relativement de rigueur dans le cas du β 2AR semble donc dans ce cas, a priori inopportune.

LE RÉCEPTEUR GABA_B

Découvert en 1949 chez le tubercule (Steward GR, 2005), l'acide γ -aminobutyrique (GABA) constitue un signal extracellulaire reconnu chez les bactérie (Belitsky and Sonenshein, 1999), les protistes (Ramoino et al., 2003), les plantes (Bouche et al., 2003) et les animaux (Owens and Kriegstein, 2002). Ses rôles physiologiques vont être variables, source d'azote chez les bactéries, il joue le rôle de chemo-attractant chez la paramécie (Ramoino et al., 2003) et les plantes chez qui il guide le développement des organes reproducteurs (Bouche et al., 2003). Ce rôle dans la reproduction semble également conservé chez les animaux puisqu'il y régule entre autres, la migration des cellules neuronales produisant l'hormone de relâche gonadotrophe (GnRH; (Heger et al., 2003)) et le processus de migration et de réaction acrosomale des spermatozoïdes (Murase and Roldan, 1996). Cette fonction de chemo-attractant semble néanmoins s'étendre, dans ce cas, au delà du seul système reproducteur puisque le GABA module également la prolifération, la migration et la différenciation des cellules neuronales (Owens and Kriegstein, 2002). Premier neurotransmetteur inhibiteur à avoir été mis en évidence, le rôle du GABA dans la régulation de l'activité du système nerveux central reste de loin le plus documenté (Sudhof TC, 2005). Chez les animaux, différents types de récepteurs vont détecter la présence de GABA : des récepteurs de type ionotropique, GABA_A et métabotropique GABA_B.

Le récepteur GABA_A est un canal permettant le passage d'ions chlore ou bicarbonate au travers de la membrane, en fonction de leur concentration respective de part et d'autres de cette dernière (Bormann, 2000). Ce sont des complexes pentamériques inhibés par la présence de bicuculine. Les récepteurs GABA_A présentent néanmoins un variant pharmacologique, le GABA_C, insensible à ce composé (Mehta and Ticku, 1999; Bormann, 2000). Globalement, ils sont impliqués dans les effets rapides du GABA et induisent dans les neurones matures une hyperpolarisation des cellules, inhibant leur activité.

Le récepteur GABA_B fait partie de la famille des GPCR. Caractérisé physiologiquement dès 1981 par son insensibilité à la bicuculine (Hill and Bowery, 1981), ce n'est qu'en 1997 que le groupe de Bettler parvient à cloner un récepteur à 7TM, le GBR1, liant le GABA avec une affinité inférieure de deux ordres de grandeurs par rapport au récepteur natif (Kaupmann et al., 1997). La présence d'un motif de rétention dans le ER dans la région c-terminale de ce récepteur inhibe en outre son expression à la surface cellulaire (Couve et al., 1998; Margeta-Mitrovic et al., 2000) en système hétérologue. Ces différences entre le GBR1 et le récepteur métabotrope natif du GABA ont conduit au clonage d'un second récepteur homologue au GBR1, le GBR2 (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998a; Kuner et al., 1999; White et al., 1998), permettant l'expression de GBR1 à la surface et la reconstitution d'un récepteur présentant des propriétés pharmacologiques similaires au récepteur natif. L'ensemble de ces résultats supporte l'idée d'une hétéro-dimérisation constitutive des récepteurs GBR1 et GBR2 à l'origine des propriétés physiologiques du récepteur GABA_B (Fig 28). Cette hypothèse qui s'est révélée un élément charnière dans l'évolution du concept d'oligomérisation des GPCR (Bouvier, 2001) a été confirmée par l'abolition de la réponse métabotrope au GABA dans des souris invalidées pour les gènes codant GBR1 ou GBR2 (Gassmann et al., 2004; Schuler et al., 2001). Les études menées sur l'expression au cours du développement des différents isoformes de GBR1 ou sur la localisation respective des sous unités GBR1 ou GBR2 illustrent une réalité physiologique allant néanmoins au delà de la seule hétéro-dimérisation des récepteurs GBR1 et GBR2.

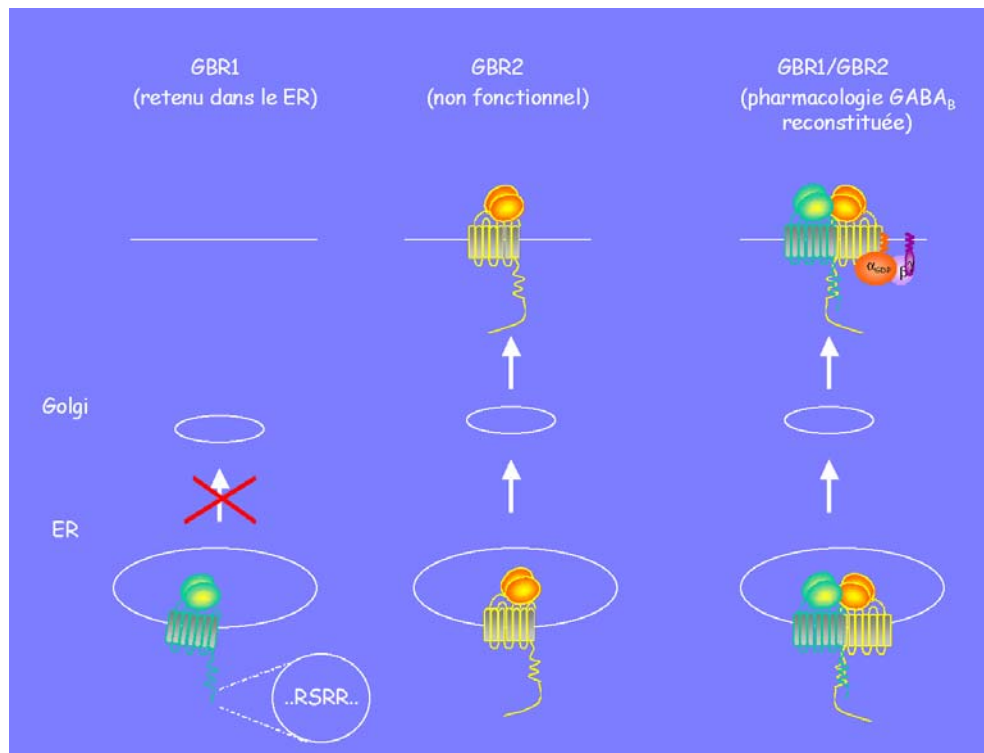


Figure 28. Représentation des propriétés de transport à la membrane des récepteurs GBR1 et GBR2 dans des systèmes hétérologues.

Exprimé seul, GBR1 ne parvient pas à la surface membranaire en raison de la présence d'un motif RXRR reconnu par les coatamères de type COPI qui favorise sa rétention dans le réticulum endoplasmique. GBR2 est quant à lui parfaitement autonome vis à vis de son transport vers la surface. Il n'est cependant pas en mesure de lier le GABA ou d'activer aucune voie de signalisation connue. Seule la co-expression des deux récepteurs permet l'expression à la surface du GBR1 et la reconstitution d'une pharmacologie similaire à celle observée dans des tissus natifs. Cette observation et la mise en évidence d'une interface de liaison de type *coiled coil* entre les deux récepteurs a conduit à l'hypothèse que l'hétérodimère GBR1/ GBR2 correspond au récepteur GABA_B (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998a; Kuner et al., 1999; Nair et al., 2002; White et al., 1998). L'interface *coiled coil* permettrait le masquage du motif RXRR de GBR1 par GBR2 (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Dans le contexte de l'hétérodimère, chacune des sous unités présente un rôle bien défini : GBR1 lie le GABA tandis que GBR2 permet le couplage à la protéine G (Galvez et al., 2001; Margeta-Mitrovic et al., 2001a).

Distribution cellulaire au cours du développement

Exprimés dans l'ensemble du système nerveux central et entre autres, au niveau des organes génitaux (He X 2003 J Rep Dev), les récepteurs GBR1 et GBR2 voient leur expression et leur distribution changer au cours du développement (Bischoff S

1999 J Comp Neuro). Dans les neurones, leur expression respective augmente au fur et à mesure du développement (Correa et al., 2004) et subit une re-localisation du corps cellulaire vers l'axone (zone pré-synaptique) puis les dendrites (zone post-synaptique). Si les sites de liaison spécifiques GABA_B se superposent globalement aux régions cérébrales co-exprimant GBR1 et GBR2 (Bischoff et al., 1999), ces deux récepteurs exhibent pourtant dans certains cas des expressions et des localisations distinctes (Clark et al., 2000; Ng and Yung, 2001; Fritschy et al., 2004; Vernon et al., 2001). L'ensemble de ces données suggère qu'en plus de leur implication dans la physiologie associée au GABA_BR dans le cadre de l'hétéro-dimère GBR1/GBR2, GBR1 et GBR2 présentent tout deux des rôles indépendants encore indéterminés.

Le récepteur GBR1 présente deux isoformes majeurs, GBR1a et GBR1b, produits de deux transcrits différents et se distinguant par le nombre de domaines sushi qu'ils exhibent dans leur région extracellulaire (2 pour GBR1a et 1 pour GBR1b). L'expression respective de chacun de ces deux isoformes est également régulée au cours de la maturation du système nerveux. GBR1a est exprimé rapidement à l'issue de la naissance, se localisant au niveau pré-synaptique, tandis que GBR1b s'exprime plus tardivement au niveau post-synaptique (Fritschy et al., 1999; Kaupmann et al., 1998b). En outre, certains neurones ne vont exprimer que l'un ou l'autre de ces deux récepteurs. Les cellules granulaires de cervelet expriment principalement GBR1a tandis que les cellules de Purkinje n'expriment que GBR1b (Bischoff et al., 1999).

Fonction physiologique

En termes fonctionnels, deux grandes populations de récepteurs GABA_B se distinguent par leur fonction et leur localisation pré- ou post-synaptiques. Qu'il s'agisse du néocortex (Luhmann and Prince, 1991) ou bien de l'hippocampe (Gaiarsa et al., 1995), les récepteurs pré-synaptiques deviennent actifs quelques jours après la naissance tandis que la mise en place des récepteurs post-synaptiques n'intervient qu'une à deux semaines plus tard. Ces observations corrént, comme nous l'avons

vu, avec l'évolution de l'expression des récepteurs GBR1a et GBR1b (Fritschy et al., 1999; Kaupmann et al., 1998b).

Les propriétés pharmacologiques et les propriétés de couplage de ces deux populations de récepteurs GABA_B vont ainsi se distinguer clairement (Dutar and Nicoll, 1988a). **La population post-synaptiques** semble essentiellement couplées aux canaux GIRK (Luscher et al., 1997) et contribue inhiber l'excitabilité synaptique (Dutar and Nicoll, 1988b; McCormick, 1989). **La population pré-synaptique** semble quant à elle couplée aux canaux calciques et régule l'exocytose des neurotransmetteurs dans les synapses GABAergique (autorécepteurs) ou sécrétant d'autres types de neurotransmetteurs (hétéro-récepteurs).

Ces deux populations de récepteurs pré-synaptiques présentent néanmoins une sensibilité différentielle à la pertussis toxine (inhibiteur de la protéine Gi/o) et aux esters de phorbol (Dutar and Nicoll, 1988a; Thompson and Gahwiler, 1992). Chacune de ces populations est sensible aux esters de phorbol tandis que seul les auto-récepteurs sont inhibés par la pertussis toxine. Ces données suggèrent donc que les mécanismes moléculaires associés à la régulation de l'exocytose par ces deux populations de récepteurs soient différents.

Ces observations pourraient être réminiscentes du double rôle du GABA_BR, dans la régulation de l'exocytose. Il inhibe d'une part les canaux calciques par l'intermédiaire de son couplage à la protéine Gi/o (Strock and Diverse-Pierluissi, 2004). Il inhibe d'autre part directement la machinerie de fusion membranaire (Capogna et al., 1996; Scanziani et al., 1992; Spafford and Zamponi, 2003; Wu and Saggau, 1997) par l'intermédiaire d'un mécanisme restant indéfini.

Ce rôle du GABA_BR dans la modulation de l'exocytose des neurotransmetteurs reflète son implication dans la modulation de la sécrétion vésiculaire de manière plus large, qu'il s'agisse de la régulation de la réaction acrosomique du spermatozoïde (Murase and Roldan, 1996; Shi et al., 1997), de la sécrétion des hormones sexuelles (Ferreira et al., 1996; Heger et al., 2003) ou de celle des sucs gastriques (Piqueras and Martinez, 2004). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces aspects de la fonction physiologique du GABA_BR ont été nettement moins étudiés mais reposent

probablement sur une machinerie protéique similaire (Park et al., 2003; Tomes et al., 2002).

Transport membranaire

La formation de l'hétéro-dimère GBR1/GBR2 est essentielle au transport à la surface de GBR1 (Kaupmann et al., 1998a; White et al., 1998) (Fig 28). L'une des interfaces de liaison entre les deux récepteurs réside au niveau d'une région contenue dans les portions c-terminales cytosoliques de chacun d'entre eux caractérisée par la répétition de motifs heptapeptidiques $\phi XX\phi XXX$, où ϕ correspond à un aa aliphatique. L'interaction de ces deux régions cytosoliques aboutit à la formation d'une structure superhéliçoïdale de type *coiled coil*, parallèle (Kammerer et al., 1999) (Fig 29). La localisation du motif minimum de rétention endoplasmique RXRR de GBR1 (Margeta-Mitrovic et al., 2000) immédiatement en aval de sa région *coiled coil* a initialement placé la formation de cette structure au centre de la régulation du transport membranaire de GBR1. Dans ce modèle, la liaison des récepteurs GBR1 et GBR2 à l'issue de leur synthèse dans le réticulum endoplasmique conduirait à la formation de la structure superhéliçoïdale qui permettrait le masquage du motif RXRR présent chez le GBR1. Un tel mécanisme assurerait ainsi le seul transport à la membrane de récepteurs hétérodimériques actifs en terme de signalisation (Margeta-Mitrovic et al., 2000).

Il a récemment été proposé que la formation du *coiled coil* entre GBR1 et GBR2 ne serait pas strictement nécessaire au masquage du motif RXRR (Gassmann et al., 2005; Grunewald et al., 2002; Pagano et al., 2001). En revanche, la rigidification des c-terminaux de chacun des récepteurs à l'issue de la formation de la structure superhéliçoïdale pourrait néanmoins positionner le motif RXRR à une distance de la membrane (Gassmann et al., 2005) inhibant le recrutement de l'hétérodimère par les protéines du complexe COPI, responsables du transport rétrograde entre le golgi et le ER.

Récemment, un motif di-leucine LL contenu au début de la région *coiled coil* de GBR1 a également été impliquée dans la régulation du transport d'un récepteur mutant de GBR1, délété de sa séquence RXRR, vers la surface membranaire de neurones d'hippocampe de rat (Restituito et al., 2005). En liant GBR1 à ce niveau, la protéine msec7, une protéine GEF des protéines ARF présentant une activité plus élevée envers ARF1/3 et 6 (Ashery et al., 1999; Jackson and Casanova, 2000)) constituerait un frein moléculaire au transport de GBR1 à la surface cellulaire.

Déterminants moléculaires de l'activation du récepteur

Le couplage du récepteur à la protéine Gi/o est donc essentiel à de nombreux aspects de sa physiologie. Les rôles joués par GBR1 et GBR2 dans ce phénomène sont néanmoins très différents. Cloné à travers ses propriétés de liaison (Kaupmann et al., 1997), GBR1 assure la liaison au GABA par l'intermédiaire de son domaine PBP (Galvez et al., 1999). Par comparaison, la région homologue de GBR2 est incapable de lier la molécule de GABA (Kaupmann et al., 1998a; White et al., 1998). Le domaine extracellulaire n-terminal de GBR2 reste cependant essentiel à la fonctionnalité de l'hétérodimère puisqu'un hétérodimère chimérique comportant deux domaines n-terminaux GBR1, présente une activité amoindrie et constitutive (Galvez et al., 2001; Margeta-Mitrovic et al., 2001a). En outre, GBR2 (plus précisément ses trois boucles intracellulaires i_1 , i_2 et i_3 ainsi que la région proximale membranaire de sa queue c-terminale) constitue la sous unité assurant le couplage à la protéine G (Margeta-Mitrovic et al., 2001b). L'ensemble de ces données supporte donc l'hypothèse d'une trans-activation allostérique des sous unités GBR1/GBR2. A l'issue de la liaison au GABA par le GBR1, son activation conduirait à l'adoption par GBR2 d'une conformation compatible avec la stimulation de la protéine G (Galvez et al., 2001; Margeta-Mitrovic et al., 2001a).

Modulation de l'activité et interactions protéiques

Les protéines kinases

Contrairement au récepteur $\beta 2AR$ et probablement en raison de son clonage récent, les mécanismes moléculaires de contrôle de l'activité du $GABA_B R$ sont peu documentés. De nombreuses observations physiologiques ont néanmoins dévoilé des indices révélant l'identité de certains de ces mécanismes de contrôle. A ce titre, **PKC** s'est rapidement révélé un modulateur puissant de l'activité pré- et post-synaptique du récepteur (Dutar and Nicoll, 1988a; Thompson and Gahwiler, 1992). Cette action de PKC généralement induite par un traitement d'esters de phorbol (le PMA par exemple) a depuis été confirmée à plusieurs reprises (Engisch et al., 1996; Qiu et al., 2003; Taniyama et al., 1993). En plus de son rôle dans la désensibilisation hétérologue du récepteur, PKC pourrait également avoir un rôle dans la désensibilisation homologue du $GABA_B R$. Au niveau de l'hippocampe de rat, la stimulation de l'hétérodimère stimule la translocation à la membrane de divers sous types de PKC (Tremblay et al., 1995). Chez le xénope ou les embryons de poulet, la voie de transduction menant à l'activation de PKC pourrait impliquer le couplage de l'hétérodimère à la PLC par l'intermédiaire du dimère $G\beta\gamma$ (Diverse-Pierluissi et al., 2000; Xiang et al., 2002b)). Chez les mammifères, le mécanisme moléculaire menant à la stimulation de PKC reste cependant à déterminer.

Autre kinase activée par des seconds messagers, **PKA** semble également impliquée dans la régulation de l'activité du $GABA_B R$. En phosphorylant la Ser892 de GBR2, PKA contribue à inhiber la diminution d'activité canaux GIRK lors d'une stimulation soutenue du récepteur (Couve et al., 2002). Cette inhibition de la désensibilisation fonctionnelle du récepteur s'accompagne en outre de la stabilisation de son expression à la surface (Fairfax et al., 2004).

De manière intéressante, le mGluR1, dont les effets sont potentialisés par le $GABA_B R$ dans des neurones de cervelet (Hirono et al., 2001), présente une dépendance similaire au $GABA_B R$ vis à vis de PKA (Mundell et al., 2004) et de PKC (Dale et al., 2002). Par ailleurs, dans le cervelet, chacun de ces deux récepteurs est régulé par la protéine **GRK4** (Virlon et al., 1998), essentielle à leur désensibilisation

respective. Les mécanismes moléculaires impliqués semblent néanmoins différents. Dans le cas du mGluR1, GRK4 phosphorylerait et désensibiliserait le récepteur (Sallese et al., 2000) de manière classique tandis que dans le cas du GABA_BR, l'atténuation du signal s'effectuerait par un mécanisme indépendant de la phosphorylation du récepteur (Perroy et al., 2003). Dans ces conditions, le domaine RGS de GRK4 serait suffisant à la désensibilisation (Perroy et al., 2003). L'interaction fonctionnelle entre le récepteur GABA_B et les GRK s'avère ainsi atypique puisqu'aucune d'entre elles ne semble pouvoir phosphoryler le récepteur en présence d'agoniste (Fairfax et al., 2004). De manière consistante avec cette idée, le recrutement de la β arr et l'internalisation du récepteur sont également indétectables (Perroy et al., 2003; Fairfax et al., 2004) à l'issue de son activation.

Outre sa régulation par des protéines serine/thréonine kinases classiquement impliquées dans la modulation de l'activité des GPCR, la signalisation associée au GABA_BR est également dépendante de l'activité de **tyrosines kinases de type src** (Diverse-Pierluissi et al., 1997). L'activation rapide de src en présence de baclofen conduit à la phosphorylation d'un Cav₂ de type N chez le poulet. Cet événement constituerait le signal de recrutement de la protéine RGS12 (par l'intermédiaire de son domaine PTB) dont l'activité GAP conduirait à inhiber l'action de la protéine G (Schiff et al., 2000). Le mécanisme de recrutement de src par le récepteur n'a pas été défini (Diverse-Pierluissi et al., 1997) mais semble échapper au mode classique d'activation de src par les GPCR, qu'il s'agisse de l'implication du dimère $\beta\gamma$ ou de la β arr (Luttrell and Luttrell, 2004). La présence de motifs riches en proline consensus (PXXP, PPXP ou encore PXXPR) dans la portion c-terminale de GBR1 et GBR2 laisse supposer qu'une interaction directe entre le GABA_BR et le domaine SH3 de src puisse s'établir comme c'est le cas pour le récepteur β 3-adrénergique (β 3AR; (Cao et al., 2000)). De manière intéressante, le motif consensus de GBR1 est situé immédiatement en aval de son motif RXRR et de l'interface superhélicoïdale de GBR1 et GBR2.

Les protéines interagissant avec la région *coiled coil*

Outre son importance dans la régulation du transport cellulaire de GBR1, le *coiled coil* pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité du GABA_BR. Chacune des sous unités de l'hétérodimère lie à ce niveau diverses protéines. GBR1 interagit avec CREB2/ATF4 (Vernon et al., 2001; White et al., 2000), Marlin1 (Couve et al., 2004) ou 14-3-3 (Couve et al., 2001). GBR2 y lie le facteur de transcription CHOP, la protéine à domaines PDZ MUPP1 et les filamines A et β (Calver et al., 2002). De manière intrigante, la liaison de CREB2 (Vernon et al., 2001; White et al., 2000), 14-3-3 ou Marlin 1 (Couve et al., 2001; Couve et al., 2004) à GBR1 semble exclusive et inhibée par la présence du GBR2 à l'état basal. Dans la mesure où l'activation de l'hétérodimère conduit à la relocalisation cellulaire du facteur de transcription CREB2 (Vernon et al., 2001; White et al., 2000), la régulation de l'interaction *coiled coil* entre GBR1 et GBR2 pourrait ainsi se révéler essentielle à la modulation de l'activité de signalisation du récepteur. L'existence d'un variant d'épissage de GBR1 (variant GBR1d; (Isomoto et al., 1998)) présentant une portion c-terminale délétée à partir du milieu de sa région *coiled coil*, renforce encore cette idée.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif général de ce travail consistait à étudier le rôle de divers mécanismes contrôlant la formation des complexes protéiques, dans la signalisation des GPCR. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à trois mécanismes particuliers, la compartimentation membranaire par l'intermédiaire des rafts, la modulation des interactions protéines-protéines par la AAA ATPase, NSF et enfin les modifications post-traductionnelles à travers l'ubiquitination.

1) **Étude du rôle de la compartimentation : le cas des rafts.** En prenant comme modèle d'étude la voie de signalisation impliquant le β 2AR, la protéine G α s et l'AC, nous nous sommes intéressés aux conséquences pharmacologiques et fonctionnelles de la compartimentation membranaire sur l'efficacité de transmission du signal.

2) **Étude du rôle de la protéine NSF, une AAA ATPase impliquée dans la régulation des complexes protéiques.** Initié par des expériences de double hybride ayant mis en évidence l'interaction de la protéine AAA ATPase, NSF, et du récepteur GABA_B, ce projet a consisté à caractériser d'une part l'interaction de NSF avec chacune des sous unités GBR1 et GBR2 et déterminer d'autre part, son rôle potentiel dans la régulation de la signalisation de l'hétéro-dimère.

3) **Étude du rôle de l'ubiquitination.** L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle dynamique, essentielle à la régulation de la signalisation. Dans le cas des GPCR, cette modification post-traductionnelle détermine, entre autres, le comportement d'un régulateur essentiel de leur activité, la β arrestine. La régulation dynamique différentielle de l'ubiquitination de cette protéine par le β 2AR ou le V2R suggère un lien étroit entre la spécificité des capacités de liaison de la β arrestine envers les récepteurs ou ses autres partenaires de signalisation et son ubiquitination. Afin de pouvoir suivre à la fois le phénomène d'ubiquitination mais aussi l'évolution

des interactions protéiques de la β arrestine en temps réel, nous avons développé une méthode de détection reposant sur la technologie du BRET. Afin d'en démontrer la faisabilité, nous avons revisité le modèle d'ubiquitination de la β arrestine et sa régulation différentielle par les récepteurs β_2 AR et V₂R.

RESULTATS

LA COMPARTIMENTATION MEMBRANAIRE

Le cas des rafts

INTRODUCTION

En janvier 1999, le concept de microdomaine membranaire et ses conséquences potentielles en terme de signalisation attire de plus en plus l'attention. La connaissance relative des propriétés de signalisation du β 2AR et la publication d'évidences expérimentales suggérant sa distribution dans des microdomaines membranaires de type raft (Dupree et al., 1993; Raposo et al., 1989; Schwencke et al., 1999) le désigne comme un modèle approprié pour étudier les conséquences pharmacologiques de son éventuelle distribution membranaires dans des structures rafts. Très rapidement, nos résultats suggèrent l'idée que la compartimentation dans les rafts limite probablement le couplage du β 2AR à son effecteur, l'AC. En effet, une déplétion en cholestérol augmente son efficacité maximale sans moduler son EC_{50} . Ces premiers résultats obtenus en système hétérologue et en accord avec des études préalables concernant l'effet du cholestérol sur la signalisation du β 2AR (Chang et al., 1994; Prieto et al., 1990; Scarpace et al., 1985), sont bientôt confirmés (Miura Y 2001 *Biochemistry*), notamment par deux études complémentaires menées sur des cardiomyocytes de rats néonataux (Ostrom et al., 2000; Rybin et al., 2000). Ils se heurtent néanmoins à un double paradoxe : 1) β 2AR et ses différents partenaires de signalisation (protéine G, AC, GRK...etc) co-sédimentent dans les fractions membranaires légères à l'issu d'une préparation de Song (Rybin et al., 2000) 2) en plus d'entraîner une élévation de l'efficacité maximale du β 2AR, la déplétion en cholestérol induit également une perte du site de haute affinité du récepteur en raison de son découplage vis à vis de la protéine G. L'ensemble de ces données nous ont ainsi amené à revisiter à l'aide de techniques alternatives le prédicat selon lequel le β 2AR était localisé dans des microdomaines membranaires comportant également ses partenaires de signalisation. L'analyse de ces résultats nous a finalement conduit à proposer un modèle réconciliant nombres d'observations qui échappaient à la notion d'une co-compartimentation du β 2AR et de ses partenaires de signalisation dans les rafts.

En illustrant les difficultés techniques liées à l'étude des microdomaines membranaires, cette étude souligne également l'importance des microdomaines dans la régulation de la signalisation cellulaire.

Participation des différents auteurs de la publication N°1 :

YP: Conceptualisation du projet, expériences, stratégie expérimentale, analyse des résultats et écriture du papier

SP : Conceptualisation du projet, expériences, stratégie expérimentale, analyse des résultats et participation à l'écriture

SG : Génération de lignées stables surexprimant le $\beta 2AR^{PKA-}$

AB: Discussion

MB : Conceptualisation du projet, analyse des résultats et écriture du papier

PUBLICATION N°1 (Soumission à Journal of Biological Chemistry)

CHOLESTEROL-DEPENDENT LATERAL SEPARATION BETWEEN β_2 -ADRENERGIC RECEPTOR AND ITS EFFECTORS, G α S AND ADENYLYL-CYCLASE V/VI; IMPACTS ON SIGNAL TRANSDUCTION EFFICACY AND RECEPTOR DESENSITISATION

Yann PERCHERANCIER* [§], Stéphanie PONTIER*, Segolène Galandrin, Andreas BREIT and Michel BOUVIER[‡] ^{§§}

Department of Biochemistry, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada. Tel: 514-343-6372; Fax: 514-343-2210

*Both authors contribute equally to this work.

§ Held a financial support from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France) and a post-doctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research.

§§ MB holds of the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

‡To whom correspondence may be addressed: michel.bouvier@umontreal.ca

Running title: Cholesterol mediated separation between β_2 AR and its effectors.

Summary

Contribution of cholesterol and lipid raft microdomains to β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) mediated signal transduction was assessed in HEK293S cells. Detailed analysis of the sub-membraneous distribution of the β_2 AR signaling machinery revealed that the receptor is largely excluded from raft whereas both *Gas* and the V/VI-type adenylyl cyclase (AC) are preferentially found in these cholesterol rich domains. Cholesterol depletion in cells expressing the human β_2 AR enhanced both basal and agonist-stimulated cAMP production that reflected an increased signaling efficacy towards the AC activation pathway. This effect was found to be completely reversible following cholesterol repletion. Membrane fractionation and bioluminescence resonance energy transfer experiments revealed that the cholesterol depletion led to an increased probability of productive interactions between the receptor and its signaling partner that underlies the increased signaling efficacy. This enhanced cAMP production was accompanied by a protein kinase A (PKA)-dependant loss in the GTP-sensitive β_2 AR high affinity binding state resulting from the constitutive phosphorylation and desensitization of the receptor in the cholesterol-depleted state. Collectively, our results support a model whereby β_2 AR signal transduction efficacy is control, in part, by the differential lateral distribution of β_2 AR and its effectors, *Gas* and AC V/VI, in the plane of the plasma membrane. Cholesterol-dependent regulation of the lateral separation between the receptor and its signaling partners could therefore represent an important mechanism controlling β_2 AR signaling efficacy under various developmental and patho-physiological conditions.

Introduction

Studies carried out in the last decade clearly demonstrate that biological membranes can no longer be considered according to the fluid mosaic model of Singer and Nicolson where membrane proteins were believed to diffuse randomly in a lipid bilayer¹. It is now well established that membrane microdomains with specific biophysical properties impose specific spatial organizations to protein and lipid molecules within the plane of cellular membranes²⁻⁵. In this context, microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids known as lipid raft have attracted considerable attention⁶. They result from the tight packing of cholesterol with lipids harboring long and saturated acyl chains within the outer leaflet of membrane leading to the formation of a liquid-ordered phase that can dynamically segregate from the rest of the membrane^{6,7}.

This discovery that membranes are compartmentalized challenges the classical paradigms of signal transduction. In contrast with the long held view that signaling partners interact as a result of free diffusion over long distances, the compartmentalization hypothesis led to the notion that concentration or separation of proteins through microdomains formation could influence signaling efficacy by controlling interactions probabilities^{8,9}.

Among other signaling proteins, G protein-coupled receptors (GPCR) have been proposed to partition differentially in cholesterol rich microdomains and such relative distributions proposed to influence their functional properties (reviewed in¹⁰). For example, distinct distribution of the β_1 - and β_2 - adrenergic receptors (AR) in caveolae (a subset of lipid raft) has been proposed to explain the different coupling efficacy of the two receptor subtypes to the G α_s / adenylyl cyclase signaling pathway¹¹. It was proposed that the predominant co-distribution of β_2 AR with G α_s and AC V/VI within cholesterol rich domain is a key determinant of their coupling efficacy¹¹⁻¹³. However, such a model whereby β AR signaling machinery confinement inside cholesterol rich microdomains favors signal transduction can not be easily reconciled with the negative role that cholesterol seems to play on β AR associated effectors.

Indeed, cholesterol depletion was found to increase β AR-stimulated cAMP production^{11;14} whereas cholesterol supplementation had the inverse effect¹⁵⁻¹⁷. In an effort to resolve this apparent paradox and to further our understanding of how cholesterol and/or cholesterol rich domains may influence β_2 AR signaling efficacy, we concomitantly assessed the role of cholesterol on the lateral distribution of β_2 AR signaling components and on their coupling properties.

Experimental procedures

Constructs- cDNA of Flag- β_2 AR_{wt} was kindly provided by Dr. Stefano Marullo (Cochin Institute, Paris). It was created by amplification of β_2 AR_{wt} with the following primers (forward primer containing the FLAG sequence: 5'-TTGGTTAAGCTTATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGATCCGGAATCTAGATGGGCAACCCGGGAACGGC-3'; reverse primer: 5'-TTTTTAGATTATAGCAGTGAGTCATTTG-3') and cloning of the PCR product into the pcDNA3.1 vector. cDNA of HA- β_2 AR_{wt} was described in ¹⁸. cDNA of β_2 AR_{PKA} was described in ¹⁹ and sub-cloned into pcDNA3.1 following HindIII/EcoRI digestion. PcDNA₃- β_2 AR-Luc was described in ²⁰. Plasmid encoding the HA-Caveolin-3 (Cav-3) and adenylyl Cyclase V-YFP constructs are kind gifts from Dr Parton RG (University of Queensland Medical School, Australia) and Dr Zvi Voegel (weizmann Institut, Israël) respectively.

Cells and transfection- Human embryonic kidney 293S cells (HEK293S) ²¹ stably expressing Flag- β_2 AR_{WT}, HA- β_2 AR_{WT} or β_2 AR_{PKA} were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine and 250 μ g/ml geneticin (all from Wisent, St Bruno CA). When needed transient transfections were performed using FuGENE-6 Transfection reagent (Roche Diagnostics, Co) following the supplier's recommendation procedure. Twenty-four hours after transfection, supplemented DMEM was renewed and cells cultured for an additional 24 h.

Cholesterol depletion and complementation- In Cholesterol extraction experiment, HEK293S cells were rinsed once with phosphate-buffered saline and incubated for one hour with (cholesterol depleted condition) or without (Mock condition) 5mM Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD, Sigma) or 2% 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (w/v)(2-HPC, Sigma) in DMEM medium supplemented with 1% FBS. Depletion step was carried out at 37°C with agitation each 5 min. To restore the

cholesterol content of cholesterol depleted cells or to increase basal cholesterol content, cholesterol-methyl- β -cyclodextrin inclusion complexes were prepared strictly as described in ²² and added on HEK293S cells for 1h at 37°C. Cholesterol content in HEK293S cells membrane preparation was measured using Amplex Red™ Cholesterol assay kit (Molecular probe, Inc).

Membrane Preparation- Cells were washed in PBS, resuspended in lysis buffer containing 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA along with protease inhibitors (5 μ g/ml leupeptine, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, and 10 μ g/ml benzamidine) and homogenized with a polytron homogenizer (Ultra-Turrax; Janke and Kunkel, Staufen, Germany) for 15 s. Homogenates were centrifuged at 500g for 5 min at 4°C, and the resulting supernatant fraction was centrifuged at 25.000g for 20 min at 4°C. Membrane pellets were then washed twice in the same buffer and centrifuged under the same conditions. The resulting membrane pellets were finally resuspended in a buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, and protease inhibitors. The membranes were immediately used for adenylyl cyclase activity and radioligand binding assay. Protein content in membrane preparation was estimated with the Bradford protein assay ²³ (Biorad).

Radioligand Binding Assay- Radioligand binding assays were performed essentially as described previously ²⁴. Briefly, membrane proteins were incubated in a total volume of 0.5 ml in a buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, protease inhibitors and varying concentrations of β_2 AR ligands depending on the type of experiment performed. For competition experiments, [¹²⁵I]-Cyanopindolol (CYP) was used at a concentration of 25 pM and competed by increasing concentrations of isoproterenol whereas for saturation experiments increasing concentrations of [¹²⁵I]-CYP from 2 to 400 pM were used. Binding reactions were incubated at room temperature for 90 min and terminated by rapid filtration through glass fiber (GF/C) filters (Whatman, Maidstone, UK) using ice-cold 25 mM Tris-HCl, pH 7.4. In some experiments, the binding reaction was carried out in the presence or absence of 250 μ M GppNHp in the binding assay.

Adenylyl Cyclase Activity- Adenylyl cyclase activity was assessed according to the method of Salomon et al, 1975²⁵. Membrane proteins were incubated in the absence or presence of increasing concentrations of isoproterenol, 0.5mM GppNHP or 100mM MnCl₂ along with 0.1 mM cAMP, 53 μM GTP, 2.7 mM phosphoenolpyruvate, 0.1 mM isobutylmethylxanthine, 1 unit of myokinase, 0.2 unit of pyruvate kinase and 0.12 mM ATP [10⁶ cpm [α -³²P]-ATP/assay] (NEN Mandel) in a total volume of 50 μl. The samples were incubated at 37°C for 20 min and the reaction was stopped by addition of 1 ml of a cold stop-solution containing 0.4 mM ATP, 0.3 mM cAMP, and [³H]cAMP (50,000 cpm). cAMP was isolated by sequential chromatography using a Dowex gel column followed by filtration on aluminium oxide column.

Biochemical preparation of raft/caveolae enriched fractions- Detergent-free purification of Raft/Caveolae-rich membrane fraction was carried out according to the protocol described by Song et al (1996)²⁶. Briefly, 40 millions HEK293S were scraped into 1ml of 500mM sodium carbonate, pH 11 after two washed in cold PBS. Cell extracts were homogenized sequentially using a loose-fitting dounce homogenizer (10 strokes), a polytron tissue grinder (three 10-sec bursts at 24000 min⁻¹) and a sonicator (Three 20-sec bursts, Branson Sonifier 250; Branson Ultrasonics Co). The homogenate was then adjusted to 40% sucrose by the addition of 1 ml of 80% sucrose prepared in MBS (25mM MES, pH 6.5, 0.15M NaCl) and placed at the bottom of an ultra-Clear centrifuge tube (Beckman Instrument, Inc). A 5-35% discontinuous sucrose gradient was performed above (6.5ml of 35% sucrose / 3.5ml of 5% sucrose; both in MBS containing 250mM sodium carbonate).

Detergent-resistant membranes (DRMs) were obtained by sucrose flotation after solubilization of HEK293S total membrane with cold 1% or 0.1% Triton X-100 (Tx-100). Briefly, total membranes from 40 millions HEK293S cells were prepared as described above. Following their preparation, membranes were lysed in ice-cold TKM buffer (50mM Tris pH 7.4; 25mM KCl; 5mM MgCl₂; 1mM EGTA) containing 1% or 0.1% Tx-100 (v/v)(Sigma Chemical, Co). Cell lysate were loaded on a sucrose

step gradient as described for the detergent-free method except that the sucrose solutions were prepared in TKM instead of MBS.

Gradient prepared with both method were centrifuged at 200.000 X g for 16-20 h in an SW41 rotor (Beckman L70 ultracentrifuge). Eleven 1ml Fractions were collected from the top of the gradient. Protein content of each fraction was measured using Nano-OrangeTM protein quantification kit (Molecular Probes, Inc).

Antibodies and Immunoblotting- Equal volumes of each gradient fraction (except for fractions 1-2 and 6-7 which were pulled together) were resolved on SDS-PAGE under reducing conditions and transferred on PVDF immobilon-membranes (except for CD46 which one was detected from a separated gel run in non-reducing condition). For Immunodetection, the following antibodies were used: anti-CD46 (1/2000, clone J4-48) is from Immunotech, anti- β_2 AR (1/5000; clone H-20), anti-Cyclase V/VI (1/500, Clone C-17), anti-Cav-3 (1/2000) were purchased from Santa Cruz Biotechnology; anti-Flotillin-1 (1/2000) and anti-Clathrin heavy chain (1/2000) were purchased from Transduction laboratories; anti-Transferin Receptor (TrfR, 1/2000) is from Zymed; Anti-Gas antibody (1/10 000) is a gift from Dr Jean-Luc Guillaume (Institut Cochin, Paris, France). β_2 AR anti-phosphoserine-specific antibody (2G3)²⁷ is a gift from Richard B. Clark (University of Texas, Houston, Texas) and was used at 0,5 μ g/ml. Immobilized antigen-antibody complexes were detected with affinity purified secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-species antibodies (Amersham Biosciences) and developed using the Chemiluminescence reagent plus (Perkin Elmer Life Sciences, Inc). GM1 gangliosides were detected by dot-blot using peroxidase-coupled cholera-toxin subunit B (CTx)(1/10 000; Sigma Chemical, Co).

Confocal Microscopy- In order to detect if β_2 AR distributes with lipid-raft by confocal microscopy, HEK293S cells stably expressing HA- β_2 AR were treated with CTx to induce the aggregation of GM1 molecules as described in ²⁸. Some cells were transfected with Cav-3 as a positive control of GM1 co-distribution. 24 hours prior to experiment, cells were seeded onto glass cover slips pre-treated with poly-D-lysine

(Sigma Chemical, Co). The day of the experiment, Alexa Fluor 488 conjugated CTx (10 µg/ml; Molecular probe, Inc) was applied to the cells for 30 min at 4°C and removed by one wash in PBS containing 0,2% bovine serum albumin (Blocking buffer). Goat Anti-CTx antibody (1/50 dilution, calbiochem) was then applied to the cells for 30 min at 4°C and then for 15 min at 37°C. After three washes in cold-PBS containing 0.5% BSA (w/v), cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min on ice. Following several washes, monoclonal anti-HA (clone 12G5, 1/500), anti-Cav-3 (1/50) and anti-CD46 (1/50) specific antibodies were applied for 1 h. Since Cav-3 epitope used for staining is intracellular, prior to antibody incubation, cells used for Cav-3 detection were permeabilised following cell fixation with blocking buffer containing 0.15% Tx-100. Cells were then washed twice in blocking buffer and incubated for 1h with the appropriate Alexa-Fluor 594-conjugated secondary antibody (1/500 dilution, Molecular Probe, Inc). Coverslips were mounted using Mowiol (Hoechst). Confocal laser scanning microscopic analysis was performed on a Leica TCS SP1 confocal microscope and co-localisation was performed by overlay of the images using the Leica Confocal Software LCS (Heidelberg, Germany). Excitation and emission filters for the different labeled dyes were as follows: YFP (green): $\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=540/25$ nm; Texas red (red): $\lambda_{ex}=568$ nm, $\lambda_{em}=610/30$ nm.

BRET assay- 48 hours before BRET assay, HEK293S cells were seeded in 6-wells plate at a density of 500 000 cells by well. 24h later, each well was transfected with 30ng pcDNA₃-β₂AR-Luc alone or with 1µg Adenylyl Cyclase V-YFP using FuGENE-6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Co). The total amount of DNA transfected in each condition was kept stable using pcDNA3.1 empty vector (Invitrogen). Following overnight incubation, transfection medium was replaced with fresh Dulbecco's modified Eagle's medium for three hours to allow cell recovery. Transfected cells were then seeded in polylysine pre-treated 96 wells white plate with opaque bottom and left in culture for an additional 24h before being processed for BRET assay. Following cholesterol depletion or successive cholesterol-depletion and cholesterol complementation, cells were washed once with PBS. Coelenterazine H (Nanolight technology) was added to a final concentration of 5 µM in PBS, and

readings were collected using a multi-detector plate reader MITRAS LB940 (Berthold) allowing the sequential integration of the signals detected in the 480 ± 20 nm and 530 ± 20 nm windows for donor and acceptor luminescence emission respectively. BRET signal was determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by the Receptor-YFP over the light intensity emitted by the Receptor- *Rluc*. The values were corrected by subtracting the background BRET signal detected when the Receptor-*Rluc* constructs was expressed alone.

Results

Membrane cholesterol depletion negatively regulates β_2 AR coupling to G-protein. To determine the effect of cellular cholesterol content on β_2 AR ligand binding properties, competitions of the radio-iodinated antagonist cyanopindolol ($[^{125}\text{I}]\text{CYP}$) binding by the agonist isoproterenol were performed on membranes derived from HEK293S cells stably expressing β_2 AR (HEK293S- β_2 AR), pre-treated or not with the cholesterol depleting agent (Methyl- β -cyclodextrin (MBCD) or (w/v) 2-hydroxy-propyl-cyclodextrin (2-HPC)). Treatment with either cyclodextrin derivatives lead to equivalent depletion of membrane cholesterol reducing the cholesterol/protein ratio from 38 ± 2.3 to 17.3 ± 1.4 ng cholesterol/ μg proteins without affecting cell viability (data not shown). The treatment with cyclodextrin had no effect on either the binding affinity or the B_{max} of the antagonist $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$ (table 1) but led to a rightward shift of the biphasic binding competition curve by isoproterenol (Fig.1A). Analysis of the curve revealed that the cholesterol depletion induced a significant decrease in the apparent affinity of the receptor high-affinity agonist binding state (Log IC_{50} for isoproterenol increased from -9.49 ± 0.29 to -7.80 ± 0.26 ; Table 2). This effect was reversible since cholesterol re-loading of the membranes using cholesterol-MBCD complexes, that brought back the cholesterol/protein ratio to 51.7 ± 11.1 ng/ μg proteins, almost completely restored the high affinity binding state to its control value (Fig.1 and Table 2).

A loss in high affinity agonist binding is classically attributed to a reduction in the coupling of the receptor to its cognate G-protein ²⁹. To determine if the loss in agonist binding affinity promoted by the cyclodextrin resulted from such uncoupling or from a decreased intrinsic affinity of the receptor for isoproterenol, the effect of the cholesterol depletion was assessed following direct receptor uncoupling using the non hydrolysable GTP analogue GppNHp. As shown in Fig.1B and Table 2, cyclodextrin did not further decrease the affinity of the β_2 AR for isoproterenol in the presence of GppNHp indicating that cholesterol depletion affected β_2 AR ligand binding properties by promoting the uncoupling of the receptor from its G-protein.

Membrane cholesterol depletion favored basal and stimulated cAMP production. Given the apparent effect of cholesterol depletion on the receptor-G protein coupling, we next examined the consequences of the cyclodextrin treatment on the receptor-stimulated activity of the effector adenylyl cyclase. As shown in Fig.2A, cyclodextrin treatment induced an increase in both basal and maximal isoproterenol-stimulated cAMP production without affecting the potency of the agonist.

To further determine the site within the signaling cascade that is sensitized by the cholesterol depletion, the responses to direct activators of the G protein (GppNHp) and the adenylyl cyclase (MnCl_2) were investigated. As shown in Fig.2B and C, cyclodextrin treatment significantly potentiated the maximal GppNHp-stimulated cAMP production whereas it was without effect on the MnCl_2 -promoted response. These results indicate that cholesterol controls $\beta_2\text{AR}$ signaling efficacy through a modulatory action involving the receptor-G protein and/or the G-protein/adenylyl cyclase interactions but not the intrinsic activity of the adenylyl cyclase itself. The increase in the receptor-stimulated cAMP production following cyclodextrin treatment may appear surprising when considering that cholesterol depletion led to an apparent uncoupling of the receptor from the G protein as indicated by the loss in agonist high affinity binding described above. The most likely explanation for this apparent paradox is that the increased in cAMP production, resulting from the cholesterol depletion, lead to the desensitization of the receptor-G protein interaction. Consistent with this notion, PKA-dependant phosphorylation of the $\beta_2\text{AR}$ is known to promote receptor uncoupling and its subsequent desensitization 19;30;31

To directly test whether the cAMP dependant phosphorylation of the $\beta_2\text{AR}$ by PKA could underlie the cyclodextrin-promoted receptor/G-protein uncoupling, the effects of cholesterol depletion were assessed using a $\beta_2\text{AR}$ mutant lacking its two PKA phosphorylation sites, the $\beta_2\text{AR}$ -S261A, S262A, S345A, S346A ($\beta_2\text{AR}_{\text{PKA-}}$) (Hausdorff and Bouvier). In contrast to the cyclodextrin-promoted decrease in the high affinity binding state of the $\beta_2\text{AR}_{\text{WT}}$, cholesterol depletion did not affect the

agonist binding profile of the $\beta_2\text{AR}_{\text{PKA-}}$ (Fig.3A) consistent with a role for the PKA-mediated phosphorylation in the uncoupling phenotype. This is further supported by the observation that the cyclodextrin treatment led to a $\beta_2\text{AR}_{\text{WT}}$ receptor phosphorylation that could be detected by an anti-phosphoserine antibody that is specific for one of the PKA sites²⁷. No such phosphorylation was observed for the $\beta_2\text{AR}_{\text{PKA-}}$ confirming that the cholesterol depletion led to a selective cAMP promoted phosphorylation of the receptor.

As expected for a PKA desensitized receptor, the potentiating effect of the cholesterol depletion was found to be greater in cells expressing the $\beta_2\text{AR}_{\text{PKA-}}$ than in those expressing an identical number of $\beta_2\text{AR}_{\text{WT}}$ (Fig.2C). This greater cAMP response was receptor-specific since identical cyclodextrin-promoted increase in the GppNHp-stimulated cAMP production was observed in $\beta_2\text{AR}_{\text{PKA-}}$ and $\beta_2\text{AR}_{\text{WT}}$ expressing cells (Fig.2D).

Altogether, these results are consistent with a model whereby cholesterol depletion increases $\beta_2\text{AR}$ signaling efficacy downstream of the receptor and results in a higher cAMP production. This elevation of cAMP concentration promotes in turns the phosphorylation and uncoupling of the receptor leading to its partial desensitization. Although these results provide a reasonable explanation for the decrease in high affinity agonist binding state in face of an increased signaling efficacy, they do not provide a mechanistic explanation for the increase in basal, receptor-stimulated or GppNHp-stimulated cAMP production promoted by the cholesterol depletion.

$\beta_2\text{AR}$, Gas and Adenylyl Cyclase V/VI sub-membrane organization in HEK293S. Several studies have suggested that partition of signaling molecules within specialized lipid microdomains of the plasma membrane such as raft may play important roles in controlling signal transduction efficacy. Since cholesterol plays a central role in lipid raft formation, we investigated the potential role of the relative distribution of the $\beta_2\text{AR}$ signaling components within these specific microdomains.

Using the sodium carbonate detergent free technique ²⁶, many GPCRs, including the β_2 AR, were found to be concentrated in caveolin enriched fractions thought to correspond to raft content (reviewd in ¹⁰). Following preparation of HEK293S- β_2 AR cells using this protocol, $2.4\pm 0.2\%$ of the total protein content was recovered in the low-density fractions enriched in the raft markers such as flotillin-1 and GM1 whereas, in agreement with previous studies ^{11;26}, the bulk of the proteins was present in the higher density fractions. Each fraction was then probed by Western blot analysis for the expression of the β_2 AR, G α_s , and the adenylyl cyclase V and VI (endogenously expressed in HEK293 cells and considered as the preferred effectors of β AR in cardiomyocytes) as well as for the following markers clathrin, transferin receptor (TrfR), CD46, flotillin-1 and GM1. As can be seen in Fig.4 (left panel), most of the β_2 AR and AC V/VI as well as a significant part of G α_s were found in the low-density fractions 3 to 5 where the ganglioside and integral protein raft markers GM1 and flotillin-1 were also found. As a control of exclusion from raft and according to previous study ¹¹, clathrin was entirely recovered in the high-density fractions (fractions 8-11) of the gradient. However, CD46 and TrfR, which are both transmembrane proteins that have been extensively described as being excluded from rafts microdomains by different biochemical and biophysical techniques ^{28;32-34} were unexpectedly found in the low-density fractions (fractions 3-5). These results cast doubt on the interpretation of the localization of β_2 AR, AC and G α_s studied by the detergent-free method for raft/caveolae preparation.

One of the characteristics of rafts being their resistance to non ionic detergent solubilization at 4°C ³⁵, we sedimented the low density membranes isolated from the sodium carbonate method and submitted them to a second sucrose gradient following their solubilization with cold 1% Tx-100 (Fig.4 right panel). Following this additional step, lipid and protein components of raft domains obtained by the sodium carbonate method should still be resistant to Tx-100 solubilization and recovered as detergent resistant membranes (DRMs) floating in low-density fractions. As expected, Flotillin-1 and GM1 remained concentrated inside low-density fractions (fractions 3-5) of the second sucrose gradient whereas detergent treatment excluded CD46 and TrfR from

DRMs. Interestingly, in contrast to *Gαs* and AC V/VI, which remained in the low-density fractions 3 to 5, the β_2 AR was almost completely shifted outside of the DRMs fractions (into fractions 8-11) by the detergent treatment.

Several studies suggest that, rafts microdomains may be composed of lipids with acyl chains displaying different order levels that would correlate with their detergent resistance properties^{36;37}. If β_2 AR partition in raft region of lesser detergent resistance, their raft localization could be missed due to the use of too stringent conditions. To verify this possibility, we compared β_2 AR, AC V/VI and *Gαs* distribution in sucrose gradient following membrane solubilization with 1% and 0.1% Tx-100 (Fig.5A). Lowering detergent concentration increased the proportion of *Gαs* and Cyclase V/VI recovered in the DRM fractions while the distribution of the β_2 AR remained identical to that observed using 1% Tx-100. These data confirm the extremely weak propensity of this receptor to distribute in detergent resistant membranes. However, the possibility that β_2 AR molecules might be present at the edge of rafts and could be solubilized, even in presence of reduced amount of detergent cannot be completely ruled-out by our biochemical approach³⁸. We thus assessed the distribution of the receptor following GM1-cholera toxin (CTx)-induced patching of the rafts²⁸. Confocal fluorescence microscopy revealed that whereas anti-CTx antibody promoted the co-patching of the CTx-labelled GM1 and Caveolin-3, neither the β_2 AR nor raft-excluded marker CD46 significantly co-localized with the GM1 patches.

Altogether, these experiments strongly suggest that β_2 AR on the one hand and *Gαs* and AC V/VI on the other distribute in membrane regions of different physico-chemicals properties in HEK293S-cells. This results in a lateral separation of the bulk of *Gαs* and AC V/VI away from the β_2 AR that would be expected to impact on the dynamic interaction between the receptor and its signaling machinery.

Cholesterol depletion leads to enhanced co-distribution and interaction between β_2 AR, *Gαs* and AC V/VI in detergent soluble part of the membrane.

Since rafts microdomains are stabilized by cholesterol ⁶, cyclodextrin treatment should perturb the lateral distribution of the β_2 AR signaling components. To test this hypothesis, the effect of cholesterol depletion was tested on the distribution of the β_2 AR, G α s and AC V/VI along a sucrose gradient following solubilization with 1% Tx-100. As expected, cyclodextrin treatment led to the release of raft-embedded AC V/VI, G α s and GM1 into the high-density fractions of the sucrose where the β_2 AR distributes (Fig.6A). These results are consistent with the notion that cyclodextrin enhances β_2 AR signaling efficacy by increasing the likelihood of productive interaction among the signaling partners as a result of a greater availability of the down-stream effectors molecules in the receptor containing membrane compartment. To directly test this possibility, we took advantage of the ability of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) to monitor collisions between energy donor and acceptors expressed in the same compartments ^{20;39}. To this end, β_2 AR and Cyclase V were fused at their C-terminal tail to the energy donor *Renilla* luciferase (*Rluc*) and energy acceptor Yellow fluorescent proteins (YFP) respectively and co-expressed in HEK293 cells. If cholesterol depletion increases the chances of collision between the receptor and the effectors molecules, one would expect an increase in the BRET signal observed between β_2 AR-*Rluc* and AC V-YFP ²⁰ at equivalent YFP/*Rluc* ratio. Consistent with this prediction, cyclodextrin treatment promoted a significant (n=5, p<0.001) increase in the BRET values (Fig.6B). Cholesterol reloading after cholesterol depletion significantly (n=3, p<0.01) decreased the BRET ratio toward its control value. The influence of cholesterol depletion and repletion on the BRET values did not result from a non-specific effect of the treatments on the BRET phenomenon since cyclodextrin was without effect on the BRET observed between β_2 AR-*Rluc* and β_2 AR-YFP (Fig.6C).

Discussion

Overall, the results reported in the present study clearly indicate that cholesterol-dependent lateral separation between β_2 AR and its signaling effectors, G α s and adenylyl cyclase V/VI, in distinct membrane micro-environment plays a crucial role in controlling receptor signaling efficacy.

When considering the lateral distribution of GPCRs and their signaling effectors in raft and non-raft membrane microdomains, special attention must be given to the criteria used to methodologically identify their components. Significant differences in the conceptual and methodological paradigms used probably underlie the divergent conclusions reached in the present study and those previously addressing the β_2 AR distribution in raft and caveolae. Using sodium-carbonate detergent-free method²⁶ to isolate caveolin enriched fractions, several investigators have suggested that β_2 AR, AC V/VI and G α s are co-enriched in the same microdomains that could serve as an assembly site for functionally active receptor-signaling complexes^{11-13;40}. However, caveolin or raft-enriched fractions prepared in this manner are not equivalent to detergent resistant membrane fractions⁴¹⁻⁴⁴. Our data are entirely consistent with this notion and demonstrate that radically distinct conclusions can be reached depending on the methodology used. Indeed, whereas we found β_2 AR, G α s and AC V/VI to co-distribute in the cholesterol- and caveolin-enriched fractions prepared by the detergent free-method, further separation following triton-extraction revealed distinct distribution patterns between the receptor and its effectors; the β_2 AR being excluded from the DRMs fractions and the AC V/VI and G α s co-distributing in both DRM and soluble fractions.

Although DRM have often been assimilated to cholesterol-rich domains known as rafts, the exclusion from DRM is not, on its own, a sufficient criterion to prove exclusion from rafts. Indeed, DRM exclusion may also indicate that β_2 AR is extracted from rafts by the detergent^{38;44}. However, failure to recover any β_2 AR in DRMs prepared with a lower concentration of detergent (0.1% Tx-100; fig. 5A) along with the confocal microscopy analysis showing that β_2 AR does not co-localize with

GM1 patches, while ectopic Cav-3 does (fig. 5B), strongly support the postulate that β_2 AR is excluded from rafts microdomains in HEK293S cells.

The partition of a significant proportion of G α s and AC V/VI in DRM could therefore be interpreted as an indication that part of the signaling machinery is sequestered in a micro-environment distinct from the one harboring the receptor. The observation that decreasing Tx-100 concentration from 1.0 to 0.1% increases G α s and AC V/VI recovery in DRMs is consistent with a distribution of these molecules within a graded ordered raft organisation suggested by several authors^{36,37,45}.

These considerations therefore suggest that, as a result of their sequestration in a membrane compartment of bio-chemical properties corresponding to the one predicted for raft microdomains, a proportion of G α s and AC V/VI are laterally separated from β_2 AR. Consistent with this conclusion, cholesterol depletion known to promote raft disruption induced the egress of G α s and AC V/VI from DRMs to soluble fractions whereas cholesterol complementation led to their return in DRMs. In contrast, these treatments did not affect the distribution of the β_2 AR. Even the addition of cholesterol excess using cyclodextrin as a forward cholesterol carrier, failed to promote the association of β_2 AR with DRMs whereas it increased the amount of G α s and AC V/VI within these fractions (data not shown) once more confirming a cholesterol-dependant differential distribution between the β_2 AR and its effectors.

The redistribution of the bulk of G α s and AC V/VI within β_2 AR containing membrane-part was accompanied by a significant increase in the β_2 AR signaling efficacy reflected by elevations in both basal and isoproterenol-stimulated AC activity. This is consistent with the notion that lateral separation of receptors and effectors in distinct pools of the cell membrane may impact on the constitutive and agonist-promoted signal-transduction efficiency (reviewed in⁸). For example, Gross and Lohse described a restricted collision-coupling model where catalytic interaction between receptors and effectors are hindered by the slow diffusion of receptors and effectors, limiting effectors activation to a small area around an agonist-occupied

receptor⁴⁶. In the present study, releasing of raft embedded AC V/VI and G α s in the vicinity of β_2 AR following cholesterol depletion most likely increase availability of the effectors to which the receptor can have access thus augmenting the probability of efficient coupling between these partners. The increase in collisional BRET observed between β_2 AR-Luc and AC V/VI-YFP following cholesterol depletion is consistent with such a lateral separation model.

In agreement with previous studies^{14;15;17}, we observed that cholesterol depletion increased the efficacy but not the potency of the receptor-stimulated AC activity. Such behavior has been predicted to occur following increase availability of G-protein when considering either Receptor/G-protein or G-protein/AC collisional precoupled models^{47;48}. An increase in basal and β AR-stimulated cAMP production efficacy with no effect on the potency has also been reported following overexpression of AC V or VI in mice and rats cardiac cells⁴⁹⁻⁵¹. Therefore, increase in the available pools of AC V/VI and/or G α s for the β_2 AR is most likely responsible for the observed increase in basal and isoproterenol-stimulated cAMP production following cholesterol depletion-mediated rafts disruption.

Despite the fact that G α s and AC V/VI are found in both DRMs and soluble fractions, the observation that cholesterol depletion increase the AC activity promoted by direct activation of G α s with GppNHp is consistent with the lateral separation model proposed above. Indeed, the increase probability of productive interactions between β_2 AR and G α s promoted by the cyclodextrin treatment would be predicted to favor the spontaneous receptor-stimulated release of GDP by G α s thus yielding a larger number of G α s molecules available for GppNHp activation. A direct effect of cholesterol on the GTPase activity of G α s⁵² cannot be invoked to explain the potentiated GppNHp-stimulated response since the nucleotide analogue used is not subject to enzymatic hydrolysis.

An intriguing and apparently paradoxical observation of the present study is that the increase in β_2 AR signaling efficacy promoted by cholesterol depletion is accompanied by a reduction of the high affinity state of the receptor for its agonist isoproterenol. Indeed, loss of the high affinity state for agonists is classically viewed

as an index of receptor-G protein uncoupling that should lead to a reduced and not an increased signaling efficacy. However, increased signaling activity and receptor desensitization are phenomenon that are intrinsically linked to one another; the latter often resulting from the former. In fact, our data indicates that the loss of high affinity agonist binding is the consequence of the elevated signaling efficacy leading to PKA-dependent receptor desensitization. This hypothesis is supported by the observation that the cyclodextrin treatment led to an increase PKA-dependent phosphorylation of the β_2 AR and that mutation of all PKA phosphorylation consensus sites (β_2 AR_{PKA-}) completely blocked the loss of agonist high affinity binding sites (Fig.3). The occurrence of a partial desensitization of the receptor-stimulated AC activity following cholesterol depletion is further supported by the greater cyclodextrin-promoted increase in AC activity observed in cells expressing the desensitization resistant β_2 AR_{PKA-} (Fig.3.C). This indicates that the increased signaling efficacy observed for β_2 AR_{wt} is blunted by the constitutive desensitization process.

In the case of the μ -opioid, oxytocin, and galanin receptors, cholesterol was found to affect the high affinity agonist binding irrespective of the G-protein coupling state. This observation contrasts with the loss of cholesterol depletion effect on the β_2 AR high affinity binding observed in the present study following GppNHp treatment thus indicating that distinct cholesterol dependant-mechanisms exist that can be involved in GPCR regulation. The complete loss of cholesterol depletion effect on the high affinity state binding of the β_2 AR_{PKA-} clearly distinguishes the effect observed in the present study from the previously reported direct allosteric effects of cholesterol on GPCR conformation⁵³⁻⁵⁸.

When considering native tissues or cell lines endogenously expressing β AR, several studies addressing the role of cholesterol on receptor signaling found, in agreement with our results, that cholesterol had an inhibitory influence on receptor-stimulated cAMP production. Indeed depletion of cholesterol was found to potentiate agonist-stimulated AC activity in rat salivary epithelial A5 cells¹⁴ and rat neonatal cardiomyocytes¹¹ whereas cholesterol supplementation was reported to inhibit receptor signaling in Rat prostate epithelial primary cells¹⁷ and in rat lung

membranes¹⁵. In one study, however, cholesterol depletion was found to have the inverse effect on β AR-stimulated AC leading to a reduced maximal isoproterenol-stimulated cAMP production in rat neonatal cardiomyocytes⁵⁹. The reason for this difference remains unknown but could involve a difference in the extent of the PKA-promoted desensitization that could blunt the increased signaling efficacy promoted by the disruption of the raft.

Collectively, our results support a model whereby β 2AR signal transduction efficacy as well as receptor desensitization are affected by the lateral distribution of β 2AR and its effectors, G α s and AC, in the plane of the cell membrane. The lateral separation between the β 2AR, which is excluded from the rafts, and its effectors (AC V/VI and G α s), which are mainly sequestered inside these microdomains, restricts the interactions between receptor and effectors thus blunting signaling efficacy. Following cholesterol depletion and rafts disruption, the release of raft embedded effectors increases the probability of their productive interaction with the receptor leading to an increase basal and agonist-stimulated cAMP production. This potentiated signaling activity in turn leads to a constitutive PKA-dependant desensitization of the receptor that attenuates the increased signaling efficacy. Whether such signaling efficacy control through lateral separation of the signaling partners can be dynamically regulated under patho-physiological or developmental conditions affecting membrane composition remains to be investigated.

Reference List

1. Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) *Science* **175**, 720-731
2. Jacobson, K., Sheets, E. D., and Simson, R. (1995) *Science* **268**, 1441-1442
3. Tocanne, J. F., Cezanne, L., Lopez, A., Piknova, B., Schram, V., Tournier, J. F., and Welby, M. (1994) *Chem.Phys.Lipids* **73**, 139-158
4. Edidin, M. and Stroynowski, I. (1991) *J.Cell Biol.* **112**, 1143-1150
5. Edidin, M., Kuo, S. C., and Sheetz, M. P. (1991) *Science* **254**, 1379-1382
6. Harder, T. and Simons, K. (1997) *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 534-542
7. Brown, D. A. and London, E. (1998) *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **14**, 111-136
8. Neubig, R. R. (1994) *FASEB J.* **8**, 939-946
9. Ostrom, R. S., Post, S. R., and Insel, P. A. (2000) *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **294**, 407-412
10. Chini, B. and Parenti, M. (2004) *J.Mol.Endocrinol.* **32**, 325-338
11. Rybin, V. O., Xu, X., Lisanti, M. P., and Steinberg, S. F. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 41447-41457
12. Ostrom, R. S., Gregorian, C., Drenan, R. M., Xiang, Y., Regan, J. W., and Insel, P. A. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 42063-42069
13. Xiang, Y., Rybin, V. O., Steinberg, S. F., and Kobilka, B. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 34280-34286
14. Miura, Y., Hanada, K., and Jones, T. L. (2001) *Biochemistry* **40**, 15418-15423
15. Scarpace, P. J., O'Connor, S. W., and Abrass, I. B. (1985) *Biochim.Biophys.Acta* **845**, 520-525
16. O'Connor, S. W., Scarpace, P. J., and Abrass, I. B. (1984) *Biochim.Biophys.Acta* **778**, 497-502
17. Prieto, J. C., Hueso, C., and Carmena, M. J. (1990) *Gen.Pharmacol.* **21**, 931-933
18. Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L. R., Zhu, W. Z., Xiao, R. P., Lakatta, E. G., Bouvier, M., and Hebert, T. E. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 35402-35410

19. Bouvier, M., Guilbault, N., and Bonin, H. (1991) *FEBS Lett.* **279**, 243-248
20. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 44925-44931
21. Reeves, P. J., Thurmond, R. L., and Khorana, H. G. (1996) *Oncogene* **93**, 11487-11492
22. Percherancier, Y., Lagane, B., Planchenault, T., Staropoli, I., Altmeyer, R., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Hoessli, D. C., and Bachelerie, F. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 3153-3161
23. Bradford, M. M. (1976) *Anal.Biochem.* **72**, 248-254
24. Chidiac, P., Nouet, S., and Bouvier, M. (1996) *Mol.Pharmacol.* **49**, in press
25. Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M. (1974) *Anal.Biochem.* **58**, 541-548
26. Song, S. K., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, and Lisanti, M. P. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 9690-9697
27. Tran, T. M., Friedman, J., Qunaibi, E., Baameur, F., Moore, R. H., and Clark, R. B. (2004) *Mol.Pharmacol.* **65**, 196-206
28. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998) *J.Cell Biol.* **141**, 929-942
29. De Lean, A., Stadel, J. M., and Lefkowitz, R. J. (1980) *J.Biol.Chem.* **255**, 7108-7117
30. Hausdorff, W. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) *FASEB J.* **4**, 2881-2889
31. Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1988) *Nature* **333**, 370-373
32. Nichols, B. J. (2003) *Curr.Biol.* **13**, 686-690
33. Smart, E. J., Ying, Y. S., Mineo, C., and Anderson, R. G. (1995) *Oncogene* **92**, 10104-10108
34. Vidalain, P. O., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Roubardin-Combe, C., Gerlier, D., and Manie, S. (2000) *EMBO J.* **19**, 3304-3313
35. Brown, D. A. and Rose, J. K. (1992) *CELL* **68**, 533-544
36. McCabe, J. B. and Berthiaume, L. G. (2001) *Mol.Biol.Cell* **12**, 3601-3617

37. Madore, N., Smith, K. L., Graham, C. H., Jen, A., Brady, K., Hall, S., and Morris, R. (1999) *EMBO J.* **18**, 6917-6926
38. Shogomori, H. and Brown, D. A. (2003) *Biol.Chem.* **384**, 1259-1263
39. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002) *Science* 2002.May.3;296.(5569.):913.-6. **296**, 913-916
40. Schwencke, C., Okumura, S., Yamamoto, M., Geng, Y. J., and Ishikawa, Y. (1999) *J.Cell Biochem.* **75**, 64-72
41. Eckert, G. P., Igbavboa, U., Muller, W. E., and Wood, W. G. (2003) *Brain Res.* **962**, 144-150
42. Foster, L. J., De Hoog, C. L., and Mann, M. (2003) *Oncogene* **100**, 5813-5818
43. Waugh, M. G., Lawson, D., and Hsuan, J. J. (1999) *Biochem.J.* **337 (Pt 3)**, 591-597
44. Hooper, N. M. (1999) *Mol.Membr.Biol.* **16**, 145-156
45. Ilangumaran, S. and Hoessli, D. C. (1998) *Biochem.J.* **335 (Pt 2)**, 433-440
46. Gross, W. and Lohse, M. J. (1991) *Mol.Pharmacol.* **39**, 524-530
47. Krumins, A. M. and Barber, R. (1997) *Biochem.Pharmacol.* **54**, 61-72
48. Kukkonen, J. P., Nasman, J., and Akerman, K. E. (2001) *Trends Pharmacol.Sci.* **22**, 616-622
49. Ostrom, R. S., Violin, J. D., Coleman, S., and Insel, P. A. (2000) *Mol.Pharmacol.* **57**, 1075-1079
50. Gao, M., Ping, P., Post, S., Insel, P. A., Tang, R., and Hammond, H. K. (1998) *Oncogene* **95**, 1038-1043
51. Tepe, N. M., Lorenz, J. N., Yatani, A., Dash, R., Kranias, E. G., Dorn, G. W., and Liggett, S. B. (1999) *Biochemistry* **38**, 16706-16713
52. Ropero, S., Chiloeches, A., Montes, A., and Toro-Nozal, M. J. (2003) *Cell Signal.* **15**, 131-138
53. Lagane, B., Gaibelet, G., Meilhoc, E., Masson, J. M., Cezanne, L., and Lopez, A. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 33197-33200
54. Gimpl, G., Burger, K., and Fahrenholz, F. (1997) *Biochemistry* **36**, 10959-10974
55. Klein, U., Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (1995) *Biochemistry* **34**, 13784-13793

56. Eroglu, C., Brugger, B., Wieland, F., and Sinning, I. (2003) *Oncogene* **100**, 10219-10224
57. Pang, L., Graziano, M., and Wang, S. (1999) *Biochemistry* **38**, 12003-12011
58. Harikumar, K. G., Puri, V., Singh, R. D., Hanada, K., Pagano, R. E., and Miller, L. J. (2005) *J.Biol.Chem.*2005.Jan.21;280.(3):2176.-85.Epub.2004.Nov.10. **280**, 2176-2185
59. Ostrom, R. S., Bunday, R. A., and Insel, P. A. (2004) *J.Biol.Chem.*2004.May.7.;279.(19.):19846.-53.Epub.2004.Mar.8. **279**, 19846-19853

Acknowledgment

Authors are grateful to Stephano Marullo, Roger G. Parton and Zvi Voegel for providing Flag- β_2 AR_{WT}, Caveolin-3 and Adenylyl-Cyclase V-YFP expression vectors respectively. We are also thankful to Graciela Pineyro for her insightful discussions and to Monique Lagacé for her comments about the manuscript.

Abbreviations

AR : Adrenergic Receptor, AC : Adenylyl Cyclase, CTx: cholera-toxin, CYP: Cyanopindolol, MBCD: Methyl- β -cyclodextrin, 2-HPC: 2-hydroxy-propyl-cyclodextrin, PKA: Protein-kinase A, Tx-100 : Triton X-100, GM1 : monosialoganglioside-1, DRM: detergent-resistant membrane, TrfR: Transferin Receptor

Figure legends

Fig.1. Effects of cholesterol depletion on β_2 AR high-affinity binding state and coupling to G protein. HEK293S cells stably expressing β_2 AR ($6.58 \text{ pMol.mg}^{-1}$) (A and B) were treated (depletion, \square) or not (control, \blacksquare) with 2-HPC for 1 hour at 37°C to promote cholesterol depletion or successively cholesterol depleted for 1 hour with 2-HPC and cholesterol re-loaded in presence of MBCD-cholesterol complex (Complementation, \blacksquare). Total cellular membranes were then prepared and processed for Isoproterenol competition of ^{125}I -CYP binding. In B), binding competition experiments were performed in the presence of an excess of GppNHp. The data shown the mean \pm SEM of 2-9 independent experiments for A and 3 independent experiments for B. The binding parameters of these experiments are compiled in table 2. Equivalent results were found when MBCD was used instead of 2-HPC as the cholesterol depleting agent.

Fig.2. Effects of cholesterol depletion on basal, isoproterenol-, GppNHp- and MnCl₂-stimulated adenylyl cyclase activity. HEK293S cells stably expressing β_2 AR ($6,58 \text{ pMol.mg}^{-1}$) (A and B) were treated (depletion, \square) or not (control, \blacksquare) with 2-HPC for 1 hour at 37°C to promote cholesterol depletion or successively cholesterol depleted for 1 hour with 2-HPC and cholesterol re-loaded in presence of MBCD-cholesterol complex (Complementation, \blacksquare). Total cellular membranes were then prepared and the cAMP production was measured either in the presence of various concentrations of Isoproterenol (A), 0.5mM GppNHp (B) or 100mM MnCl₂ (C). The data shown represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. Equivalent results were found when MBCD was used instead of 2-HPC as the cholesterol depleting agent.

Fig.3. Cholesterol depletion induces β_2 AR phosphorylation which, in turn, is responsible for loss of high affinity binding state. A, HEK293S cells stably expressing 1 to 3 pMol.mg^{-1} of either $\beta_2\text{AR}_{\text{wt}}$ (left panel, square) or $\beta_2\text{AR}_{\text{pKA}}$ - (right

panel, circle) were treated (empty symbols) or not (black symbols) with MBCD for 1 hour at 37°C to promote cholesterol depletion. Total membranes were prepared and used for Isoproterenol competition of ^{125}I -CYP binding competition binding assay as in Fig.1. Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. B, Non transfected HEK293S cells as well as HEK293S cells stably expressing 1 to 3 pMol.mg $^{-1}$ of either $\beta_2\text{AR}_{\text{wt}}$ or $\beta_2\text{AR}_{\text{pKA-}}$ were treated (“D”) or not (“C”) with MBCD. Total membranes were solubilized and the phosphorylation state of the receptor was assessed by western-blot analysis on 5 μg of proteins using an antibody directed against p262- $\beta_2\text{AR}$. Upper panel: immunoblot using the anti-p262- $\beta_2\text{AR}$ antibody. Lower panel: immunoblot using the anti- $\beta_2\text{AR}$ antibody. The western blot shown is representative of 5 independent experiments C, HEK293S cells stably expressing the same amount (700 pMol.mg $^{-1}$) of either $\beta_2\text{AR}_{\text{wt}}$ (square) or $\beta_2\text{AR}_{\text{pKA-}}$ (circle) were cholesterol depleted (empty symbols) or not (black symbols) with MBCD for 1 hour at 37°C. Total membranes were prepared and cAMP production assessed in the presence of various concentration of Isoproterenol. D, cAMP production in response to 0.5mM GppNHp was measured as in C. The data shown in C and D represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments carried out in triplicates

Fig.4. Successive preparation of low-density membrane by detergent-free and detergent-based methods. HEK293S cells stably expressing 1 pmol/mg of $\beta_2\text{AR}$ were lysed in sodium carbonate followed by sub-cellular fractionation using a 5-35-40% discontinuous sucrose gradient as described under “experimental procedures” (left panel). Membranes purified in fractions 3, 4 and 5 were sedimented by ultracentrifugation and solubilized in cold 1% Tx-100 (v/v) before being fractionated on an additional 5-35-40% discontinuous sucrose gradient (right panel). 60 μl of each fraction were analyzed for the presence of $\beta_2\text{AR}$, Gas, AC V/VI, Clathrin heavy chain, TrfR, CD46, Flotillin-1 and GM1 using the appropriate antibodies.

Fig.5. Analysis of $\beta_2\text{AR}$ sub-membraneous localization by detergent extraction and confocal microscopy. A, Membranes derived from HEK293S cells

stably expressing 1 pmol/mg of the β_2 AR were solubilized in 1% and 0.1% Tx-100 and fractionated using a 5-35-40% discontinuous sucrose-gradient. Equal volume fractions were collected and analyzed for the presence of β_2 AR, Gas, AC V/VI, CD46, Flotillin-1 and GM1 using the appropriate antibodies. B, Aggregation of GM1 clusters was initiated as described in material and methods by successive incubation of cells with Alexa fluor 488-labeled CTx and anti-CTx antibody. β_2 AR, Caveolin-3 and CD46 staining after GM1 clustering were detected by confocal fluorescence microscopy. For caveolin-3 staining, since HEK293S- β_2 AR cells do not express this marker, cells were transiently transfected with caveolin-3 cDNA 48h before the experiments.

Fig.6. Effects of cholesterol depletion on AC V/VI and Gas sub-membraneous distribution and on BRET-detected interaction between β_2 AR and AC V. A, HEK293S stably expressing 1 pmol/mg of β_2 AR were subjected or not (Control) to cholesterol depletion using MBCD for 1 hour at 37°C and cholesterol reloaded in presence of MBCD-cholesterol complex (complementation). Following these treatments, HEK293S- β_2 AR membranes were solubilized with 1% Tx-100 and fractionated using a discontinuous 5-35-40% sucrose-gradient. Equal volume of fractions from each sucrose-gradient was analyzed for the presence of β_2 AR, Gas, AC V/VI and GM1 by western-blot using the appropriate antibodies. B and C, HEK293S cells transiently expressing β_2 AR-Luc and either AC V-YFP cDNA (B) or β_2 AR-YFP (C) were cholesterol-depleted and reloaded as described in (A). Immediately following treatments, cells were washed in PBS and the BRET was measured after Coelenterazine-h addition. The BRET ratio was defined as the luminescence signal emitted by the YFP (530 ± 20 nm) divided by the luminescence emitted by Rluc (480 ± 20 nm). Net BRET ratio was obtained by removing the BRET ratio obtained in cells expressing β_2 AR-Luc alone. Results represent the mean \pm SEM of 5 independent experiments. ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; n.s.: $p > 0.05$.

Fig.7. Model of β_2 AR signal transduction pathway regulation by. Upper panel: Cholesterol induces the formation of raft that trap most of AC V/VI and Gas

away from β_2 AR reducing signaling efficacy. Lower panel: Following cholesterol depletion, rafts are disrupted leading to the release of AC V/VI and *G α s* in the vicinity of β_2 AR, increasing the probability of productive interaction and thus the signaling efficacy and cAMP production. Elevated cAMP leads to a concomitant increase in the PKA-dependant phosphorylation of the β_2 AR which in turn provokes β_2 AR desensitization and functional uncoupling from *G α s*.

Table 1. Binding parameters of 1^{125} -cyanopindolol derived from saturation experiments carried out in HEK293 membranes expressing stably α_2 AR and treated with different cholesterol depleting agents.

Saturation experiments were analysed by non-linear regression using GraphPad-Prism program. B_{max} and K_d parameters were derived from the curve fitting. Values represent the means \pm standard error of four independent experiments performed in triplicates.

| Treatment | n | B_{max} (pmol/mg) | K_d (pM) | R^2 |
|-----------|---|---------------------|------------------|-------|
| Control | 4 | 6.58 ± 0.46 | 32.59 ± 6.59 | 0.89 |
| 2-HPC | 4 | 6.84 ± 1.55 | 26.90 ± 5.95 | 0.93 |

Table 2. Binding parameters of isoproterenol derived from competition experiments against 1^{125} -cyanopindolol carried out in HEK293 membranes stably expressing β_2 AR and treated with different cholesterol depleting agents. Binding experiments were performed in the presence or absence of 250 μ M of GppNHP.

Data have been analyzed using the curve-fitting software GraphPad-Prism by comparing the best fit values obtained using non-linear regression for one versus two competition binding sites. Values represent means \pm standard error of n independent experiments performed in triplicates.

| Treatment | n | Best Fit | p value | Fraction H/L | Log IC ₅₀ H | Log IC ₅₀ L | R ² |
|-----------------|---|----------|----------|----------------|------------------------|------------------------|----------------|
| Control | 9 | 2 | P<0.0001 | 19.2 \pm 2.7 | -9.49 \pm 0.29 | -6.72 \pm 0.08 | 0.90 |
| 2-HPC | 9 | 2 | P<0.0001 | 25.8 \pm 6.4 | -7.80 \pm 0.26 | -6.26 \pm 0.09 | 0.95 |
| Chol. Repletion | 2 | 2 | P<0.0001 | 17.2 \pm 3.1 | -9.35 \pm 0.33 | -6.38 \pm 0.07 | 0.94 |
| Vehicle+GppNHP | 3 | 1 | P>0.05 | - | - | -6.26 \pm 0.04 | 0.94 |
| 2-HPC+GppNHP | 3 | 1 | P>0.05 | - | - | -6.38 \pm 0.03 | 0.97 |

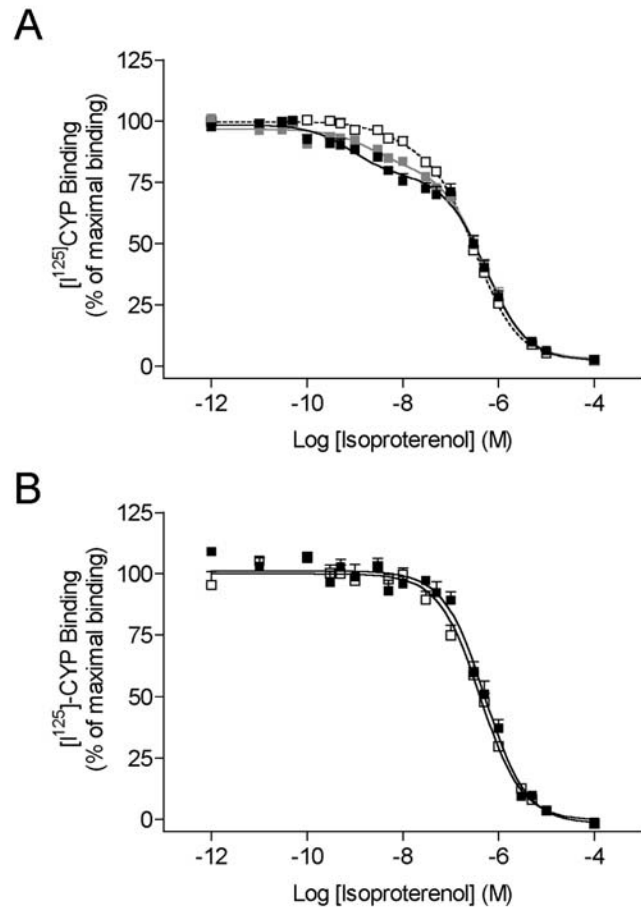


Fig.1

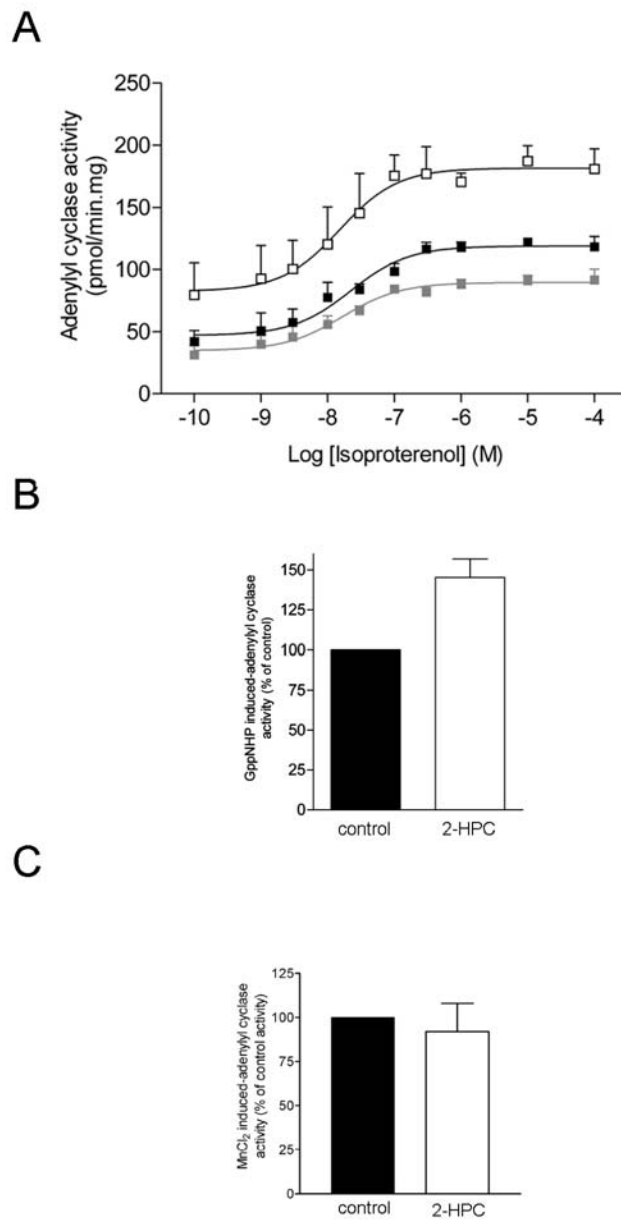
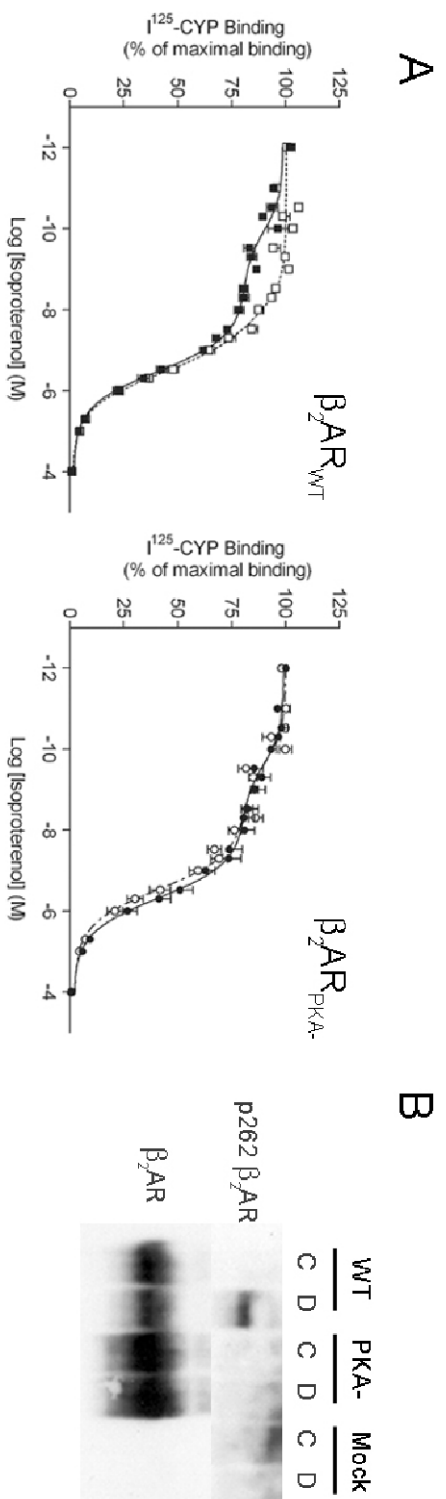
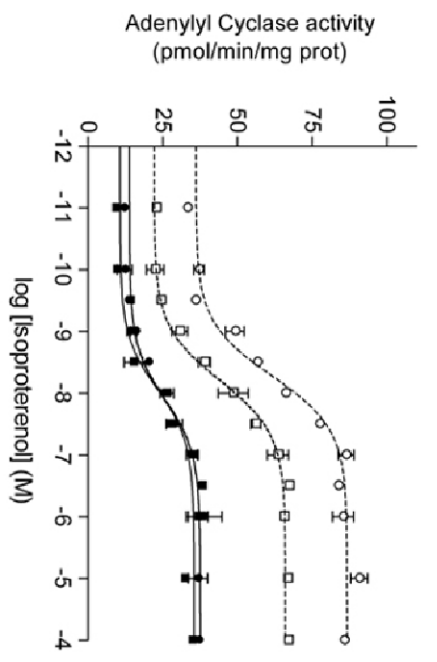


Fig.2



C



D

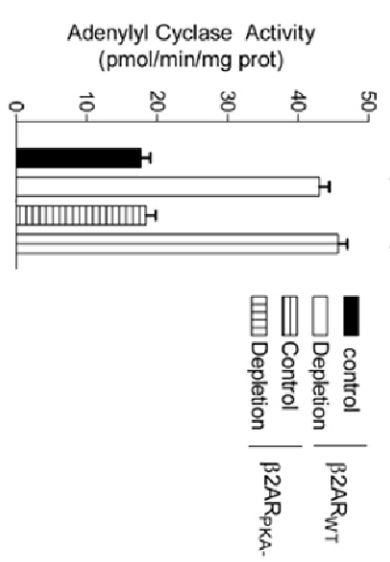


Fig.3

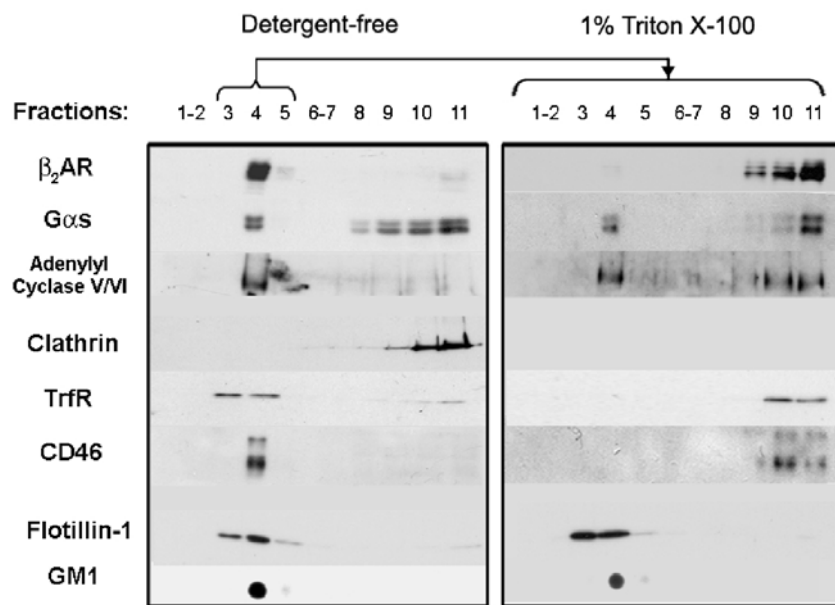
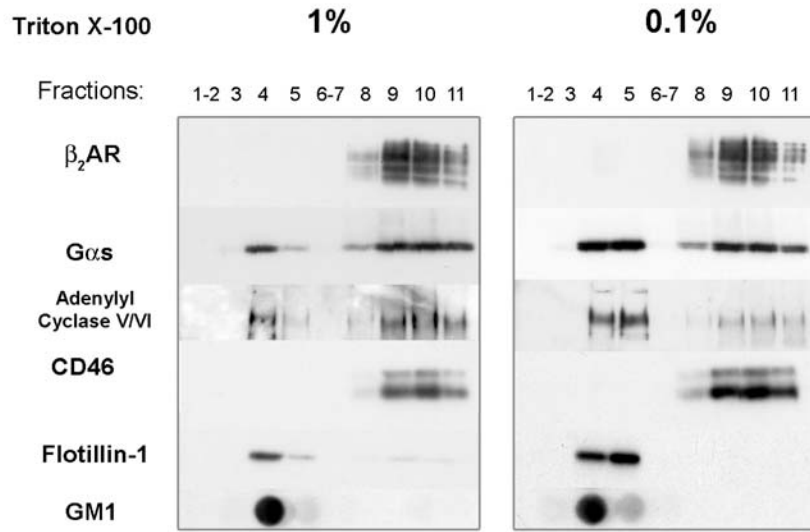


Fig. 4

A



B

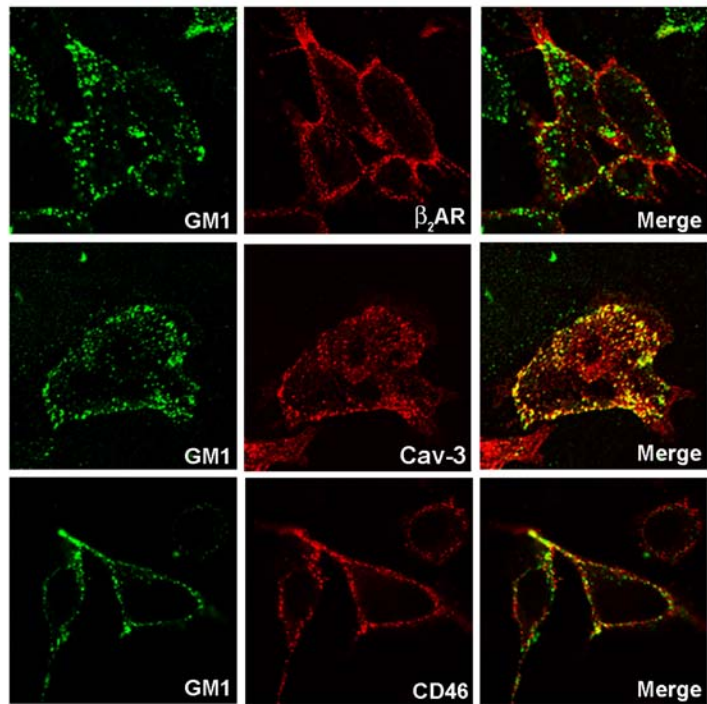


Fig.5

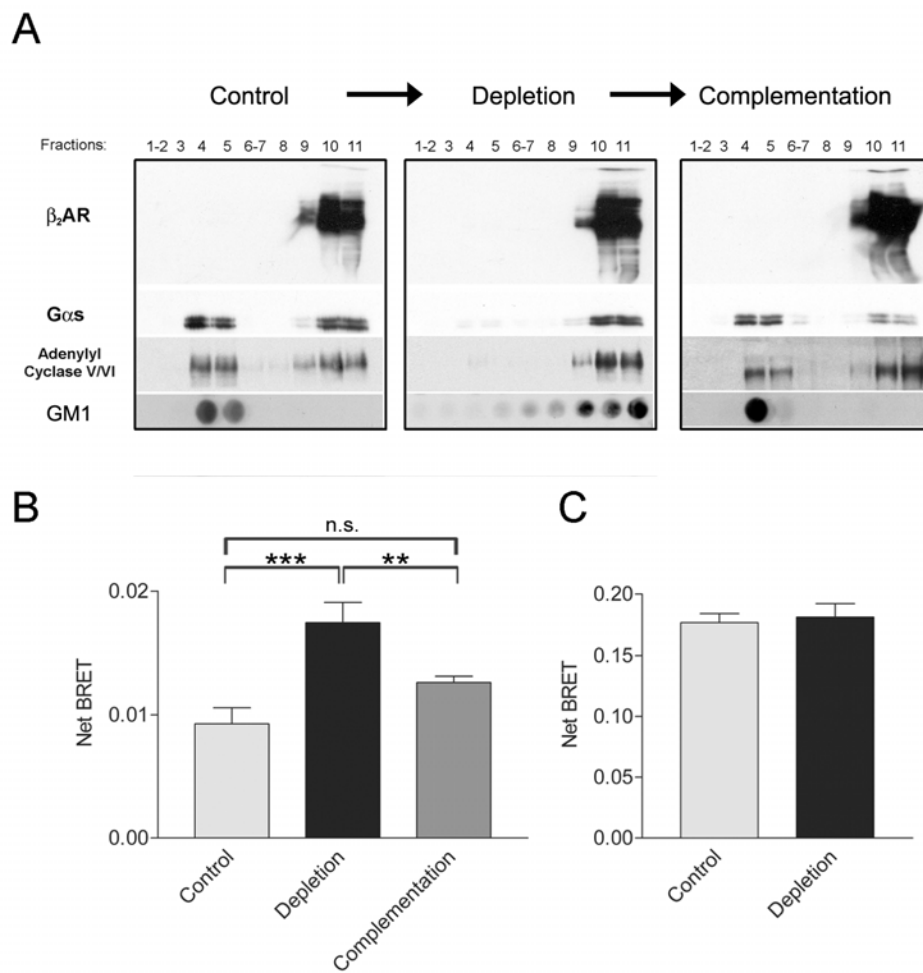


Fig. 6

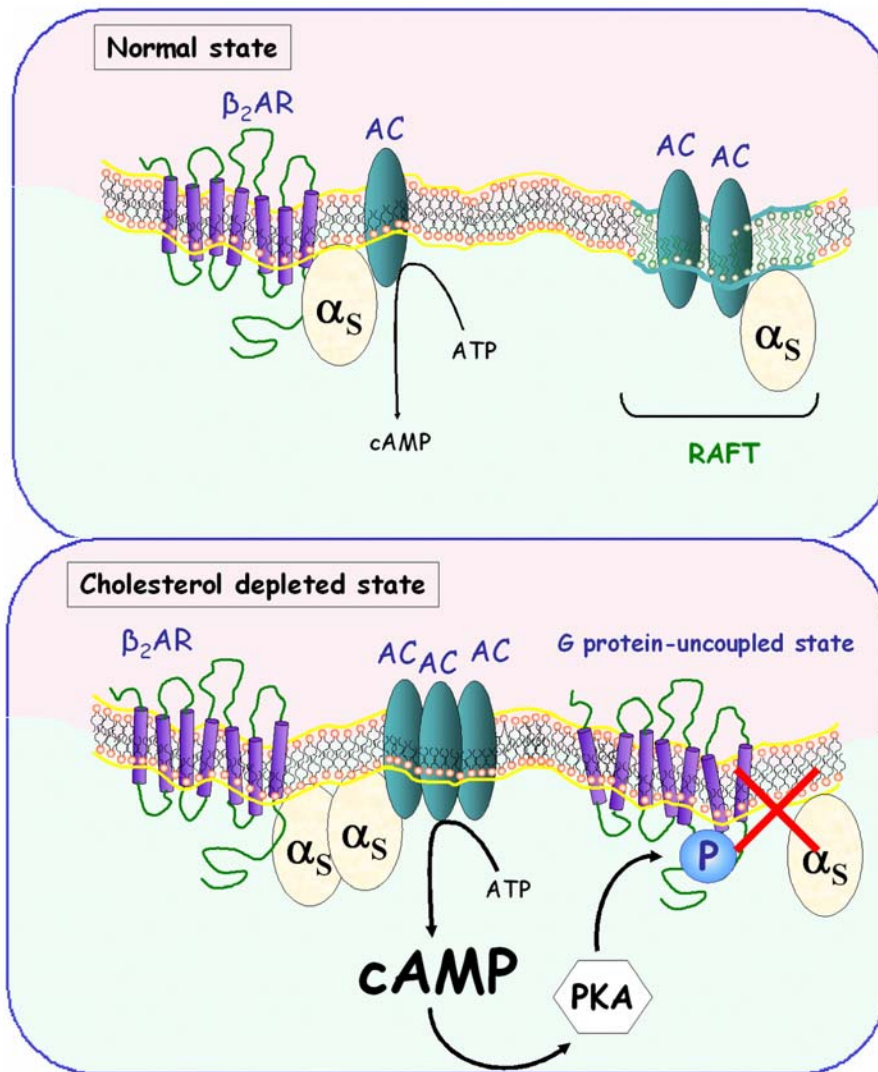


Fig. 7

LA PROTÉINE NSF

Une AAA ATPase impliquée dans la régulation des complexes protéiques

INTRODUCTION

En janvier 2001, l'ATPase NSF qui semblait dédiée à la seule modulation des SNARE pendant les événements de fusion membranaire, se voit impliquée dans la régulation de la fonction des récepteurs au glutamate et plus particulièrement du GluR2 (Nishimune et al., 1998; Noel et al., 1999; Osten et al., 1998; Osten and Ziff, 1999; Shi et al., 2001). En septembre de la même année, un récepteur supplémentaire est ajouté à la liste des substrats de cette chaperone des complexes protéiques, le récepteur β 2-adrénergique (Cong et al., 2001). Complétant des observations préalables identifiant NSF comme un partenaire de la β -arrestin 1 (McDonald et al., 1999), cette étude conduit à l'hypothèse d'un rôle pour NSF dans le recyclage du β 2AR à l'issue de sa désensibilisation et de son internalisation. Une fonction similaire de NSF a par la suite été observée dans le cas du récepteur GluR2 (Hanley et al., 2002; Lee et al., 2004b) et plus récemment dans le cas du récepteur CRLR (Bomberger et al., 2005b). En termes moléculaires, la fonction de NSF dans le cas du GluR2, semble résider dans son habileté à moduler l'interaction du récepteur et d'une protéine à domaine PDZ, PICK-1 (Hanley et al., 2002). Ce faisant, NSF favorise la stabilisation de l'expression à la surface de GluR2 avant (Noel et al., 1999; Shi et al., 2001) et à l'issue de son internalisation (Lee et al., 2004b).

La mise en évidence par le Dr Julia White lors d'expériences de double hybride, d'une interaction potentielle entre GABA_BR et la protéine NSF, suggérait donc que cette AAA ATPase puisse également réguler l'activité de ce récepteur. Différentes propriétés du récepteur GABA_B en fait en outre un modèle d'étude particulièrement intéressant : 1) tout d'abord son statut d'hétérodimère obligatoire, composé de deux récepteurs distincts, GBR1 et GBR2, interagissant au niveau d'une structure coiled coil cytosolique 2) sa capacité d'interaction avec un grand nombre de partenaires de signalisation impliqués dans des cascades de signalisation différentes correspondant aux effecteurs adénylyl cyclase, GIRK, Canaux calcique ou encore PLC (Calver et al., 2002; Couve et al., 2001; Vernon et al., 2001; White et al., 1998; White et al., 2000); 3) enfin, la mise en évidence de sa localisation préférentielle dans des microdomaines de type rafts (Becher et al., 2001). L'ensemble de ces

observations semblaient donc suggérer que l'interaction de NSF et du récepteur GABA_B puisse constituer un terrain d'étude adéquat pour étudier les effets fonctionnels de la modulation des interactions protéiques de ce récepteur par la protéine NSF. Les publications antérieures à ce projet semblaient indiquer que cette régulation puisse être impliquée dans les mécanismes de transport membranaire du récepteur GABA_B. Cette hypothèse a néanmoins rapidement perdu de son attrait en raison de la surprenante stabilité du récepteur à la membrane plasmique (Fairfax et al., 2004; Perroy et al., 2003).

Outre la confirmation et la caractérisation par des expériences de liaison in vitro et de co-immunoprécipitation de l'interaction de NSF et du récepteur GABA_B, notre étude s'est intéressée au rôle fonctionnel de la liaison de ces deux protéines. Les données expérimentales obtenues positionnent ainsi NSF, au sein d'un mécanisme moléculaire dépendant de la protéine kinase C et régulant l'efficacité de couplage du GABA_BR.

Participation des différents auteurs de la publication N°2 :

- SP: Conceptualisation du projet, expériences (Fig 2-9), stratégie expérimentale, analyse des résultats et écriture du papier
- NL : Expériences de phosphorylation (Fig 8C et D)
- HB : Expériences de coIP (Fig 3A, 4A, 6A)
- JW: Expérience de YTH (Fig 1)
- MB : Conceptualisation du projet, analyse des résultats et écriture du papier

PUBLICATION N°2 (en préparation pour EMBO Journal)

NSF BINDING TO GABA_B RECEPTOR REGULATES SIGNALING EFFICACY THROUGH CONCERTED ATPASE AND PKC ACTION

Stéphanie M. Pontier¹, Nicolas Lahaie¹, Hélène Bonin¹, Julia H White² and Michel Bouvier^{1,3}

¹Département de Biochimie and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.

²Pathway Discovery, Genomics and Proteomic Sciences, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Gunnels Wood Road, Stevenage, UK.

³To whom correspondence should be addressed: email: michel.bouvier@umontreal.ca

Running title: NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

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

Subject categories: Signal transduction

Character count: 60 546

Abstract

The obligatory heterodimerization mode of activation of the GABA_B receptor (GBR) raises fundamental questions about the molecular mechanisms controlling its signaling efficacy. Here, we show that the AAA ATPase, NSF, interacts directly with GBR and is released following agonist stimulation of the receptor. Inhibition of NSF binding using peptides derived from the NSF interacting domain of GBR2 or GluR2 did not affect basal signaling activity but almost completely abolished GBR desensitization. The agonist-promoted receptor phosphorylation and desensitization could also be blocked by PKC inhibition indicating a concerted action of the ATPase and PKC in regulating the signaling efficacy of GBR. Such model, is further supported by the observation that direct PKC activation led to NSF release from GBR and mimicked the agonist-promoted desensitization as revealed by the blunted baclofen-stimulated [³⁵S]GTPγS binding observed following PMA treatment. Given the classical function of NSF in the regulation of protein complex assembly and the lack of agonist-promoted internalization accompanying GBR desensitization, our results suggest the existence of a novel regulatory role of NSF in GPCR signaling.

Introduction

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

Among the mechanisms controlling 7TM receptor activity, agonist-promoted desensitization is one of the best characterized at the molecular level. As for most receptors, sustained stimulation of GBR can lead to functional desensitization (Couve et al. 2002;Gonzalez-Maeso et al. 2003;Perroy et al. 2003;Tosetti et al. 2004). However, β arrestin recruitment to the receptor and the ensuing endocytosis of the complex, which are classically associated to agonist-promoted desensitization, do not appear to contribute to the regulation of GBR responsiveness (Perroy et al. 2003;Fairfax et al. 2004). We recently reported that a phosphorylation-independent mechanism involving the G protein receptor kinase 4 (GRK4) can regulate GBR activity in the cerebellum (Perroy et al. 2003). However, the restricted expression pattern of GRK4, mainly found in testes and cerebellum (Sallese et al. 2000;Virlon et al. 1998), suggests that other mechanisms may modulate GBR signaling efficacy in other tissues. PKC activation has previously been shown to regulate GBR activity (Dutar and Nicoll 1988;Thompson and Gahwiler 1992)but its direct role in agonist-promoted desensitization has not been documented yet.

In an effort to identify new protein that could regulate receptor function, we performed a yeast two-hybrid screen using the GBR2 carboxyl tail as bait that

revealed the N-ethylmaleimide (NEM) sensitive fusion (NSF) protein as a potential interacting partner. NSF is an AAA ATPase classically devoted to the regulation of protein-protein interactions that support membrane fusion events (Whiteheart and Matveeva 2004). It promotes the dissociation of soluble NSF associated protein receptor (SNARE) complexes that control fusion specificity via appropriate coiled coil interactions; the NSF ATPase activity determining the uncoiling efficiency of the SNARE complexes. Such an uncoiling activity of NSF is of particular interest when considering its interaction with GBR since the receptor's carboxyl tails are engaged in a coiled-coil interaction within the GBR1/GBR2 heterodimer (Kammerer et al. 1999;White et al. 1998).

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

Results

NSF interacts directly with GBR subunits. A yeast two-hybrid screen (YTH) was performed with both GBR1 and GBR2 full length c-tails (^{860}I - ^{961}K and ^{741}I - ^{941}L respectively) against a human brain cDNA library. In addition to the complementary GBR subunit (White et al. 2002) and the transcription factor ATFx/CREB2 (White et al. 2000), we recovered NSF as a potential binding partner of GBR2 (Fig. 1). Using shorter segments of the carboxyl domain, the interaction region was narrowed down to the distal part of the GBR2 coiled-coil domain and more specifically to a 27 amino acid peptide encompassing residues 798-825 (Pep27). As previously observed for the interaction between GluR2 and NSF (Nishimune et al. 1998), the integrity of the full length AAA ATPase appeared essential for its association with the receptor c-tail. Indeed, none of the truncation mutants of NSF tested could bind to the receptor c-tail (data not shown).

To further characterize the interaction between NSF and the GBR2 c-tail, we carried out *in vitro* binding assays using the receptor c-tail fused to Glutathione-S-transferase (GST) and purified His₆-tagged NSF. GST pull-down performed with increasing amount of NSF in presence of non hydrolysable ATP γ S (to inhibit NSF ATPase activity) demonstrated a direct interaction between NSF and the full length GBR2 c-tail (Fig. 2A). The nucleotide dependence of the NSF binding was determined (Figure 2B) by evaluating the impact of ATP and ATP γ S under different salt conditions. Conditions favoring the ATPase activity of NSF (ATP and Mg²⁺) disrupted the association whereas its inhibition (ATP γ S and EDTA or ATP + Mg²⁺ and EDTA) favored the interaction with the GBR2 c-tail (Fig. 2A). Such influence of the nucleotide-bound state of NSF is reminiscent of other functionally relevant interactions involving NSF (Osten et al. 1998; Hanley et al. 2002; Muller et al. 2002; Sollner et al. 1993). Consistent with YTH data presented above, the Pep27 region of the coiled-coil domain of GBR2 was sufficient to sustain NSF binding as shown by the efficient pull-down of NSF by a GST-Pep27 fusion protein (Fig. 2C). Interestingly, the Pep27 was as efficient as a previously described 10 amino acid peptide corresponding to the NSF binding site on GluR2 (Pep2m) (Lee et al.

2002;Nishimune et al. 1998;Osten et al. 1998;Song et al. 1998). In contrast to the results obtained in the YTH experiments, however, the binding of NSF was not found to be restricted to the GBR2 c-tail, and the full length GBR1 c-tail (⁸⁵⁴I-⁹⁶¹K) fused to GST also bound selectively to NSF reaching binding levels comparable to those detected with the GBR2 c-tail (Fig. 2D).

To clarify whether the GBR1 could truly interact with NSF and to confirm that the interaction between GBR2 and endogenous NSF can occur in living cells, immunoprecipitations were performed in CHO cells. Immunoprecipitating the GBR1 or GBR2 from cell expressing each of the receptor individually led to the co-sedimentation of NSF (Fig. 3A-B). In the reverse configuration, immunoprecipitation of NSF (Fig. 3B) revealed that the ATPase was able to bind to two molecular species of GBR2. Deglycosylation treatments (Fig. 3C) defined the nature of carbohydrate modifications of each of these species. Taking advantage of the fact that the lower molecular weight species (~100kDa) is preferentially recognized by the by anti-HA antibodies, endoglycosidase H (EndoH) treatments were performed on this species following its immunoprecipitation. The sensitivity to the EndoH treatment indicated the presence of unprocessed high mannose oligosaccharides, characteristic of immature glycoproteins (Maley et al. 1989), suggesting that the ~100kDa species represent an ER-localized precursor form of the receptor. In contrast, the higher molecular weight specie (~120kDa) of GBR2, purified by streptavidin pull down after cell surface biotinylation, was found to be resistant to EndoH treatment but sensitive to PNGase F (an enzyme removing all kinds of N-linked oligosaccharides from glycoproteins; (Maley et al. 1989)) indicating that it corresponds to the fully processed glycosylated form of the receptor. NSF interaction with these two populations of receptor suggests that the ATPase binds to the GBR2 subunit at different steps of its trafficking pathways from the ER to the plasma membrane. In the case of GBR1, which cannot reach the cell surface and is retained in the ER when expressed alone (Couve et al. 1998), the co-immunoprecipitation with NSF implies that the interaction between these two molecules occurs in the ER.

Similarly to what was found in the GST-pull-down experiments, the functionality of the NSF ATPase was found to be essential for its interaction with

GBR2 in cells since the NSF alkylating agent, NEM, inhibited their co-immunoprecipitation (Fig. 3D). Comparable NEM sensitivity was also found for the GBR1/NSF co-immunoprecipitation (data not shown).

The active form of the GBR associates with NSF. To determine if, in addition to its ability to interact with each receptor subtype individually, NSF can also bind to the functional GBR1/GBR2 heterodimer, we compared the amount of NSF co-immunoprecipitated with GBR1 in cells expressing or not the GBR2 subtype. Equivalent amount of NSF were recovered in both conditions (Fig. 4A: lanes 5 and 6) suggesting that GBR1/GBR2 heterodimerization did not interfere with the NSF/GBR1 interaction. To confirm the existence of an NSF/GBR1/GBR2 ternary complex, we took advantage of the fact that GBR1 can be trafficked to the plasma membrane only in association with GBR2 (White et al. 1998). Hence, co-sedimentation of NSF following cell surface immunoprecipitation of GBR1 would indicate an association of NSF with the GBR1/GBR2 heterodimer. As shown in figure 4A (lanes 7 and 8), both NSF and GBR2 were co-precipitated with cell surface GBR1, suggesting the binding of the active form of the GBR to NSF.

To confirm the specificity of interaction between NSF and the GBR, we assessed the ability of the Pep27 peptide to inhibit the association of NSF to GBR2 in cell co-expressing GBR1 and GBR2. For this purpose, we inserted a HIV TAT fusion sequence (that allows the diffusion of the hybrid protein through the plasma membrane; Becker-Hapak et al. 2001) within the GST-Pep27 protein. As expected for a specific interaction, treatment performed with the GST-TAT-Pep27 abolished the NSF/receptor association (Fig. 4B) whereas a treatment with a GST-TAT-random sequence peptide (GST-TAT-RSP) had no effect. Interestingly a GST-TAT-Pep2m protein also impaired NSF co-precipitation with the receptor indicating that the GluR2- and GBR2-derived peptides share a unique binding site on NSF.

The characterization of the receptor species that can be co-immunoprecipitated with NSF (Fig. 3C) indicated that NSF can interact both with immature (most-likely localized in the ER) and fully processed (most-likely localized at the cell surface) forms of GBR2. The co-immunoprecipitation of NSF with cell-surface GBR1 in cells

co-expressing GBR2 (Fig. 4A) also indicates that the AAA ATPase can interact with the functional receptor at the cell surface. Classically, however, NSF is described as a soluble cytoplasmic protein (Ref). To further assess if an interaction between the GBR and NSF could occur at the cell surface. Their potential co-localization in this organelle was assessed by confocal immunofluorescence microscopy. For this purpose, cells expressing GBR1 and GBR2 (Fig. 5A-B) were first labeled prior to permeabilization using antibodies directed against the N-terminal epitopes displayed by each of the receptor (myc for GBR1 and HA for GBR2). Following extensive washing of the antibodies the cells were then permeabilized and NSF labeled with a specific antibody (panel C). As can be seen in the overlay panels (D and E), both GBR1 and GBR2 are detected in close apposition with NSF at the plasma membrane as illustrated by the colocalization signal in magenta and yellow respectively. Similar results were obtained using green fluorescent protein (GFP)-tagged-NSF (avoiding the need for permeabilization) indicating that the co-localization between NSF and both receptors did not result from a permeabilization artefact (data not shown). These results are consistent with the notion that although the interaction between GBR1, GBR2 and NSF can be initiated in the ER they can be maintained once the receptors have reached the plasma membrane.

GBR activation destabilize the NSF/heterodimer complex. Since NSF was found to bind to the GBR1/GBR2 heterodimer (Fig. 4A), we wondered if activation of the receptor could modulate this association. Activation of the receptor promoted the disruption of the ternary complex as indicated by the time-dependent decrease in the amount of NSF co-immunoprecipitated with GBR1 following cell stimulation with GABA (Fig. 6A). This effect of GABA was mimicked by the selective GBR agonist, baclofen, (Fig. 6B). The pharmacological selectivity of the GABA inhibitory action was further supported by the observation that the level of co-immunoprecipitated NSF with GBR2 expressed alone (the subunit that does not bind agonists), was insensitive to agonist pre-incubation (Fig. 6C). In contrast, the agonist effect was recovered when GBR2 was expressed with GBR1 (the subunit harboring the GABA/baclofen binding site) (Fig. 6C). Interestingly, similar results were

obtained whether GBR2 was co-expressed with GBR1a or GBR1b, two common splice variants of GBR1. The interchangeability of the two splice variants is not surprising given their sequence identity in the putative cytoplasmic domain potentially involved in NSF binding; their only divergent sequences being restricted to extracellular domains known as sushi domains (Kaupmann et al. 1997). In addition to confirm that NSF is associated with the functional GBR1/GBR2 heterodimer at the cell surface where GABA can act, these results laid the foundation to explore the potential functional implications of this interaction.

Preventing NSF binding preserves the GBR/G protein coupling following chronic stimulation. The observation that NSF is released from the GBR complex following stimulation lead us to test whether NSF could be implicated in the GABA-mediated G protein activation. To do so, quantification of the receptor-promoted GDP/GTP exchange was assessed by GTP γ [³⁵S] binding assays in the presence of GST-TAT-Pep27 and GST-TAT-Pep2m (to impair the GBR/NSF interaction) or the corresponding GST-TAT-RSP control protein. As illustrated by figure 7A, GST-TAT-Pep27, -Pep2m and -RSP treatments were without effect on the maximal receptor induced GTP γ S binding. Previous studies have demonstrated that the G protein coupling activity of the GBR wanes over time following sustained agonist stimulation (Perroy et al. 2003; Schiff et al. 2000; Couve et al. 2002; Tosetti et al. 2004; Gonzalez-Maeso et al. 2003). Consistent with these findings, we observed that a 30min pre-stimulation with GABA led to a 40% decline of the maximal baclofen-stimulated GTP γ S binding (Fig. 7B). GST-TAT-Pep27 and GST-TAT-Pep2m treatment blocked this GABA-promoted desensitization whereas GST-TAT-RSP was without effect (Fig. 7C). Altogether these results indicate that the association with NSF is involved in agonist-promoted desensitization of the GBR in CHO cells. Because NSF was previously implicated in the membrane sorting of GluR2 and β 2AR ((Hanley et al. 2002; Noel et al. 1999; Shi et al. 2001; Cong et al. 2001)), we assessed whether receptor pre-stimulation with GABA affected cell surface expression of GBR1 or GBR2. As recently reported for the GBR expressed in HEK293 (Perroy et al. 2003) or hippocampus cells (Fairfax et al. 2004), ELISA

analysis revealed that the cell surface receptor was very stable in the continuous presence of its ligand (Fig. S1) indicating that the contribution of NSF to the desensitization of the GABA_B receptor does not involve receptor trafficking.

The agonist-promoted desensitization of GBR is a PKC dependant mechanism. Given the proposed role of PKC in the regulation of both NSF ((Matveeva et al. 2001)) and GBR efficacy (Dutar and Nicoll 1988; Thompson and Gahwiler 1992), we investigated the potential contribution of this kinase in the NSF-mediated desensitization of the receptor. First, we investigated the ability of GABA to promote plasma membrane translocation of PKC in CHO cells expressing a GFP-tagged PKC α construct. In agreement with what was previously observed in hippocampal neurons (Tremblay et al. 1995), treatment with GABA induced the recruitment of GFP-PKC α protein to the plasma membrane (Fig. 8A) that reached its maximum at 5 minutes. This recruitment was comparable to the one promoted by the direct activation of PKC with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) confirming that GBR stimulation activates PKC in CHO cells. Inhibiting PKC activation with GFX completely blocked the GABA-promoted attenuation of the baclofen-stimulated GTP γ S binding response (Fig. 8B) suggesting a role of the kinase in the desensitization process. Consistent with such a role, direct PKC activation with PMA reduced the maximal baclofen response by 40% thus mimicking the desensitizing effects of GABA (Fig. 8B). Also consistent with a role for PKC is the observation that the GABA-promoted phosphorylation of GBR1 and GBR2 was blocked by GFX whereas PMA strongly stimulated it (Fig. 8C-D).

PKC induces the dissociation of NSF from the activated GBR. To further explore the link between PKC and NSF in the agonist-promoted desensitization process, we assessed the effect of GFX on the GABA-stimulated releases of NSF from the receptor. As shown in fig 9, GFX strongly inhibited the disruption of the NSF/receptor complex that follows the activation of the receptor under control conditions. These results indicate that the GABA-stimulated dissociation of NSF from the receptor involves PKC activation. Consistent with such a role for PKC is the

observation that PMA treatment was sufficient to promote NSF release (Fig. 9). Taken together, these results clearly suggest the existence of an intricate relation between NSF binding, PKC activation and GBR desensitization (Fig 10).

Discussion

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

NSF was found to interact directly with both GBR1 and GBR2 in a non-competitive manner as illustrated by the fact that binding of the AAA ATPase to a given subunit was not inhibited by the co-expression of the other one (Fig. 4 and 6). This contrasts with other proteins such as 14-3-3 (Couve et al. 2001), CREB2 (White et al. 2000) and Marlin-1 (Couve et al. 2004) which were found to interact only with GBR1 and compete for the GBR1-GBR2 interaction. The concomitant interaction of NSF with both GBR1 and GBR2 reflects its ability to interact with the functional receptor expressed at the cell surface (Fig. 4A and 5). As previously reported for the NSF/GluR2 interaction (Hanley et al. 2002), a peptide corresponding to the interacting domain of the receptor with NSF was sufficient to block the interaction. Interestingly, peptides derived from both GluR2 (Pep2m) and GBR2 (Pep27) subunits could inhibit the association of NSF to GBR (Fig. 4B). This indicates that these peptides share a unique binding site on NSF that may represent a common interaction domain for GBR and GluR2 subunits.

Also reminiscent of the GluR2/NSF interaction, the nucleotide binding status and the ATPase activity of NSF were found to regulate its interaction with the GBR subunits (Fig. 2 and 3). This is important when considering that the classical functions of the ATPase are dictated by its nucleotide binding state. For instance, the NSF-promoted SNARE complex uncoiling involved in membrane fusion events requires ATP hydrolysis that leads to the dissociation of the ADP-bound NSF from its substrate (Sollner et al. 1993). Interestingly, GBR stimulation led to a reduction of its co-immunoprecipitation with NSF indicative of an agonist-promoted dissociation of the enzyme. Since NSF interacts within the coiled-coil region of GBR2, it is tempting to draw a parallel with the typical uncoiling action of NSF and propose that the ATPase regulates the association of the GBR subunit carboxyl-tails. The established

role of c-tails in regulating GPCR activity (Bockaert et al. 2003;El Far and Betz 2002) would be consistent with a potential influence of NSF-promoted c-tail uncoiling on the GBR signaling efficacy. This hypothesis is supported by the observation that inhibition of the NSF/GBR interaction by GST-TAT-Pep27 or -Pep2m blocked the agonist-promoted GBR desensitization (Fig. 7). However, an NSF-dependent regulation of the GBR coiled-coil alone would not be sufficient to explain the agonist-promoted reduction in signaling efficacy. Indeed, it was previously shown that the entire deletion of the GBR coiled-coil domain does not affect the receptor activity(Grunewald et al. 2002;Margeta-Mitrovic et al. 2001).

In addition to NSF, activation of PKC was also found to be essential to the GBR desensitization (Fig. 8B) suggesting that GBR signaling is under the control of a concerted action of NSF and PKC. Consistent with this notion, the agonist-promoted desensitization was accompanied by a PKC-dependent phosphorylation of both GBR1 and GBR2. In addition, direct activation of PKC with PMA, promoted both GBR phosphorylation and its functional uncoupling from the G protein (Fig. 8B-D). Such PKC-mediated receptor phosphorylation has previously been shown to lead to signaling attenuation for several GPCRs (Avendano-Vazquez et al. 2005;Namkung and Sibley 2004). Since, PKC-dependent phosphorylation of NSF has been shown to inhibit its activity(Matveeva et al. 2001), its contribution to the combined regulatory influence of NSF and PKC on GBR function cannot be excluded. This is, however, unlikely since no change in the NSF phosphorylation state was observed following GBR stimulation or PMA treatment (data not shown).

The existence of a coordinated role of NSF and PKC in the regulation of GBR activity is further supported by the observation that the agonist-promoted release of NSF from the receptor requires PKC activation and that PMA treatment is sufficient to induce the dissociation of the ATPase. Although the precise sequence of events linking NSF and PKC in GBR regulation remains to be investigated, a functional interaction between PKC and NSF also emerged from several studies on the regulation of the GluR2-containing AMPA receptor. In that case, NSF has been shown to stabilize the receptor at the synaptic membrane by disrupting the constitutive interaction occurring between GluR2 and the protein interacting with C

kinase (PICK-1) (Hanley et al. 2002). For its part, activated PKC is recruited by PICK-1 to the GluR2 leading to its phosphorylation, removal of the AMPA receptor from the synaptic membrane and a subsequent long term depression (Perez et al. 2001). The opposite action of NSF and PKC on the trafficking of the GluR2 containing AMPA receptor contrasts with their concerted action in the regulation of the GBR signaling efficacy.

NSF has also been shown to regulate the trafficking of other GPCR by binding either directly to the receptor (Cong et al. 2001), a receptor activity regulating protein (RAMP-3; (Bomberger et al. 2005)) or β arrestin (McDonald and Lefkowitz 2001). In the case of the direct interaction with the β 2AR, the association has been shown to occur at the carboxyl end of the receptor where it can compete with the PDZ binding to Na^+/H^+ exchanger regulatory factor (NHERF). The interactions with both NSF (Cong et al. 2001) and NHERF (Gage et al. 2004) have been proposed to regulate the efficiency of receptor recycling following agonist-promoted endocytosis. The NSF-dependent desensitization observed in the present study for GBR is probably not resulting from the action of NSF on receptor membrane sorting since agonist stimulation does not lead to rapid GBR endocytosis (supplementary data 1 (Fairfax et al. 2004; Perroy et al. 2003)). However, the recent proposal that the NSF-mediated regulation of AMPA receptor activity could result in part from the modulation of the lateral diffusion of the receptor within the plane of the plasma membrane (Steinberg et al. 2004), offers an alternative explanation. Consistent with this hypothesis, it has recently been suggested that the localization of GBR in raft microdomains can control its activity (Becher et al. 2004).

Material and methods

Materials. Different primary antibodies have been used in this study: the mouse 9E10 anti-myc or 12Ca5 anti-HA monoclonal antibodies (house made), the rat 3F10 anti-myc antibody (Roche), the rabbit polyclonal anti-NSF antibody (Calbiochem) and finally the anti-GBR2 and anti-GBR1 polyclonal antibodies generated in rabbit and in sheep respectively (these are a kind gift from GSK). For Western blot analysis, secondary mouse anti-sheep (SIGMA) and goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Amersham) conjugated to the horseradish peroxidase were used. For immunofluorescence, secondary goat anti-rat, anti-rabbit or anti-mouse antibodies coupled respectively to Alexa 633, Texas Red or Oregon green were used (all from Molecular Probes). GF109203X (GFX) was pursued from Calbiochem, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) from SIGMA as well as Baclofen and GABA. NDSB or 3-(1-pyridinio)-1-propanesulfonate was obtained from Fluka. For deglycosylation experiments, EndoH and PNGase F enzymes were produced by Roche.

Constructs. For YTH studies, GBR1 and GBR2 c-termini (L⁸⁶⁰-K⁹⁶¹ and V⁷⁴¹-L⁹⁴¹) were generated and cloned in frame with GAL4_{BD} as described (Fuller et al. 1998). GAL4_{AD} fusions for NSF were expressed in pACT2 (Clontech), either isolated directly from human brain cDNA library or constructed directly by PCR. Full-length sequence of tagged myc-GABA_B-R1b and HA-GABA_BR2 were inserted into pcDNA3.1(-) as described previously (White et al. 1998). To generate double stable cell line with HA-GBR2 and myc-GBR1b, myc-GBR1b was subcloned into pCMVpuro3 plasmid (Invitrogen) between NheI and AflII. For Gluthation-S-Transferase (GST) precipitation studies, GBR1 and GBR2 c-termini (comprised between the residues ⁸⁶¹I-⁹⁶¹K and ⁷⁴⁴I-⁹⁴¹L respectively) were amplified by PCR and cloned in frame with GST into pGEX4T2 (Amersham) between EcoRI and XhoI. His₆tagged-NSF plasmid was constructed by amplifying NSF from YTH template and insert it into pQE81 plasmid (Qiagen) between BamHI and Sall; NSF construct was further verified by sequencing. GST-TAT fusion protein were constructed by

inserting synthesized oligonucleotides coding for the TAT-HA tag between BamHI and EcoRI. Similar method was used to fuse the coding sequence of human GBR2 derived Pep27 (R⁷⁹⁹MKITELDKDLEEVTMQLQDTPEKTTY⁸²⁵) peptide or rat GluR2 derived pep2m (K⁸⁴⁴RMKVAKNPQ⁸⁵³) to either GST-TAT or GST proteins between EcoRI and XhoI.

YTH. As already described (White et al. 2000), yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Y190) expressing either a GAL4-binding domain–GBR1ct or a GAL4-binding domain–GBR2ct fusion protein were selected and transformed with a human brain Matchmaker cDNA library (HL4004AH, CLONTECH) to give a 3-fold representation of the library. Interacting clones were selected with 20 mM 3-amino-1,2,4-triazole (Sigma) followed by production of β -galactosidase as determined by a freeze-fracture assay. Plasmid DNA was recovered from yeast by using the Yeastmaker plasmid isolation kit (CLONTECH), and the resulting DNA was transformed into *Escherichia coli* before sequencing. Direct two-hybrid interactions were determined in Y190 co-transformed with pYTH16, containing the whole c-terminus of GBR1 or GBR2 or c-terminal fragments of GBR2 fused to GAL4BD, and pACT2, expressing NSF as GAL4AD fusions. Fusion constructs were generated directly through PCR or were retrieved as isolates from the library screen. Levels of interaction were determined as described before.

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

To purify GST-Gb1ct or GST-Gb2ct, bacteria were harvested and washed in buffer A (25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 200 mM KCl, 2mM MgCl₂, 1% Triton-X100, 25 mM DTT and 1mM PMSF). Cells were disrupted by sonication and centrifuged for 30 min at 30000 g. In the case of GST-GBR1ct protein purification, supernatant were incubated with glutathione-agarose beads (Amersham) during 2h under rocking. Beads are then harvested by centrifugation, washed in the same buffer and eluted with 20mM Gluthation. Gluthation was removed on PD-10 column. As GST-GBR2ct protein displayed insolubility, proteins had to be extracted from inclusion bodies. To do so, lysate were centrifuged at 30000g for 30 min and pellet were washed twice in 25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 200 mM KCl, 1% TritonX-100, 1 mM DTT, 1mM PMSF. Pellet were solubilized in 25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 6M Guanidium-HCl for 1h and insoluble material were pelleted for 10 min at 100000 g. Guanidium solubilized proteins were then quickly diluted in 1M NDSB solution to favor folding and incubated for 1h more under rocking. After an O/N dialysis in 25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 200 mM KCl buffer, properly folded proteins were purified on glutathione-agarose beads as described previously for GST-GBR1ct. GST-TAT-peptide proteins were purified in PBS at 4°C following manufacturer's instructions. The level of purity and the amount of purified proteins were quantified on SDS-PAGE electrophoresis gel by coumassie blue staining using increasing amounts of BSA protein as reference.

In vitro protein binding assay. These experiments were performed essentially as previously described (Hanley et al. 2002). GST-fusions (2 µg) were immobilized on glutathione-agarose beads in 25 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 200 mM KCl, 1% TritonX-100, 10% glycerol, 1 mM DTT (buffer A). Beads are then washed twice with buffer A plus 2 mM ATP, 8 mM MgCl₂ and 8 mM EDTA (buffer B) or 2mM ATPγS and 8mM MgCl₂ in presence of 0,2% BSA and incubated with 50 nM or indicated amount of NSF for 1h under rocking. After four washes in buffer B without BSA, bound proteins were eluted with 20 mM glutathione and detected by western blotting. To determine the effect of the modulation of NSF-ATPase activity on its binding to

GST-fusion proteins, same procedure was performed in presence of the indicated mix of MgCl₂, EDTA and nucleotide.

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

Cell treatments. All treatments were performed at 37°C on intact cells. Treatment intending to inhibit the NSF activity with 1mM NEM was done for 5min. Pre-stimulations of cells with GABA 1mM or Baclofen 0.1mM were performed for 30min when not precised and for the indicated time. In order to demonstrate the role of the PKC, cells were incubated with vehicle or 0.5µM GFX for 30min prior to the pre-stimulation with GABA or with 1µM PMA for 10min. Finally, inhibition of the NSF/receptor interaction with GST-TAT-Pep27 or –Pep2m hybrid proteins was performed by incubating proteins at a concentration of 400nM or 800nM, respectively, for 1h before any treatment. Treatment with the control GST-TAT-RSP protein was performed at 800nM for 1h.

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

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

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

Biotinylation, streptavidin pull-down and deglycosylation. For surface biotinylation, cells were washed with PBS on ice, and incubated at 4 °C for 30 min in Dulbecco's PBS containing 0.5 mg/ml of sulfo-NHS-biotin under gentle agitation. Excess biotin was quenched by adding Tris-HCl, pH 7.4, to a final concentration of 50 mM. Cells were then washed twice with cold Dulbecco's PBS and harvested. Biotinylated cell surface proteins were isolated using immobilized streptavidin after solubilizing the total cellular membranes as described for immunoprecipitation in TNTO buffer. 25 μ l of resin was used for 1 mg of solubilized membrane proteins in presence of 0.1% BSA (w/v) for 2 h at 4 °C under rocking. Resin was then washed three times and precipitated proteins were eluted as described above. For deglycosylation, eluted streptavidin pull downed or immunoprecipitated proteins were first eluted from the resin in 1% (w/v) SDS, 50 mM sodium phosphate, pH 7.5 then diluted ten times with 50 mM sodium phosphate, pH 7.5. Deglycosylation were performed in the appropriate buffer in presence of EndoH or PNGaseF at final concentrations of 100 milliunits/ml and 0.001-20 milliunits/ml respectively, over night at 37°C.

Western blot analysis. Protein samples were resolved on SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose and subjected to immunoblotting using the indicated antibody depending on the experiment. The nitrocellulose was then incubated with an

appropriate secondary antibody conjugated to the horseradish peroxidase conjugate for 30 min and developed using the Renaissance chemiluminescence kit (Perkin Elmer). Quantification analysis were performed in parallel by scanning blots with a 1200ppi resolution or by detecting chemiluminescence directly with phosphoimager device (BioRad). Band intensities were then quantified with the Quantity One BioRad software.

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

[³⁵S] GTP γ S binding assay. CHO stably transfected with GBR1a and GBR2 were resuspended and lysed under hypotonic conditions (25 mM TrisHCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 5 mg/ml leupeptin, 5 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 10 mg/ml benzamidine) and homogenized with a polytron homogenizer (Ultra-Turrax; Janke and Kunkel) for 10 s. Homogenates were centrifuged at 500 g for 5 min at 4°C and the resulting supernatant fraction was centrifuged at 35 000 g for 20 min at 4°C. The membrane pellets were resuspended in assay buffer [50 mM HEPES pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT), 15 mM GDP and 0.5% bovine serum albumin (BSA)]. Membranes (20 μ g of protein per assay) were then incubated in 300 pM [³⁵S]GTP γ S (1250 Ci/mmol) in the presence of 10⁻⁴ M baclofen for 60 min at 25°C. Binding was terminated by rapid filtration over GF/B filters using a cell harvester. Filters were washed three times in 50 mM Tris pH 7.4 containing 50 mM NaCl and 5 mM MgCl₂, and counted.

Immunofluorescence. Appropriate treatment was performed on CHO expressing stably Myc-GBR1b and HA-GBR2 and cells were then washed with cold PBS and fixed with 3% paraformaldehyde for 15 min. Cells were washed in PBS then incubated in PBS containing 0.25% BSA for 30 min. Surface labeling were performed by incubating the indicated primary antibody for 30 min followed by extensive wash in PBS and a permeabilization step with PBS containing 0.15% TritonX100 and 0.25%BSA for 15min. NSF was labeled with the accurate antibody for another 30min. Cells were washed in the same buffer and incubated with secondary antibody coupled to fluorescent markers. The samples were analyzed by confocal laser-scanning microscopy utilizing a Leica TCS SP1 confocal microscope, and co-localisation was performed by overlay of the images using the Leica Confocal Software LCS (Heidelberg, Germany). Excitation and emission filters for the different labelled dyes were as follows: YFP (green): λ_{exc} 488 nm, λ_{em} 540/25 nm; Texas red (red): λ_{exc} 568 nm, λ_{em} 610/30 nm; Alexa 633 (blue): λ_{exc} 633 nm, λ_{em} 705/45 nm.

Mathematical and statistical analysis. For GTP γ S binding, dose response curve experiments were analysed by non-linear regression using Prism program (GraphPad software, San Diego, CA) (Fig. 7A). For other GTP γ S binding studies, basal GTP γ S binding obtained without stimulation by baclofen was subtracted to the maximal GTP γ S binding obtained in presence of 0.1mM Baclofen. Every conditions were expressed in percentage of the corresponding control condition. In the case of the figure 7C, the diminution of the GTP γ S binding was calculated by subtracting the maximal GTP γ S binding observed following pre-stimulation with GABA to the one observed when cells were not pre-stimulated. The statistical significance of results obtained in GTP γ S binding or in the case of co-immunoprecipitation experiments was determined using a one-way ANOVA analysis followed by a Bonferroni's multiple comparison test. Statistical significance were respectively indicated by *, **, *** signs when $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$ between the control condition and the condition of interest.

Acknowledgments

Authors are grateful to François-Xavier Campbell-Valois, Céline Galès, Monique Lagacé, James Omichinski, Riad Qanbar and Ali Salahpour for constant fruitful discussions. This work was supported by a CIHR/Rx&D grant sponsored by GlaxoSmithKline. N. L. holds a CIHR studentship. M.B. is a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

References

- Avendano-Vazquez S. E., Garcia-Caballero A., and Garcia-Sainz J. A. (2005) Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1. *Biochem J* **385**, 677-684.
- Becher A., Green A., Ige A. O., Wise A., White J. H., and McIlhinney R. A. (2004) Ectopically expressed gamma-aminobutyric acid receptor B is functionally down-regulated in isolated lipid raft-enriched membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 981-987.
- Bockaert J., Marin P., Dumuis A., and Fagni L. (2003) The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett* **546**, 65-72.
- Bomberger J. M., Spielman W. S., Hall C. S., Weinman E. J., and Parameswaran N. (2005) RAMP isoform-specific regulation of adrenomedullin receptor trafficking by NHERF-1. *J Biol Chem*.
- Cong M., Perry S. J., Hu L. A., Hanson P. I., Claing A., and Lefkowitz R. J. (2001) Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J Biol Chem* **276**, 45145-45152.
- Couve A., Filippov A. K., Connolly C. N., Bettler B., Brown D. A., and Moss S. J. (1998) Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem* **273**, 26361-26367.
- Couve A., Kittler J. T., Uren J. M., Calver A. R., Pangalos M. N., Walsh F. S., and Moss S. J. (2001) Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci* **17**, 317-328.
- Couve A., Restituto S., Brandon J. M., Charles K. J., Bawagan H., Freeman K. B., Pangalos M. N., Calver A. R., and Moss S. J. (2004) Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA receptors. *J Biol Chem* **279**, 13934-13943.

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

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

El Far O. and Betz H. (2002) G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *Biochem J* **365**, 329-336.

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

Gage R. M., Matveeva E. A., Whiteheart S. W., and von Zastrow M. (2004) Type I PDZ ligands are sufficient to promote rapid recycling of G protein-coupled receptors independent of binding to NSF. *J Biol Chem*.

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

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

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

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

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

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

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

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

Kaupmann K., Huggel K., Heid J., Flor P. J., Bischoff S., Mickel S. J., McMaster G., Angst C., Bittiger H., Froestl W., and Bettler B. (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**, 239-246.

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

Kuner R., Kohr G., Grunewald S., Eisenhardt G., Bach A., and Kornau H. C. (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* **283**, 74-77.

Lee S. H., Liu L., Wang Y. T., and Sheng M. (2002) Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* **36**, 661-674.

Lee S. H., Simonetta A., and Sheng M. (2004) Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* **43**, 221-236.

Maley F., Trimble R. B., Tarentino A. L., and Plummer T. H., Jr. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* **180**, 195-204.

Margeta-Mitrovic M., Jan Y. N., and Jan L. Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97-106.

Margeta-Mitrovic M., Jan Y. N., and Jan L. Y. (2001) Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14649-14654.

Matveeva E. A., Whiteheart S. W., Vanaman T. C., and Slevin J. T. (2001) Phosphorylation of the N-ethylmaleimide-sensitive factor is associated with depolarization-dependent neurotransmitter release from synaptosomes. *J Biol Chem* **276**, 12174-12181.

McDonald P. H. and Lefkowitz R. J. (2001) Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal* **13**, 683-689.

Muller J. M., Shorter J., Newman R., Deinhardt K., Sagiv Y., Elazar Z., Warren G., and Shima D. T. (2002) Sequential SNARE disassembly and GATE-16-GOS-28 complex assembly mediated by distinct NSF activities drives Golgi membrane fusion. *J Cell Biol* **157**, 1161-1173.

Namkung Y. and Sibley D. R. (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* **279**, 49533-49541.

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

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

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

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

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

Perroy J., Adam L., Qanbar R., Chenier S., and Bouvier M. (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* **22**, 3816-3824.

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

Sallese M., Salvatore L., D'Urbano E., Sala G., Storto M., Launey T., Nicoletti F., Knopfel T., and De Blasi A. (2000) The G-protein-coupled receptor kinase GRK4

mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J* **14**, 2569-2580.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figures

Figure 1. *Interaction between NSF and GBR c-termini assessed in yeast two hybrid system.* GBR c-termini were used as bait in a yeast two hybrid screen testing a human brain cDNA library. One of the positive NSF clones obtained with the GBR2 c-terminus was tested for interaction with successive deletion mutants of receptor c-tail. Positive β -Gal activity is indicated for each construct.

Figure 2. *NSF ATPase state modulates NSF binding to GBR c-termini in vitro.* In all cases, purified His₆-NSF was incubated with GST-hybrid proteins under the indicated nucleotide and ionic conditions. Bound NSF was revealed by Western blot analysis as indicated in material and methods. In A) GST pull down assay was performed with increasing amount of His₆-NSF and GST or GST-GBR2ct recombinant proteins in presence of ATP γ S and MgCl₂. B) The binding of 50nM NSF to GST or GST-GBR2ct was assessed under the indicated nucleotide and ionic conditions. C) GST-pep27 and GST-pep2m were incubated with 50nM NSF in presence of ATP, MgCl₂ and EDTA. D) GST-GBR1ct and GST-GBR2ct were incubated with 50nM NSF in presence of ATP, MgCl₂ and EDTA. In each case, results are representative of two to three independent experiments.

Figure 3. *Endogenous NSF interacts independantly with both GBR1 and GBR2 in CHO cells.* In A) Immunoprecipitation was performed with lysates from cells expressing or not myc-GBR1b stably with a 9E10 anti-myc antibody. Co-precipitation of NSF was assessed by western blot analysis. In B-D) CHO HA-GBR2 or CHO were used. In B) Endogenous NSF or HA-GBR2 are immunoprecipitated with the indicated antibodies. The presence in the precipitate of GBR2 or NSF respectively is confirmed by western blot. In C) The nature of the two distinct molecular weight species of GBR2 is determined by deglycosylation. The higher molecular weight specie is purified by streptavidin pull down following a surface biotinylation. The lower one was purified by taking advantage of the higher affinity

displayed by the 12Ca5 anti-HA antibody for this former population of receptor. EndoH and PNGase glycosidases were used. In D) we assessed the effect of NEM treatment on NSF/HA-GBR2 co-precipitation.

Figure 4. *NSF interacts with the active form of the GBR.* In A) Immunoprecipitation of lysates from CHO transiently transfected with myc-GBR1b alone or with HA-GBR2 allowed to evaluate the effect of the co-expression of the two receptors on the level of GBR1/NSF co-precipitation. For surface immunoprecipitation, cells were labeled with an anti-myc 9E10 antibody for 1h at 4°C in PBS and BSA 0.25%, then lysed as described for classical immunoprecipitation. Lysates were incubated for 2h under rocking with protein G agarose beads. In B) GST-TAT hybrid proteins fused to the indicated peptide were used in order to inhibit the NSF/heterodimer interaction. NSF/receptor complexes are precipitated with an anti-GBR2 antibody in cells expressing or not stably Myc-GBR1b and HA-GBR2.

Figure 5. *NSF co-localizes with both GBR subunits at the plasma membrane.* Cells expressing stably myc-GBR1b and HA-GBR2 were used. myc-GBR1b, GBR2 and NSF were respectively labeled for immunofluorescence experiments with the Alexa633 (Blue), Oregon green and Texas red fluorescent dyes. GBR1 and GBR2 were surface labeled prior to cell fixation and permeabilization was then done in order to mark NSF. Overlay panels (D and E) correspond to the superposition of the A-C and B-C images respectively.

Figure 6. *Activation of the GBR decrease the affinity of NSF for the heterodimer.* In A) HA-GBR2 CHO cells expressing or not transiently myc-GBR1b were treated with GABA for the indicated times. The amount of precipitated NSF was quantified following an immunoprecipitation with a 9E10 anti-myc antibody. These results represent the means \pm SEM of three to five experiments performed independently. In B) experiments were done in the same conditions than in A) but cells were treated either with 1mM GABA or 0.1mM Baclofen for 30min. In C) CHO

cells or cells expressing stably HA-GBR2 alone, GBR2 and GBR1a or HA-GBR2 and myc-GBR1b, were used and treated or not with GABA 1mM for 30min. GBR2 was immunoprecipitated and its interaction with NSF and GBR1 was revealed by western blot.

Figure 7. *Preventing NSF binding preserves GBR activity following GABA pre-stimulation.* In A) maximal baclofen-stimulated [³⁵S]GTPγS binding was measured in membranes derived from CHO cells expressing stably GBR1a and GBR2 receptors and treated for 1h with the indicated peptides. In inset, the curve represents the GTPγS binding obtained for increasing amount of baclofen in control conditions. In B) Prior to membrane preparation, cells were stimulated or not with 1mM GABA for 30min and GTPγS binding assay was then performed as in A. These results represent the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicates. In C) the same experiments is performed than in B but cells were treated with indicated GST-TAT-peptide proteins for 1h before their stimulation with GABA for 30min. The histogram represents the amount of GABA-induced desensitization (which corresponds to the difference of the maximal GTPγS binding detected in vehicle or GABA conditions in each case) observed following treatment with the indicated GST-TAT-peptides proteins.

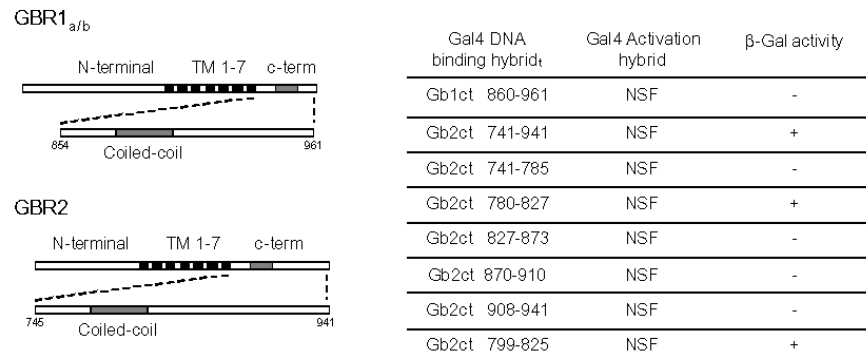
Figure 8. *PKC is implicated in the desensitization process of the GABA_B receptor in CHO cells.* In A) Cells expressing stably GBR1a and GBR2 are transiently transfected with GFP-PKCα construct and treated as indicated prior to their fixation. PKC localization was visualized by confocal microscopy. These results are representative of two independent experiments. In B) maximal baclofen-stimulated [³⁵S]GTPγS binding was measured in membranes derived from the same cells than in A). The effect of agonist pre-stimulation on the activity of the receptor was measured in absence or presence of 0.5μM GFX and compared to the one induced by phorbol ester treatment. These results represent the mean ± SEM of three independent experiments. In C) the phosphorylation state of GBR1 was studied by metabolic labeling with [³²P]Pi in cells expressing stably myc-GBR1b and HA-

GBR2. Receptor was immunoprecipitated and analysis was performed by autoradiography. Results were normalized by quantifying the amount of precipitated receptor in each condition by western blot. In D) same experiments was performed than in C but this time, GBR2 was immunoprecipitated. In C and D) Histograms represent the mean \pm SEM of four independent experiments.

Figure 9. *PKC modulates the NSF/GABA_B receptor interaction.* In A), lysates derived from cells expressing stably HA-GBR2 and transiently transfected with myc-GBR1b were immunoprecipitated with a 9E10 anti-Myc antibody following treatment modulating the activity of both PKC and the receptor. The amount of NSF present in the immunocomplexes is quantified in B). These results represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

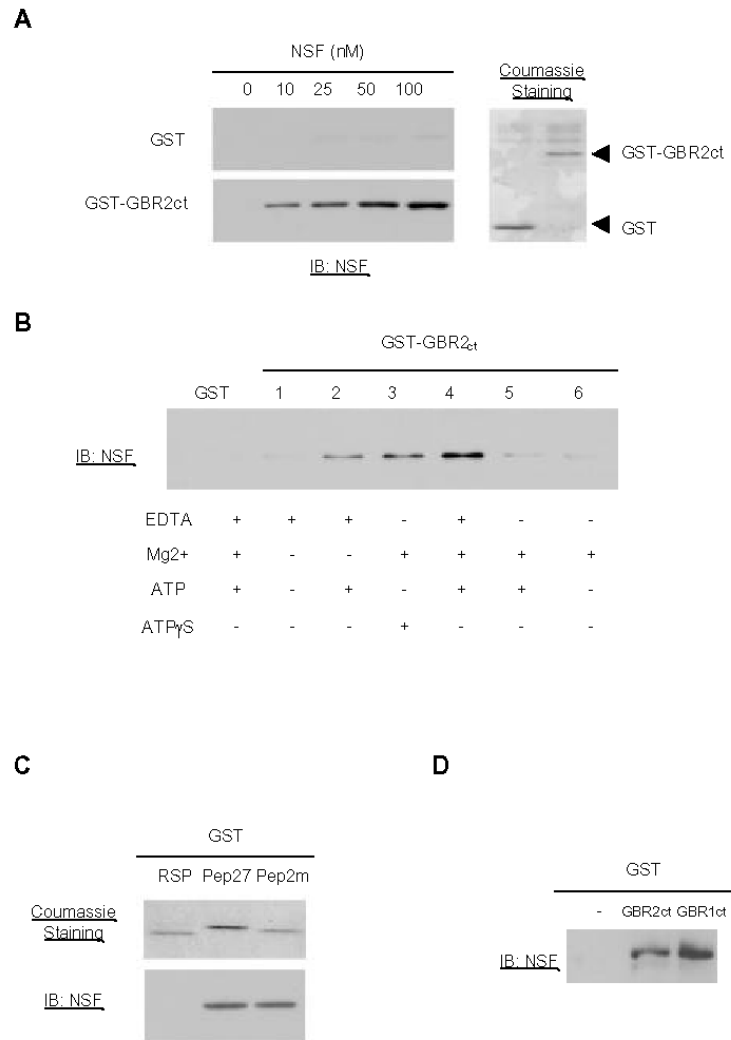
Figure S1. *Constant surface membrane expression of both GBR1 and GBR2 following GABA treatment.* Cells expressing stably myc-GBR1b and HA-GBR2 were treated with 1mM GABA for the indicated period. The level of surface expression of each of the receptor was measure by ELISA experiments. Black and white bars correspond respectively to GBR1 and GBR2. These results represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates.

Figure 1



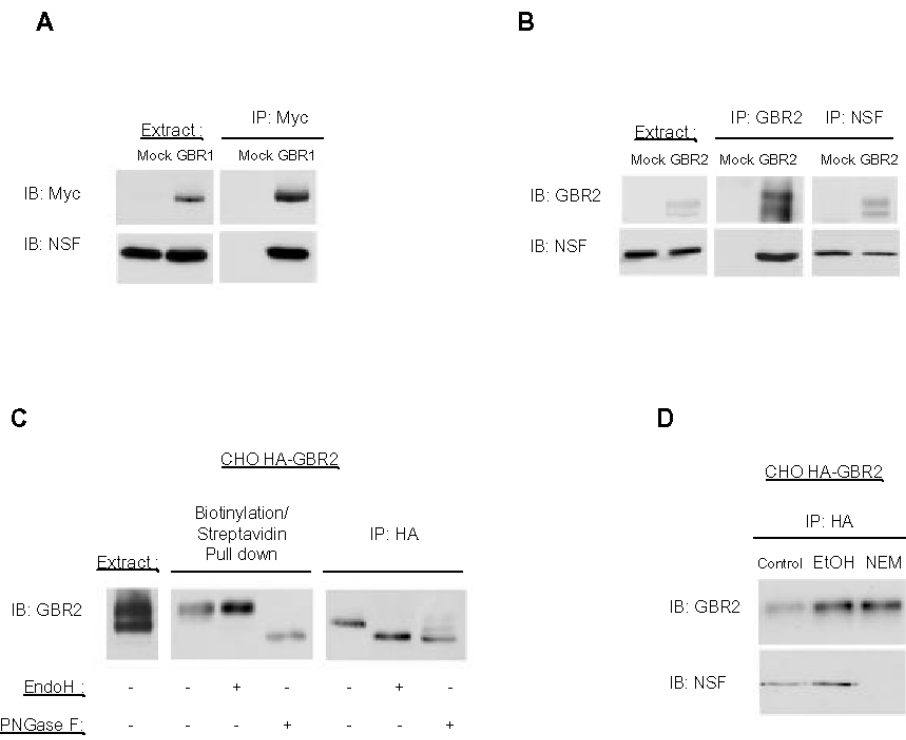
Pontier SM & al. NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Figure 2



Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

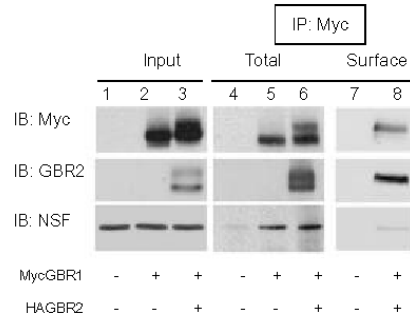
Figure 3



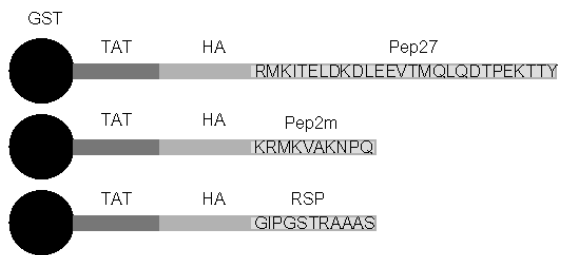
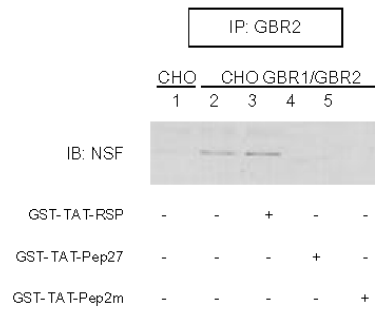
Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Figure 4

A

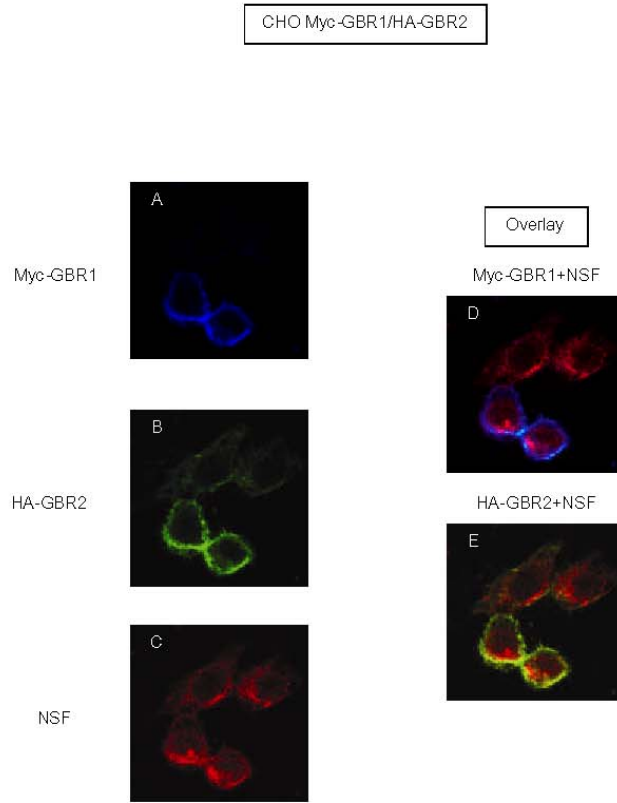


B



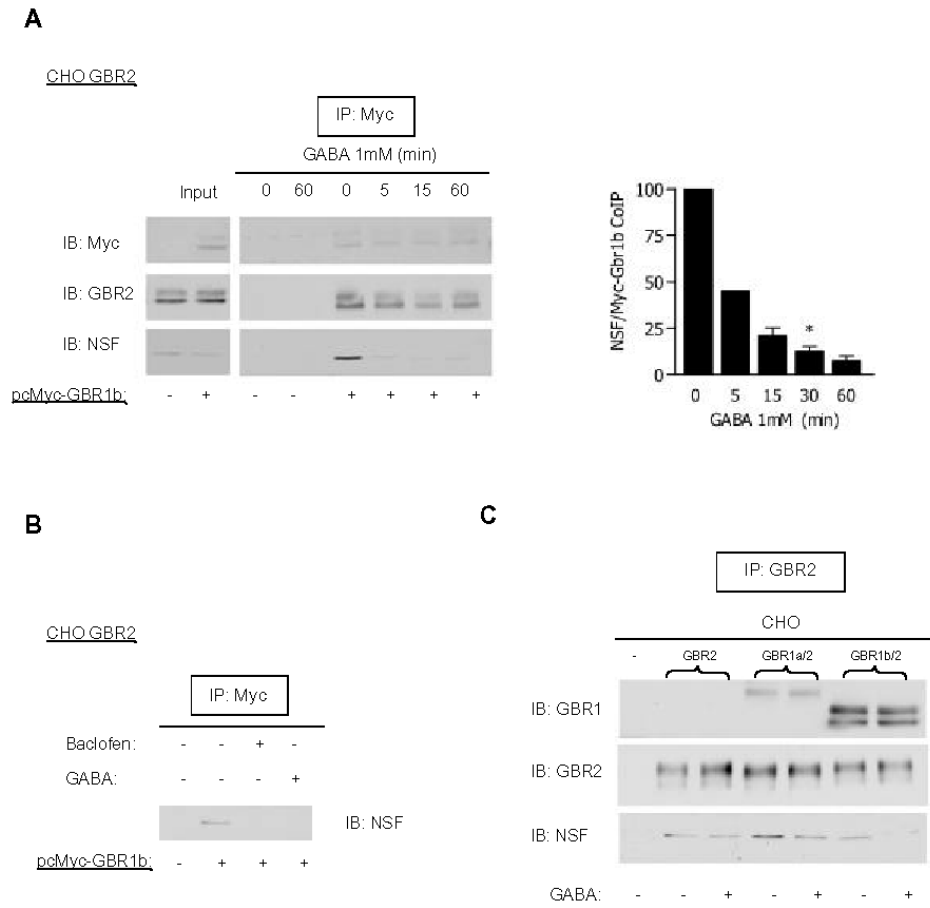
Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Figure 5



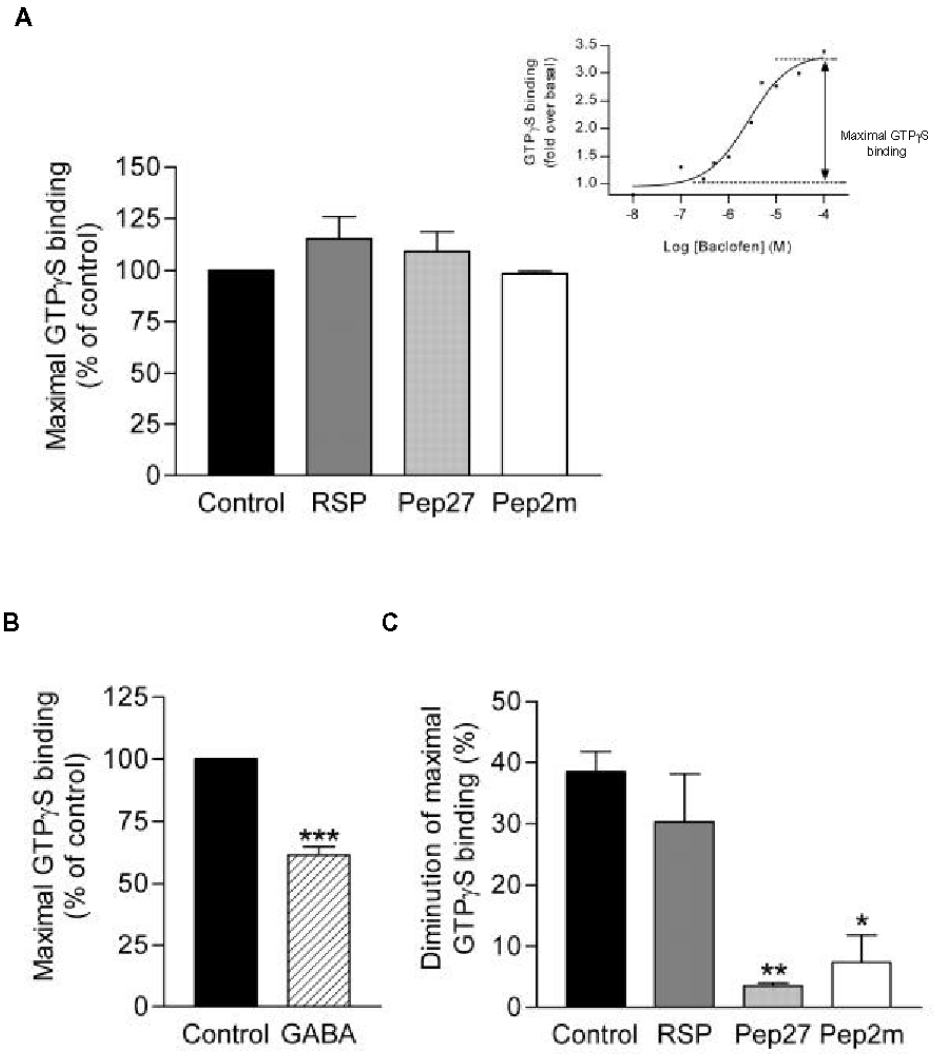
Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Figure 6



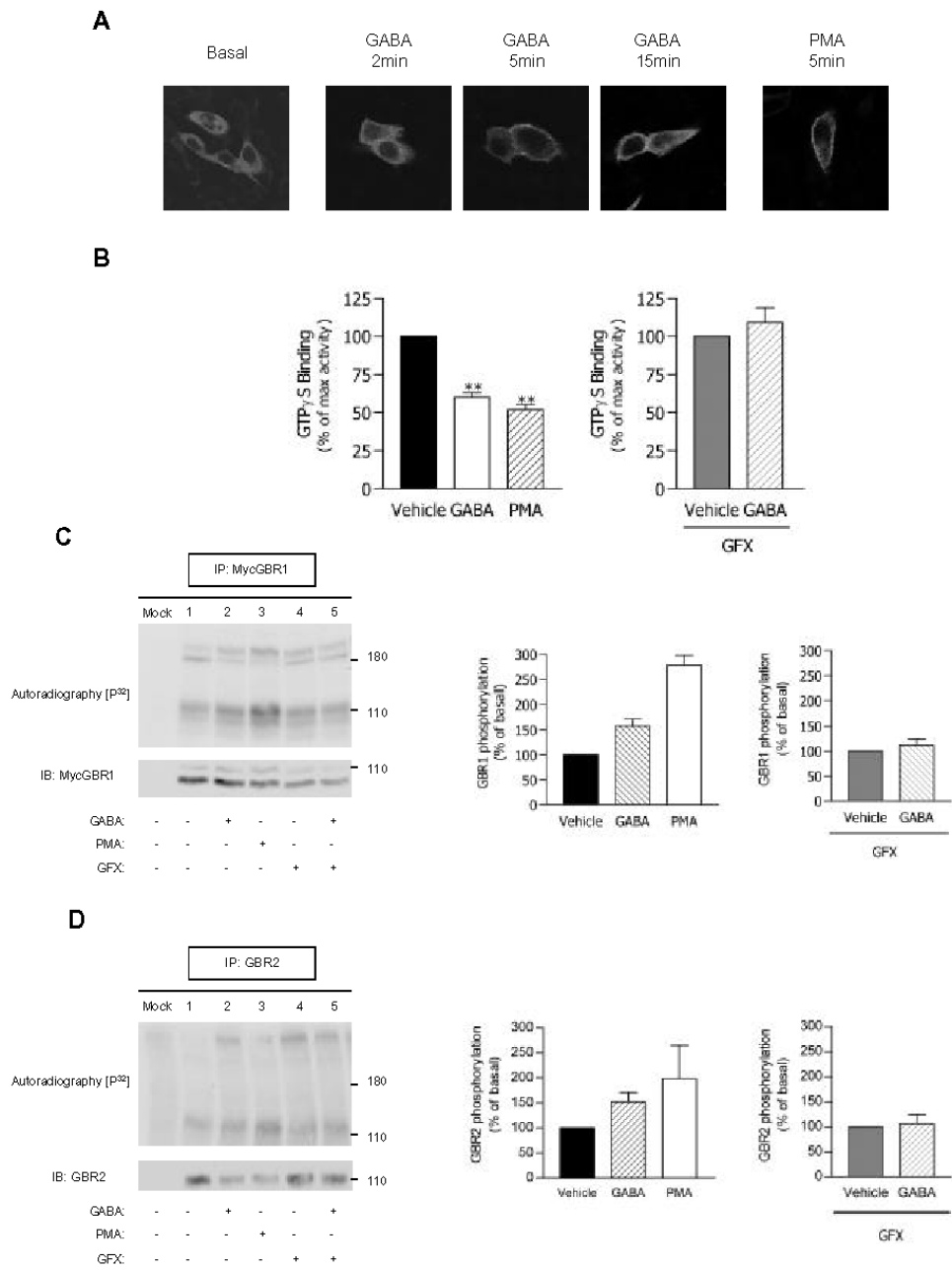
Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Figure 7



Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA $_B$ receptor signaling efficacy

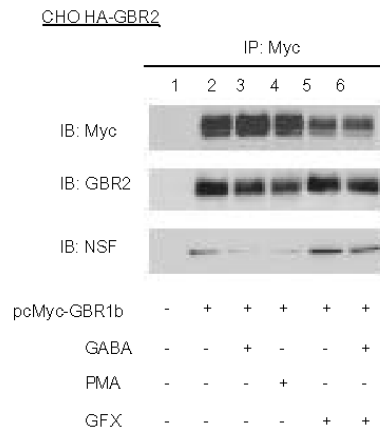
Figure 8



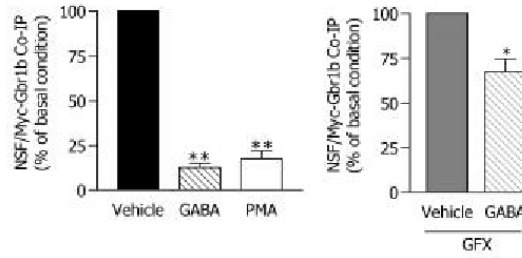
Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Figure 9

A

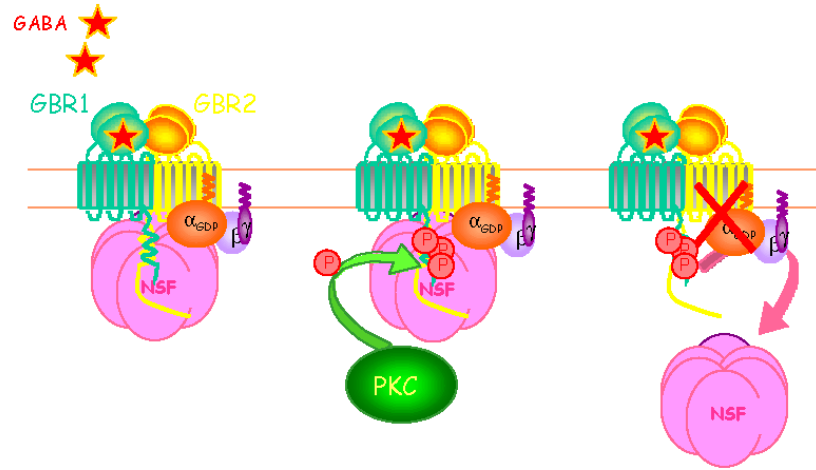


B



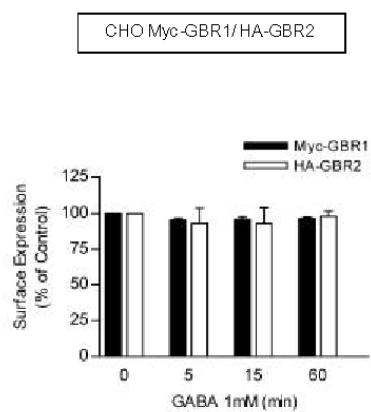
Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Figure 10



Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

Figure S1



Pontier SM & *al.* NSF regulates GABA_B receptor signaling efficacy

L'UBIQUITINATION

Une méthode de détection en temps réel

INTRODUCTION

En concourant à la modulation de la localisation des protéines membranaires ou de la nature des interfaces protéiques, les myristoylations, palmitoylations, farnesylations, géranylations, nitrosylations, phosphorylations, glutamination ou autres ubiquitination, constituent des mécanismes clefs de la régulation dynamiques des complexes protéiques. Dans cette liste de modifications post-traductionnelles, l'ubiquitination a néanmoins un rôle particulier. Elle consiste en la liaison covalente d'une petite protéine de 8kDa, l'ubiquitine et d'une protéine cible au niveau d'un (monoubiquitination) ou plusieurs (polyubiquitination) résidus lysines de cette dernière, ou encore de l'ubiquitine avec elle-même (au niveau de quatre de ses résidus lysines K^{11/29/48/63}). Dans ce cas, l'ubiquitine forme une chaîne liée à la protéine ubiquitinée (polyubiquitination). A partir d'une protéine unique, l'ubiquitine, le phénomène d'ubiquitination offre donc un panel large de signaux potentiellement très différents. Il est maintenant évident que certains d'entre eux sont associés à des processus cellulaires spécifiques tels que la dégradation ou le transport. Néanmoins, dans la plupart des cas, leur fonction restent encore indéterminée (Hicke, 2001b; Hicke and Dunn, 2003; Weissman, 2001). Cette grande versatilité du processus d'ubiquitination est probablement l'une des causes principales de l'émergence de son implication dans essentiellement tous les aspects de la régulation de la signalisation, modulation des complexes de transduction, contrôle du transport ou encore dégradation des acteurs protéiques (Raiborg et al., 2003).

L'importance de ce processus dans la signalisation des GPCR a récemment été illustrée par la corrélation observée entre la fonction de la protéine adaptatrice β arrestine et son ubiquitination (Shenoy et al., 2001; Shenoy and Lefkowitz, 2003). La stimulation de la β arrestine par des GPCR de classe B (ex : le V2R) qui lient fortement et co-internalisent avec cette dernière, conduit à son ubiquitination persistante. Au contraire, son activation par des récepteurs de classe A (ex : le β 2AR), auxquels elle est faiblement liée, s'accompagne de son ubiquitination transitoire (Shenoy and Lefkowitz, 2003; Shenoy and Lefkowitz, 2005). La qualité de l'interaction entre la β arrestine et le récepteur l'ayant activée reflète ainsi

vraisemblablement d'une part des rôles différents joués par la β arrestine en fonction de la nature du récepteur, mais aussi son association à des partenaires protéiques spécifiques. C'est dans cette problématique du lien entre ubiquitination et capacités de liaison de la β arrestine à ses divers partenaires que nous avons commencé ce projet.

D'un point de vue méthodologique, l'étude de l'ubiquitination est relativement restreinte et repose essentiellement sur des techniques d'immunoprécipitation et d'immunobuvardage. Bien que forts utiles, ces techniques doivent s'effectuer à l'issue d'une lyse des cellules avec tous les artefacts que cela peut augurer. En outre, elles ne permettent qu'un difficile accès à la dynamique du phénomène d'ubiquitination, dynamique qui dans le cas de la β arrestine, par exemple, semble déterminante (Shenoy et al., 2001). Il nous a donc semblé intéressant dans un premier temps de tenter de développer une méthode permettant de détecter à la fois le niveau d'ubiquitination de la β arrestine et son éventuelle interaction avec des partenaires protéiques particuliers dans des cellules vivantes et en temps réel.

A ce titre, la technologie du BRET (*Bioluminescence resonance energy transfert*) semblait appropriée. Son principe réside sur le transfert de l'énergie de bioluminescence émise par la coelenterazine à l'issue de sa dégradation par une luciférase (Luc), vers une protéine fluorescente de type verte (GFP). L'opportunité d'utiliser deux coelenterazines présentant des caractéristiques spectrales compatibles avec des protéines GFP (Green fluorescent protein) ou YFP (Yellow fluorescent protein) respectivement, permettait ainsi de détecter simultanément le transfert d'énergie associé à deux interactions protéiques différentes : 1) celui correspondant à l'ubiquitination de la β arrestine en utilisant une β arrestine fusionnée à une protéine luciférase (Luc β arr) et une protéine ubiquitine fusionnée à une GFP (GFP₂-Ubi); 2) celui correspondant à l'interaction de la β arrestine avec l'un de ses partenaires d'interaction, en utilisant à nouveau la Luc β arr et le partenaire protéique d'intérêt fusionné à une YFP.

Afin de démontrer la pertinence et la faisabilité de cette méthode, nous avons donc choisi de revisiter le modèle d'ubiquitination de la β arrestine. La modulation de cette modification post-traductionnelle par les récepteurs β 2AR et V2R sera étudié

dans un premier temps. Par ailleurs, nous mettrons en évidence la concomitance du phénomène d'ubiquitination et de la translocation de la β arrestine à l'un de ses partenaires, le V2R.

Participation des différents auteurs de la publication N°3 :

JP: Conceptualisation du projet, expériences, stratégie expérimentale, analyse des résultats et écriture du papier

SP: Conceptualisation du projet, expériences, stratégie expérimentale, analyse des résultats et écriture du papier

PC : Discussion

MA: Idée initiale du projet

MB: Idée initiale du projet, conceptualisation du projet, analyse des résultats et écriture du papier

PUBLICATION N°3 (PUBLIÉE DANS NATURE METHODS)

REAL TIME MONITORING OF UBIQUITINATION IN LIVING CELLS BY BRET

Julie Perroy^{†§}, Stéphanie Pontier[‡], Pascale G. Charest, Muriel Aubry and Michel Bouvier*

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

‡ Both authors contributed equally to this work.

§ New address :

Laboratory of Functional Genomic, UPR CNRS 2580 CCIPE, 141 rue de la Cardonille
34094 Montpellier, cedex 05 France.

*To whom correspondence should be addressed: e-mail:
michel.bouvier@umontreal.ca

Running title: Monitoring ubiquitination by BRET

Abstract

Ubiquitin has emerged as an important regulator of protein stability and function in organisms ranging from yeast to mammals. Detecting *in situ* changes in protein ubiquitination without perturbing the physiological environment of cells would be a major step forward in understanding the ubiquitination process and its consequences. Here we describe a new method to study this dynamic post-translational modification in intact cells. Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET), we measured the ubiquitination of β arrestin2, a regulatory protein implicated in the modulation of G protein-coupled receptors (GPCRs). In addition to allow the detection of basal and GPCR-regulated β arrestin2 ubiquitination in living cells, real time BRET measurements permitted the recording of distinct ubiquitination kinetics that are dictated by the identity of the activated receptor. The ubiquitination BRET assay should prove to be a useful tool to study the dynamic ubiquitination of proteins which cellular functions are regulated by this post-translational event.

Introduction

Ubiquitination is a rapid and reversible post-translational modification involved in numerous aspects of biology. The 76-residue polypeptide ubiquitin fulfils essential functions in eukaryotes through its covalent attachment to other intracellular proteins^{1,2}. Historically, the best-characterized role for this modification is the targeting of proteins for degradation by the 26S proteasome following the transfer of an ubiquitin chain of at least four units that is referred to as poly-ubiquitination³. More recently, the addition of a single ubiquitin on one (mono-ubiquitination) or multiple (multi-ubiquitination) protein sites has been described⁴. In these cases, the post-translational modification was found to serve as a reversible signal involved in a variety of key cellular functions including intracellular signalling, sub-cellular localisation and protein–protein interactions.

Despite the growing interest raised by the diversity of cellular functions that might be influenced by ubiquitination, studies have been limited by the lack of tools allowing the monitoring of its dynamic regulation. Classically, the ubiquitination state of proteins is followed by Western blot analysis using anti-ubiquitin antibodies. Although very useful to determine whether a protein is ubiquitinated or not, these assays are poorly adapted to the dynamic nature of the ubiquitination/deubiquitination cycles. In order to monitor the ubiquitination process in living cells, we took advantage of a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) method permitting the real-time detection of protein-protein interaction *in vivo*. This technique is based on the non-radioactive transfer of energy between a luminescent energy donor (for example, *Renilla*-luciferase; *Rluc*) and a fluorescent energy acceptor (ex: a Green Fluorescent Protein; GFP). The strict dependence on molecular proximity between donor and acceptor molecules for energy transfer (<100 Å) makes it a system of choice for monitoring intermolecular interactions. This method has recently been used to study both constitutive and regulated protein-protein interactions⁵ but has never been employed to investigate post-translational modifications such as ubiquitination.

β arrestin 2 (β arrestin), a versatile adaptor protein involved in the regulation of G protein- coupled receptor (GPCR)-signaling ⁶ has recently been shown to be ubiquitinated in response to receptor activation ⁷. Based on the stability of their interaction with β arrestin, two broad classes of GPCR can be distinguished^{8,9}. GPCRs known as class A receptors (ex: the β_2 -adrenergic receptor, β_2 AR) interact only transiently with β arrestin following their activation whereas so called class B receptors (ex: the V₂-vasopressin receptor, V₂R) form stable complexes with β arrestin upon activation. Interestingly, recent findings ¹⁰ propose a link between the dynamics of β arrestin ubiquitination and the nature of its interaction with the activated receptor: a stable interaction being correlated to a sustained ubiquitination pattern whereas a transient interaction is accompanied by a short-lived ubiquitination. The existence of distinctly regulated ubiquitinated pattern of β arrestin makes it a particularly well-suited model to assess whether BRET can be used to faithfully monitor the dynamic regulation of protein ubiquitination in living cells.

Results

Ubiquitination of β arrestin monitored by BRET in living cells. As indicated in the introduction, BRET has successfully been used to assess protein-protein interactions. Since ubiquitination results from the covalent attachment of ubiquitin to a specific protein substrate, BRET should be adapted to monitor this post-translational modification in living cells. Indeed, the covalent attachment of a GFP-ubiquitin fusion protein to a substrate fused to *Renilla luciferase* (*Rluc*) should bring the *Rluc* and GFP moieties within BRET permissive distance resulting in a detectable BRET signal. To determine if BRET can be used to study ubiquitination of β arrestin, N-terminally tagged *Renilla luciferase*- β arrestin (*Rluc*- β arrestin) and green fluorescent protein-ubiquitin (GFP²-Ubi) fusion proteins were constructed. The two Lysines 48 and 63 of GFP²-Ubi were replaced by alanine residues in order to limit the formation of poly-GFP²-Ubi chains¹¹ which could cause quenching and/or interference phenomena by bringing into close proximity GFP² moieties and hence lead to a decrease BRET signal. Indeed, the transfer of energy between *Rluc* and GFP² can be initiated in cells co-expressing *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi by the addition of the luciferase substrate DeepBlueC coelenterazine that readily crosses the plasma membrane. The hydrolysis of DeepBlueC coelenterazine leads to the emission of light with a spectra that overlaps the excitation spectrum of GFP² allowing a non-radiative transfer of energy known as BRET² (Fig 1). As shown in figure 2a, co-expression of a constant level of *Rluc*- β arrestin with increasing concentration of GFP²-Ubi led to an increase of the BRET² signal. The increase in energy transfer progressed hyperbolically as a function of the GFP²-Ubi expression level, indicative of a specific interaction between the two proteins¹². The specificity of interaction was further confirmed using either a GFP²-tagged-ubiquitin mutant (GFP²-Ubi_{AA}) that cannot be used in the ubiquitination process as a result of the substitution of its last two glycines for alanine residues, or the GFP² moiety alone. Co-expression of *Rluc*- β arrestin with GFP²-Ubi_{AA} or GFP² led to a smaller signal which evolved linearly instead of hyperbolically with the increase of the fluorescence/luminescence ratio, most likely reflecting random collision (also known as bystander BRET) between

Rluc- β arrestin and these two GFP² constructs. The lack of integration of GFP²-Ubi_{AA} into proteins was corroborated by Western blot analysis of lysates derived from cells expressing GFP², GFP²-Ubi_{AA} or GFP²-Ubi. Indeed, as can be seen in fig. 2b, anti-GFP antibodies detected a smearing band above 63kDa in the lysates derived from cells expressing GFP²-Ubi that most likely reflected ubiquitination of multiple proteins. In contrast, only sharp bands that probably correspond to monomeric and multimeric forms of the GFP²-tagged-ubiquitin were observed in the lysates of GFP²-Ubi_{AA} expressing cells, confirming the lack of protein ubiquitination with this construct. The specific BRET² signal detected between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi did not result from the ubiquitination of the *Rluc* moiety of the fusion protein since no signal was detected when co-expressing GFP²-Ubi and *Rluc* alone (fig. 2a). Finally, the ability of the GFP²-Ubi protein to be attached to β arrestin was confirmed by immunoprecipitation in cells co-expressing Myc-tagged- β arrestin and GFP²-Ubi (fig. 2c). Immunoprecipitation of β arrestin followed by a Western blot analysis of the immunoprecipitate using an anti-GFP antibody revealed the presence of a GFP²-Ubi immunoreactive species that most likely reflects the ubiquitinated population of β arrestin. Taken together, these results demonstrate that the energy transfer between GFP²-Ubi/*Rluc*- β arrestin partners corresponds to a nonrandom clustering of these two proteins reflecting the covalent ubiquitination of β arrestin *in vivo*.

Detection of receptor-mediated changes in β arrestin ubiquitination. In a recent study, ex-vivo western-blot analysis suggested that GPCR activation could modulate the β arrestin ubiquitination state^{7,10}. To assess whether BRET could be used to detect receptor-regulated ubiquitination in living cells, transfer of energy between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi, was monitored in the presence of co-expressed β_2 AR and V₂R. The BRET² curves presented in figure 3a reveal that activation of each receptor with their selective agonists, isoproterenol (ISO) for the β_2 AR and arginine-vasopressin (AVP) for the V₂R, significantly increased the BRET² signal. In contrast, ligands were without effect on the bystander BRET² observed between GFP²-Ubi_{AA} and *Rluc*- β arrestin (fig. 3b), confirming the selectivity of the agonist-promoted ubiquitination observed with GFP²-Ubi. The agonist-promoted increase in BRET²

was found to be dose-dependent (fig. 3c) with EC50s of 140 and 1.8 nM for ISO and AVP respectively, consistent with the affinity of these ligands for their receptors.

Concomitant detection of β arrestin ubiquitination and its recruitment to activated receptor. Ubiquitination of β arrestin and its recruitment to GPCRs have been proposed to be regulated in a coordinated fashion following receptor activation^{10,13}. To monitor these two events simultaneously in the same cells, we took advantage of the distinct spectral properties of two luciferase substrates that allow energy transfer with different fluorescent proteins. Indeed, in addition to DeepBlueC coelenterazine, which hydrolysis leads to BRET²¹⁴ between *Rluc* and GFP², coelenterazine h displays a distinct emission spectrum that promotes an energy transfer known as BRET¹^{15,16} between *Rluc* and a distinct variant of GFP, the yellow fluorescent protein (YFP). Thus, *Rluc*- β arrestin was co-expressed with GFP²-Ubi and V₂R-YFP and cells were divided into two samples. In one sample, BRET² was used, as before, to monitor β arrestin ubiquitination by assessing the transfer of energy between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi while BRET¹ between *Rluc*- β arrestin and V₂R-YFP was measured in the second sample to monitor the recruitment of β arrestin to the receptor. As shown in figure 4, AVP stimulation promoted an increase of both BRET² and BRET¹ signals reflecting the concomitant ubiquitination (left panel) and recruitment of β arrestin (right panel). Each of the BRET signals detected was specific of the particular interaction monitored since no significant transfer of energy was observed between *Rluc* and GFP² in the presence of coelenterazine h (left panel) nor between *Rluc* and YFP in the presence of DeepBlueC coelenterazine (right panel).

Real time monitoring of distinct β arrestin ubiquitination kinetics. As mentioned in the introduction, GPCR can be distinguished in two distinct classes based on their profile of interaction with β arrestin. Whereas some receptors (ex: the V₂R) form a stable complex and remain associated with β arrestin following endocytosis, others (ex: β ₂AR) interact only transiently and dissociate rapidly from β arrestin^{8,9}. Since it has been proposed that the ubiquitination state of β arrestin is intimately linked to its interaction profile with the receptors¹⁰, the kinetics of agonist-promoted β arrestin

ubiquitination was followed in real time in cells co-expressing β_2 AR and V₂R. Both ISO and AVP induced rapid and similar increases in the BRET-detected ubiquitination of β arrestin that reached a peak at 2 minutes following activation (fig. 5). The evolution of β arrestin ubiquitination patterns then diverged, depending on the identity of the receptor activated. While it remained stable for at least 10 minutes following V₂R activation (fig. 5b and c), it progressively returned toward basal values after activation of the β_2 AR (fig. 5a and c). This reduction in BRET signal most likely reflects a deubiquitination process and cannot be attributed to a degradation of β arrestin. Indeed, BRET being a ratio-metric measurement (GFP² emission over Rluc emission), the decrease in luminescence resulting from a degradation of Rluc- β arrestin would lead to an equivalent reduction in the transfer of energy to the acceptor fluorophore and thus would not affect the BRET signal. These results therefore confirm that in living cells, the dynamics of β arrestin ubiquitination is determined by the nature of the activated receptor.

Discussion

The aim of this study was to adapt an energy transfer method for the detection of protein ubiquitination in living cells. Using β arrestin as a model, we demonstrate that BRET can specifically detect both basal and dynamically regulated ubiquitination processes. Compared to the classical western blot analysis, the use of BRET presents several advantages: 1) because the BRET assay is carried out in living cells, it avoids the possible signal alterations that could result from cell lysis, protein solubilisation or any purification steps needed before the Western blot analysis, 2) the ability to follow the evolution of the BRET signal in real time allows to capture the dynamic nature of the ubiquitination process, 3) changes in ubiquitination levels resulting from specific treatments can be monitored in the same population of cells using BRET whereas distinct pool of cells need to be used to analyze such changes by Western blot analysis, 4) because of the ratio-metric nature of the BRET technique, a reduction in signal truly represents a decrease in ubiquitination and cannot result from a degradation of the ubiquitinated protein target.

BRET being a proximity-based assay that had been previously used to detect non-covalent protein-protein interactions, it was important to validate that the BRET detected between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi truly reflects the covalent attachment of the ubiquitin moiety. This was achieved by comparing the BRET signals obtained between *Rluc*- β arrestin and either GFP²-Ubi, the GFP²-Ubi_{AA} mutant, which is unable to be covalently attached to a protein, or the GFP² moiety alone. The BRET signal obtained between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi increased hyperbolically with increasing concentration of GFP²-Ubi before reaching a plateau once the covalent attachment of ubiquitin to *Rluc*- β arrestin attained the maximal steady state. In contrast, the smaller and linear BRET signal obtained between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi_{AA} or GFP² most likely resulted from random collisions between the two proteins, a phenomenon known as bystander BRET¹². Since the Ubi_{AA} construct is not incorporated in proteins, the concentration of free GFP²-Ubi_{AA} available for random collision is expected to be equivalent to the one reached with the expression

of GFP² moiety alone, for similar amount of fluorescence. In both cases, the level of fluorescent proteins involved in random collision events should be much higher than the one attained with GFP²-Ubi for equivalent GFP² construct expression. It follows that the bystander BRET component of the hyperbolic signal observed between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi should be much smaller than the one observed with GFP²-Ubi_{AA} or GFP². This is illustrated by the very low signal obtained between *Rluc* moiety alone and GFP²-Ubi protein compared to the one obtained between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi_{AA} or GFP². This makes GFP²-Ubi_{AA} a very stringent control that can be confidently used to distinguish between collisional protein-protein interactions and covalent ubiquitination of a specific substrate.

Both BRET and immunoprecipitation approaches indicated that β arrestin undergoes basal ubiquitination to a significant extent. This may appear somewhat different from the report of Shenoy et al.^{7,10} in which ubiquitination of β arrestin resulted mainly from receptor activation with very little basal ubiquitination being detected. The specific reason for this apparent difference is not known but certainly pertains to the experimental conditions used. For instance, distinct receptor expression levels between the two studies could lead to different level of spontaneous signaling activity resulting in distinct levels of basal ubiquitination. Also, the addition of exogenous ubiquitin in the form of GFP²-Ubi could favor the ubiquitination reaction. Finally, one cannot exclude the possibility that the use of the *Rluc*- β arrestin fusion protein could favor a constitutive ubiquitination reaction. In any case, a significant receptor-promoted increase in ubiquitination could be observed despite the presence of a basal signal validating the usefulness of the assay.

Indeed, an important aspect of the BRET-based method is its ability to detect dynamic changes in the ubiquitination state of the substrate considered and to monitor their evolution in time. Interestingly, distinct kinetics of β arrestin ubiquitination resulting from the activation of different GPCRs were observed with the ubiquitination BRET assay. Activation of the β_2 AR induced a fleeting β arrestin ubiquitination whereas a long lasting ubiquitination of the regulatory protein was

observed following activation of the V₂R. This is consistent with a previous study examining the ubiquitination status of β arrestin at 1 and 15 minutes following receptor stimulation¹⁰. However, since β arrestin is recruited to the activated receptor upon agonist stimulation, the detected increase in ubiquitination BRET signal could result from the ubiquitination of the receptor itself. To rule out this possibility, we showed that no modulation of BRET was observed between β 2AR-*Rluc* or V2R-*Rluc* and GFP²-Ubi upon short agonist stimulation (fig. S1). Hence, the distinct kinetics of β arrestin ubiquitination that could be followed in real time, within the same cells, provide a proof of principle that the BRET assay can faithfully reflect rapid and differential changes occurring following specific stimuli.

As indicated previously, the GFP²-Ubi construct used for the BRET experiments lacked the two major sites supporting polyubiquitination in mammals (K48 and K63) to prevent the formation of GFP strings that could interfere with the energy transfer process. Despite the constraint that such a construct could impose on the system, ubiquitination of a protein such as β arrestin, which is believed to be polyubiquitinated^{7,10}, could be readily observed. This may not be surprising given that the process of polyubiquitination should permit the attachment of the GFP²-Ubi through its terminal glycine to either β arrestin targeted lysine(s) or to growing chains of endogenous ubiquitin. Since the use of the GFP²-Ubi construct (lacking the polyubiquitination sites K48 and K63) could however interfere with the properties of ubiquitinated proteins, we compared the ubiquitination BRET signal obtained with this construct to the one monitored with a wild type GFP²-Ubi construct (GFP²-Ubi_{WT}). As expected, a hyperbolic and specific, but lower BRET signal was detected between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi_{WT} compared to the one obtained with GFP²-Ubi (fig S2a). Despite the lower absolute BRET signal observed with GFP²-Ubi_{WT}, similar BRET modulations were observed with both GFP²-Ubi and GFP²-Ubi_{WT} constructs following agonist stimulation (fig. S2b and c). This indicates that the use of GFP²-Ubi do not, *per se*, interfere with the quality of the results obtained but allows an easier detection of BRET signal changes due to the larger absolute values.

The fact that GFP²-Ubi_{WT} could be used for ubiquitination BRET assay makes the method more broadly applicable.

Besides its usefulness in directly monitoring protein ubiquitination, the BRET assay offers the possibility of concomitant detection of additional protein interactions involving the ubiquitinated protein. Taking advantage of two spectrally distinct coelenterazines, we demonstrated the feasibility of such dual detection by following both the ubiquitination of β arrestin and its recruitment to the V₂R in the same cells.

In addition to shed new light on the dynamics of β arrestin ubiquitination in living cells, our study represent a proof of principle that resonance energy transfer approaches can be successfully used to monitor ubiquitin attachment in real time. BRET and possibly FRET could therefore be used to study the ubiquitination of various proteins which activity and fate are regulated by this post-translational modification. Studies on the growing list of ubiquitin-like proteins that regulate diverse cellular functions through their covalent attachment to specific protein substrates could also benefit from the advance of ubiquitination BRET assay.

Methods

Plasmids. The *Rluc*- β arrestin construct was generated as previously described¹⁷ by fusing the *Rluc* coding sequence in frame to the N-terminus of the rat β arrestin2 into pcDNA3.1. pGFP²-Ubi was constructed as follow: human ubiquitin was amplified by PCR from a pQE32-Ubi plasmid and sub-cloned into pGFP²-C1 (PerkinElmer BioSignal, Montreal CA) using Bsp1407 and EcoRI restriction sites to produce a wild type GFP²-Ubi (GFP²-Ubi_{WT}) construct. Ubiquitin was then mutated by PCR overlap on lysine 48 and 63 into alanines to avoid polyubiquitination of the GFP²-Ubi itself. GFP²-Ubi_{AA} plasmid was constructed by amplifying ubiquitin with primers containing the mutation of the two C-terminal glycines (G₇₅ and G₇₆) into alanines in order to remove the two sites that are believed to be responsible of the isopeptide linkage to a substrate lysine residue^{18,19}. The PCR product was sub-cloned into pGFP²-C1 using Bsp1407 and Hind III restriction sites. pcDNA3.1-HA-tagged- β ₂AR, pcDNA3.1Myc-tagged-V₂R and pRK5-V₂R-YFP have been previously described^{13,20,21}. pCMV-Myc-tagged- β arrestin2 was a kind gift from Stephano Marullo's laboratory.

Cell culture and transfection. HEK293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine (all from Wisent, St Bruno CA) and cultured at 37°C in 5 % CO₂. Cells were seeded 24 h before transfection that were performed using the calcium phosphate precipitation method²². Twenty-four hours after transfection, supplemented DMEM was renewed and cells cultured for an additional 24 h.

BRET measurement. Transfected cells were washed twice with PBS, detached in PBS/EDTA and resuspended in PBS/0.1% glucose. Cell number was determined by measuring protein concentration using the D_C protein assay kit (Bio-Rad, Mississauga CA). Freshly dispersed cells were then used for BRET measurements.

BRET measurements were obtained using two different sets of energy transfer partners. Energy transfer known as BRET², between *Rluc* and GFP² ¹⁴, was determined following the addition of the *Rluc* substrate, DeepBlueC coelenterazine (BioSignal Packard, Montreal, QC) whereas BRET¹, between *Rluc* and YFP ^{15,16}, was assessed in the presence of another *Rluc* substrate, coelenterazine h.

BRET² monitoring of β arrestin ubiquitination. Cells co-expressing Myc-tagged-V₂R, HA-tagged- β ₂AR, *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi constructs were distributed in white 96-well Assay Microplates (Corning, NY) at a density of 100,000 cells/well. BRET² measurements were collected 20 s following the addition of the luciferase substrate, DeepBlueC coelenterazine, at a final concentration of 5 μ M. Readings were obtained using a modified TopCount NXTTM instrument (Packard Bioscience) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370–450 and 500–530 nm windows using filters with the appropriate band pass (Chroma). BRET² signal corresponds to the ratio of the light emitted by the GFP² (500–530 nm) over the light emitted by the *Rluc* (370–450 nm). The values were corrected by subtracting the background ratio value detected when the *Rluc* constructs were expressed alone. For titration experiments, BRET signal is plotted as a function of the total fluorescence signal over the total luminescence signal (see below), a ratio used as an index of the concentration of GFP²-Ubi (or GFP²-Ubi_{AA}) expressed.

BRET¹ monitoring of β arrestin recruitment to the V₂R receptor. Cells co-expressing *Rluc*- β arrestin, GFP₂-Ubi and V₂R-YFP were divided in two groups. While BRET² was used, as described above, to monitor β arrestin ubiquitination, BRET¹ between *Rluc*- β arrestin and V₂R-YFP was initiated by the addition of 5 μ M coelenterazine h and used to monitor the recruitment of β arrestin to the receptor. Readings were collected following the addition of AVP 1 μ M using the Mithras LB 940 instrument from Berthold technologies. Emissions at 460-500 nm and 510-550 nm were recorded using the appropriate filters (F485/F530). Results were analyzed as described above by calculating the ratio of the light emitted by the YFP (510-550 nm) over the light emitted by the *Rluc* (460-500 nm). The values were corrected by

subtracting the background ratio value detected when the *Rluc* constructs were expressed alone.

Total fluorescence and luminescence measurements. As described by Mercier and *al.* (ref. 12), cells were dispersed in 96 well plates (white Costar plate with clear bottom) at a density of 100,000 cells per well. Total fluorescence of cells was measured in a Fluorocount (Packard Bioscience) using an excitation filter at 400 nM and an emission filter at 510 nM in the case of the GFP², or an excitation filter at 485 nM and an emission filter at 530 nM in the case of the YFP. The same cells were then incubated for 10 min with coelenterazine h in order to measure the total luminescence using a LumiCount instrument (Packard Bioscience). In the case of fluorescence, background value detected in untransfected cells was subtracted to give a specific fluorescence value. In the case of luminescence, background being negligible, absolute values were used. Ratio of total fluorescence over total luminescence were then calculated and used as an index of the relative expression of the BRET partners.

Immunoblotting and Immunoprecipitation. Cells expressing pcDNA₃, GFP²-Ubi_{AA} or GFP²-Ubi were solubilized in lysis buffer A containing 50 mM HEPES (pH7.5), 0.5 % Nonidet P-40, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % (v/v) glycerol, NEM 5 mM, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 100 µM benzamidine. Ten µg of proteins were separated on a 12% SDS-PAGE acrylamide gel and transferred to nitrocellulose for immunoblotting. Immunoreactivity was revealed using a rabbit monoclonal antibody raised against GFP (Clontech, Mississauga CA and a HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (Amersham) and the NEN chemiluminescence kit (PerkinElmer, Woodbridge CA). For immunoprecipitation experiments, cells expressing or not pCVM-Myc-tagged- β arrestin2 and pGFP²-Ubi were washed three times with ice cold PBS and lysed in buffer A for 30 min under rocking at 4°C. Equivalent amount of soluble extracts assessed using D_C protein assay kit, were incubated with an anti-Myc 9E10 monoclonal antibody and Protein G agarose beads over night at 4°C under rotation.

Bound extracts were washed three times with buffer A and eluted in sample buffer at 50°C for 30 min. Samples were then resolved on 10% SDS-PAGE electrophoresis gel and transferred on nitrocellulose. Basal GFP²-Ubi association to the Myc-tagged- β arrestin2 was revealed as described above using a rabbit monoclonal anti-GFP antibody. Amount of Myc-tagged- β arrestin2 in each condition was controlled a rabbit polyclonal anti-Myc antibody (Santacruz).

Acknowledgments

The authors are grateful to Alexis Vallée-Bélisle and Stephen Michnick for providing the plasmid pQE32-Ubi and to Stephano Marullo for providing the pCMV-Myc-tagged- β arrestin2 plasmid. This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research. J.P. holds a fellowship from EMBO and M.B. is a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

References

1. Ciechanover,A., Orian,A. & Schwartz,A.L. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J. Cell Biochem. Suppl* 34, 40-51 (2000).
2. Passmore,L.A. & Barford,D. Getting into position: The catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J. Pt*, (2004).
3. Hochstrasser,M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30, 405-439 (1996).
4. Schnell,J.D. & Hicke,L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 35857-35860 (2003).
5. Eidne,K.A., Kroeger,K.M. & Hanyaloglu,A.C. Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol. Metab* 13, 415-421 (2002).
6. Wojcikiewicz,R.J. Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 35-41 (2004).
7. Shenoy,S.K., McDonald,P.H., Kohout,T.A. & Lefkowitz,R.J. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307-1313 (2001).
8. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S. & Caron,M.G. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 274, 32248-32257 (1999).
9. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Caron,M.G. & Barak,L.S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 17201-17210 (2000).

10. Shenoy,S.K. & Lefkowitz,R.J. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* 278, 14498-14506 (2003).
11. Patrick,G.N., Bingol,B., Weld,H.A. & Schuman,E.M. Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr. Biol.* 13, 2073-2081 (2003).
12. Mercier,J.F., Salahpour,A., Angers,S., Breit,A. & Bouvier,M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 277, 44925-44931 (2002).
13. Lavoie,C. *et al.* Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J. Biol. Chem.* 277, 35402-35410 (2002).
14. Jensen,A.A., Hansen,J.L., Sheikh,S.P. & Brauner-Osborne,H. Probing intermolecular protein-protein interactions in the calcium-sensing receptor homodimer using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Eur. J. Biochem.* 269, 5076-5087 (2002).
15. Angers,S. *et al.* 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 (2000).
16. Xu,Y., Piston,D.W. & Johnson,C.H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 151-156 (1999).
17. Perroy,J., Adam,L., Qanbar,R., Chenier,S. & Bouvier,M. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* 22, 3816-3824 (2003).
18. Haas,A.L., Murphy,K.E. & Bright,P.M. The inactivation of ubiquitin accounts for the inability to demonstrate ATP, ubiquitin-dependent proteolysis in liver extracts. *J. Biol. Chem.* 260, 4694-4703 (1985).

19. Wilkinson,K.D. & Audhya,T.K. Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires ubiquitin with the COOH-terminal sequence Arg-Gly-Gly. *J. Biol. Chem.* 256, 9235-9241 (1981).
20. Morello,J.P. *et al.* Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest* 105, 887-895 (2000).
21. Terrillon,S. *et al.* Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive. *Mol. Endocrinol.* 17, 677-691 (2003).
22. Mellon,P., Parker,V., Gluzman,Y. & Maniatis,T. Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell* 27, 279-288 (1981).

Figures

Figure 1. *Schematic representation of the β arrestin ubiquitination BRET² assay.* Upon degradation of its catalytic substrate (DeepBlueC coelenterazine), the Rluc fused to the N-terminus of β arrestin emits a blue light with an emission peak at 395 nm. If the β arrestin is ubiquitinated, a non-radiative transfer of energy will occur between Rluc and the GFP² fused to the N-terminus of ubiquitin, resulting in reemission of light with an emission peak at 510 nm.

Figure 2. *Specific BRET² signal between Rluc- β arrestin and GFP²-Ubi.* a) HEK-293 Cells were co-transfected with constant concentrations of Rluc- β arrestin, Myc-tagged-V₂R and HA-tagged- β ₂AR DNA constructs and increasing concentrations of GFP²-Ubi (\blacktriangle) or GFP²-Ubi_{AA} (\bullet) or GFP² (\diamond) encoding plasmids or with a constant concentration of Rluc and increasing concentrations of GFP²-Ubi DNAs (\blacksquare). The data shown represent pooled individual readings obtained from 5 to 8 independent experiments. The curves were fitted using a non-linear regression equation, assuming a single binding site (GraphPad Prism). b) Lysates obtained from mocked transfected HEK-293 cells or cells expressing either pGFP², pGFP²-Ubi_{AA} or pGFP²-Ubi were resolved by SDS-page and the attachment of ubiquitin to proteins assessed by Western blotting using an anti-GFP antibody. Numbers on the right indicate molecular weight of protein markers. The blot shown is representative of two independent experiments. c) Immunoprecipitation with an anti-Myc antibody was performed on lysates derived from cells expressing pGFP²-Ubi or pGFP²-Ubi and pCMV-Myc-tagged- β arrestin. GFP²-Ubi protein associated to the immunoprecipitated β arrestin was revealed as in b) with an anti-GFP antibody whereas amount of β arrestin immunoprecipitated was controlled with anti-Myc antibody.

Figure 3. *Detection of GPCR-induced β arrestin ubiquitination.* Cells co-transfected with a constant concentration of Rluc- β arrestin, Myc-tagged-V₂R and HA-

tagged- β_2 AR plasmids and increasing concentrations of GFP²-Ubi (a) or GFP²-Ubi_{AA} (b) constructs were stimulated or not (\blacktriangle) with ISO 10^{-5} M (\diamond) or AVP 10^{-6} M (\circ) for 120 s before BRET measurement. DeepBlueC coelenterazine was added in the continuous presence of the agonists and the BRET measurements were taken 20 s following the luciferase substrate addition. The data shown represent pooled individual readings obtained from 3 independent experiments. c) Cells expressing the same construct as in a) and displaying a GFP²-Ubi/*Rluc*- β arrestin expression ratio of 0.1 ± 0.005 (as assessed by measuring total fluorescence and luminescence signals) were stimulated with increasing concentration of ISO (left panel) or AVP (right panel) for 120 s. BRET measurements were then collected as in a). The curves shown represent the mean \pm S.E. of three independent experiments.

Figure 4. Cells co-transfected with *Rluc*- β arrestin, V₂R-YFP and GFP²-Ubi were stimulated with 1 μ M AVP or vehicle, for 10 minutes. DeepBlueC coelenterazine (BRET²; left panel) or coelenterazine h (BRET¹; right panel) were then added in the continuous presence of the agonist and BRET measurements collected 20 s following the addition of the luciferase substrate to monitor *Rluc*- β arrestin ubiquitination or its recruitment to V₂R-YFP respectively. Bar graphs shown represent the mean \pm S.E. of three independent experiments. The lack of cross-talk between BRET1 and BRET 2 in the same samples was verified by measuring the BRET signal between *Rluc*- β arrestin and GFP²-Ubi in the presence of coelenterazine h for BRET² and between *Rluc*- β arrestin and V₂R-YFP in the presence of DeepBlueC for BRET¹. Virtually no cross-talk signal was observed (right side of each panel). Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's t-test. (*) indicates $p < 0.05$.

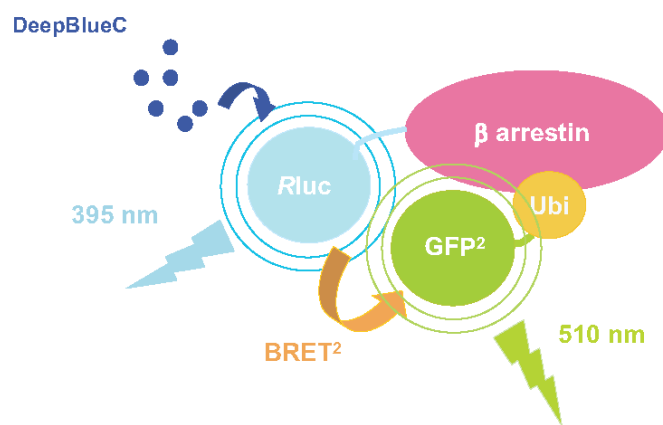
Figure 5. *Real-time assessment of receptor stimulated β arrestin ubiquitination.* Cells co-transfected with *Rluc*- β arrestin, Myc-tagged-V₂R, HA-tagged- β_2 AR and GFP²-Ubi (GFP²-Ubi over *Rluc*- β arrestin ratio of 0.1 ± 0.005) constructs, were incubated in the presence of DeepBlueC coelenterazine immediately before

stimulation with ISO 10^{-5} M (\diamond ; a and c) or AVP 10^{-6} M (\bullet ; b and c). BRET² measurements were then collected immediately every 10 seconds in the continued presence of the agonists for 10 minutes. a) and b) The real-time agonist-promoted increases in BRET are represented as the difference in the absolute BRET values obtained in the presence and in the absences of ISO or AVP. c) Compilation of three independent experiments carried out as in a) and b). The data shown represent the mean \pm S.E. and are expressed in percentage of the maximal BRET² signal obtained for each curve.

Figure S1. Cells co-transfected with a constant concentration of pcDNA3.1- β_2 AR-Rluc (a) or pcDNA3.1-Myc-tagged-V₂R-Rluc plasmids (b) and increasing concentrations of GFP²-Ubi constructs were stimulated or not with ISO 10^{-5} M AVP 10^{-6} M for 60 s before BRET measurement. DeepBlueC coelenterazine was added in the continuous presence of the agonists and the BRET measurements were taken 20 s following the luciferase substrate addition. The data shown represent pooled individual readings obtained from 3 independent experiments.

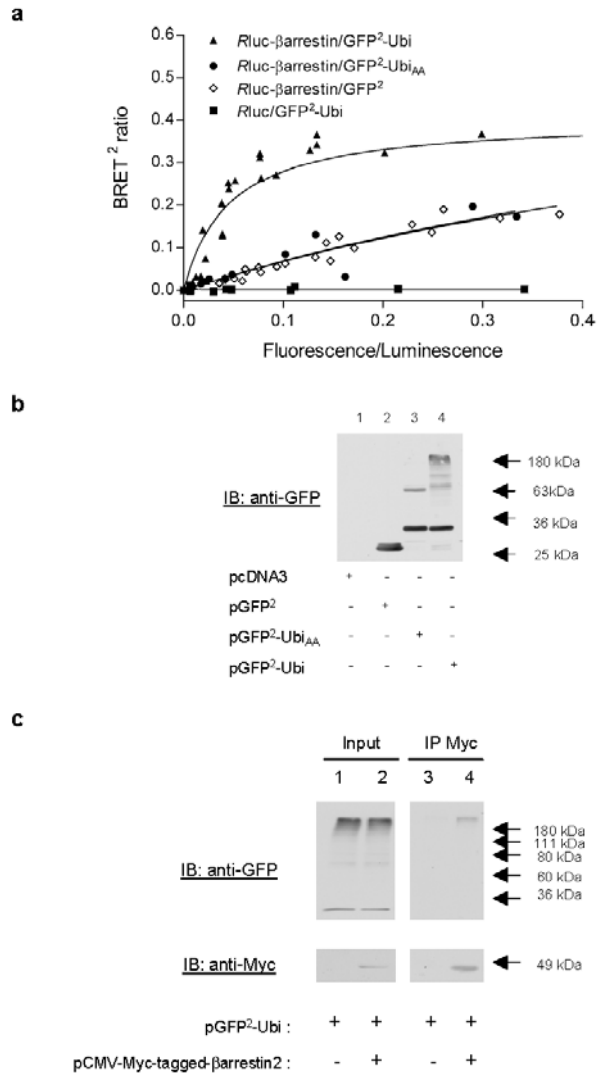
Figure S2. a) Cells were co-transfected with constant concentrations of Rluc- β arrestin, Myc-tagged-V₂R and HA-tagged- β_2 AR DNA constructs and increasing concentrations of GFP²-Ubi (\blacktriangle) or wild type GFP²-Ubi (GFP²-Ubi_{WT}) (\blacksquare) encoding plasmids. The data shown represent pooled individual readings obtained from 3 independent experiments. The curves were fitted using a non-linear regression equation, assuming a single binding site (GraphPad Prism). b) and c) Cells expressing the same construct as in a) and displaying a fluorescence/luminescence expression ratio of 0.1 ± 0.005 were stimulated with ISO 10^{-5} M or AVP 10^{-6} M for 120 s before BRET measurement. Data represent the mean \pm S.E. of 4 independent experiments monitoring the agonist effect on the absolute BRET values obtained between Rluc- β arrestin and GFP²-Ubi_{WT} (b) or GFP²-Ubi (c). One way ANOVA test were performed using GraphPad Prism software and (*) indicates $p < 0.05$.

Figure 1



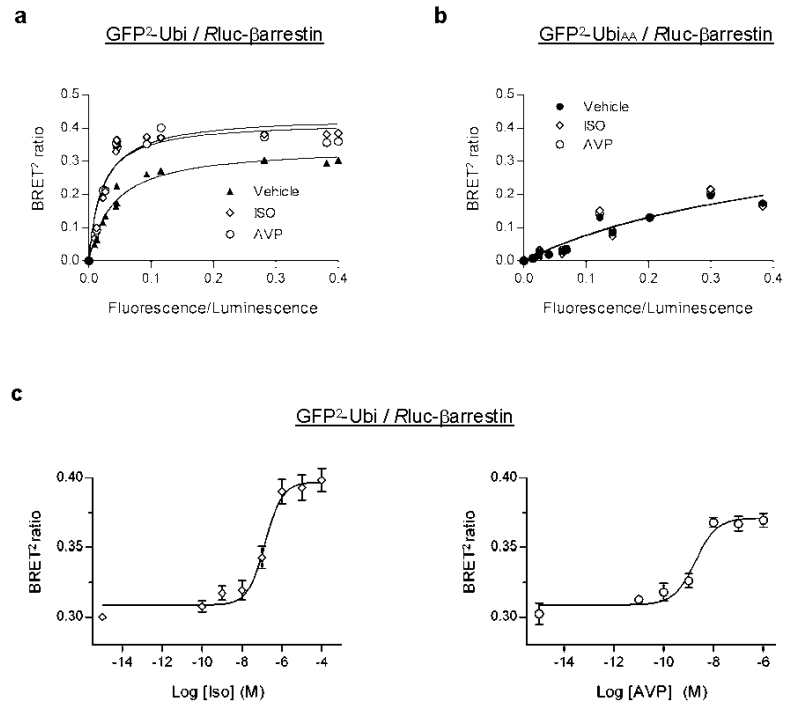
Perroy J & al. Monitoring ubiquitination by BRET

Figure 2



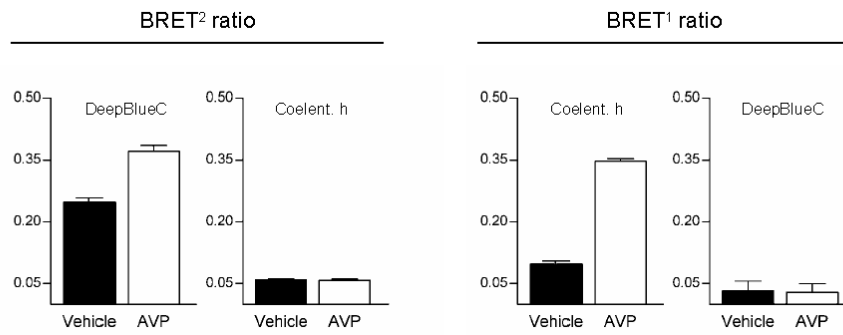
Perroy J & *al.* Monitoring ubiquitination by BRET

Figure 3



Perroy J & *al.* Monitoring ubiquitination by BRET

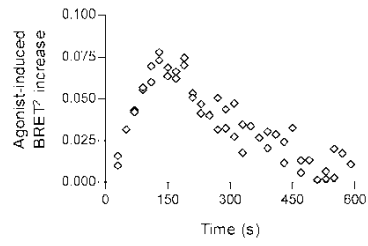
Figure 4



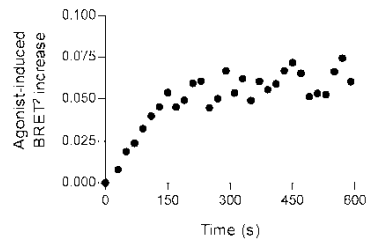
Perroy J & *al.* Monitoring ubiquitination by BRET

Figure 5

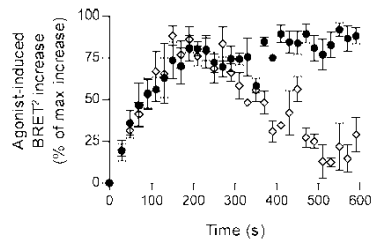
a



b

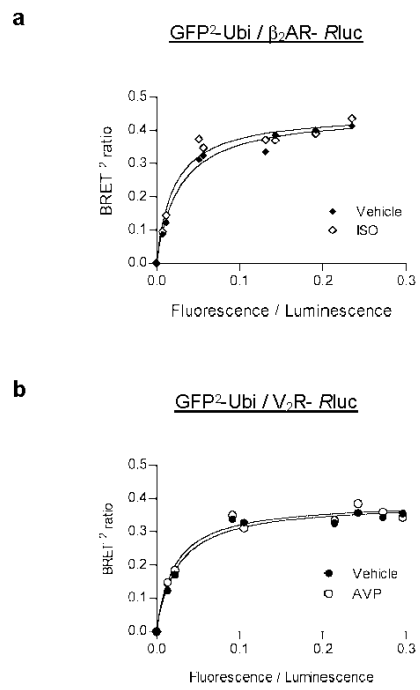


c



Perroy J & *al.* Monitoring ubiquitination by BRET

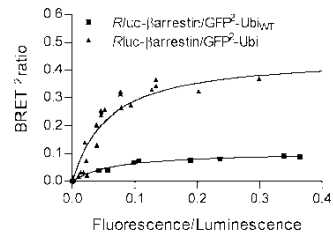
Figure S1 (Supplementary Data)



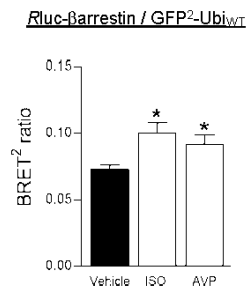
Perroy J & *al.* Monitoring ubiquitination by BRET

Figure S2 (Supplementary Data)

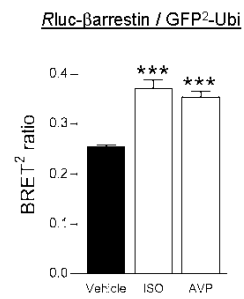
a



b



c



Perroy J & *a/*. Monitoring ubiquitination by BRET

DISCUSSION GENERALE

Le développement des connaissances concernant la signalisation cellulaire a mis en exergue l'incroyable complexité des phénomènes de transfert d'information intracellulaire. Le cas des GPCR illustre parfaitement cette évolution. Le modèle décrivant l'interaction d'un récepteur fidèlement couplé à une protéine G et par son intermédiaire à un effecteur spécifique, a été transformé en un schéma bien moins linéaire. Dans ce cas, le récepteur qui adopte un état dimérique constitutif, s'associe éventuellement avec d'autres récepteurs formant rangs de dimères ou autres hétérodimères et est couplé à différentes protéines G par l'intermédiaire desquelles il initie l'activation de plusieurs effecteurs. A cette vision simpliste vient en outre s'ajouter la capacité de ce récepteur dimérique de coupler certaines voies de signalisation indépendamment des protéines G et stimuler de manière directe des récepteurs de nature différente, tel que les RTK par exemple.

Dans ce contexte, la vision d'une membrane ou d'un cytosol fluides dans lesquels flotteraient joyeusement les protéines impliquées dans la signalisation tout en interagissant avec leurs différents partenaires au grès des courants, semble particulièrement inappropriée. Ce paradoxe entre la complexité des réseaux de signalisation et le manque apparent pour la cellule d'outils permettant de contrôler la fidélité et la précision de la composition des complexes protéiques a donc conduit au développement du concept de compartimentation. En dehors des processus assurant la compartimentation, membranaire, dans le cas des récepteurs membranaires, d'autres mécanismes participent également à la régulation de la composition des complexes protéiques. Ils concernent la modulation des interactions protéiques par des protéines dévouées à en réguler la dynamique par exemple ou encore par des phénomènes de modification post-traductionnelle qui aboutissent à en modifier les caractéristiques.

Les différentes publications présentées dans ce travail s'intéressent donc à certains des processus visant à contrôler la composition des complexes protéiques

impliqués dans la signalisation des GPCR. La publication N°1 concernait le rôle des rafts dans la signalisation du β 2AR. La modulation des interactions protéiques par l'intermédiaire de la protéine chaperone NSF et du rôle de son interaction avec le récepteur GABA_B faisait l'objet de la publication N°2. Finalement, la problématique de la publication N°3 tournait autour du rôle de l'ubiquitination dans la modulation des capacités de liaison de la β arrestine et du développement d'une méthode permettant d'en suivre l'évolution dynamique.

LE RÔLE DES RAFTS DANS LA SIGNALISATION

LE CAS DU RÉCEPTEUR β 2-ADRÉNERGIQUE

En théorie, la co-compartimentation des protéines impliquées dans une voie de signalisation donnée, devrait favoriser l'efficacité de transfert du signal.

Défiant ce prédicat logique, la co-localisation préférentielle du récepteur β 2AR et de ses partenaires de signalisation, la protéine Gs ou encore l'adénylyl cyclase dans les caveolae (Rybin et al., 2000; Xiang et al., 2002a) s'accompagne d'un couplage restreint entre le récepteur et l'adénylyl cyclase (Laflamme and Becker, 1998) dans le coeur. Ces données suggèreraient donc que la présence du récepteur dans ces microdomaines inhibe son activité. L'augmentation de couplage observée à l'issue d'une déplétion en cholestérol réalisée avec de la filipin ou encore de la cyclodextrine confirme cette idée (Rybin et al., 2000; Xiang et al., 2002a).

Les résultats présentés dans la publication N°1 corréleront parfaitement l'ensemble de ces observations. La déplétion en cholestérol effectuée avec de la cyclodextrine ou encore de la cholestérol oxydase (données non présentées) conduit ainsi à une nette augmentation de l'efficacité de couplage du récepteur à l'AC. En outre, la technique de purification préalablement employée sur des cardiomyocytes (Technique de Song) permet d'observer dans des cellules HEK293 un co-fractionnement du récepteur, de la Gs et de l'AC dans des fractions enrichies en marqueurs de raft, la flottiline ou le lipide GM1.

Le parallèle prend néanmoins fin avec l'absence de co-localisation entre le récepteur et le lipide GM1. Le lipide GM1 n'étant pas nécessairement enrichi dans tous les types de rafts, ces données pourraient avoir deux significations différentes : 1) le récepteur n'est pas localisé dans des microdomaines membranaires, 2) le récepteur est localisé dans des microdomaines de nature différente des rafts contenant GM1. Dans tous les cas, cette analyse nous a conduit à caractériser plus avant l'association du récepteur, de Gs et de l'AC aux rafts. L'utilisation d'une technique de purification reposant sur la résistance au TritonX100 a ainsi mis clairement en évidence les propriétés distinctes d'association de ces trois protéines aux rafts résistants aux détergeants. Si une proportion significative de Gs et d'AC se distribue dans les fractions légères résistantes au Triton, la quasi totalité du récepteur est solubilisée. Ces résultats suggèrent donc fortement que le récepteur et ses partenaires de signalisation présentent une distribution membranaire latérale différente dans notre système d'étude.

La perturbation de l'intégrité des rafts à l'aide de cyclodextrine, induirait la libération à l'état basal d'un nouveau pool de G α s et d'AC et conduirait à l'augmentation de l'efficacité maximale de couplage du récepteur. Ce modèle serait en outre consistant non seulement avec l'augmentation de l'activité cyclase basale mais aussi avec celle de l'activité de la PKA, ce dernier phénomène conduisant à la phosphorylation du β 2AR. En défavorisant l'adoption par le récepteur d'une conformation présentant une haute affinité pour la protéine G, PKA limite ainsi l'augmentation détectée du couplage du récepteur à la cyclase. Cette analyse qui est consistante avec l'implication de PKA dans les mécanismes classiques de désensibilisation fonctionnelle du récepteur, est supportée par le comportement du récepteur β 2AR muté au niveau de ses sites PKA. A l'issue d'une déplétion en cholestérol, la conformation de haute affinité du récepteur pour sa protéine G n'est pas modifiée, tandis que son couplage à l'AC est augmenté de façon supérieure à celui du récepteur sauvage.

La compartimentation membranaire différentielle du β 2AR et de ses partenaires de signalisation mènerait ainsi à la formation d'un pool de réserve d'effecteurs du récepteur dont la disponibilité basale serait régulée par la concentration membranaire

en cholestérol. La modulation de cette dernière en conditions physio-pathologiques pourrait avoir des conséquences importantes concernant l'efficacité de signalisation du récepteur.

En soulignant à nouveau la difficulté d'établir expérimentalement la présence d'une protéine dans des microdomaines membranaires, cette étude illustre néanmoins l'importance de la compartimentation différentielle des protéines de la signalisation dans la spécificité de couplage d'un récepteur. Que sa localisation soit ou non latéralement restreinte, les propriétés de couplage du β 2AR sont dépendantes de l'intégrité des microdomaines enrichis en cholestérol dans la membrane.

D'AUTRES RÉCEPTEURS

La signalisation des récepteurs dopaminergiques (Li et al., 2000), CXCR1 (Jiao et al., 2005), OR (Fig 19) (Rimoldi et al., 2003), B2R (Hur et al., 2004) ou encore CaR (Hjalm et al., 2001) semble également fortement influencée par leur éventuelle présence dans les rafts. Cette localisation s'accompagnerait ainsi d'un couplage spécifique aux protéines G ou à des voies de signalisation particulières. La présence dans les rafts des récepteurs de l'EGF (Fig 21), du TGF β , de l'insuline (Fig 20) ainsi que des récepteurs impliqués dans la réaction lymphocytaires, le Fc ϵ RI, le TCR ou encore le TNFR (Fig 18) semble également jouer un rôle régulateur essentiel dans la formation de complexes de signalisation qui leur sont associés.

De manière intéressante, plusieurs de ces exemples illustrent l'inadéquation existante entre perturbation de la compartimentation et perte de l'efficacité de la signalisation. Les cas de l'OR ou du TNFR sont particulièrement parlant à ce titre. Dans le contexte des rafts, chacun de ces récepteurs présente une affinité supérieure vis à vis d'une voie de signalisation donnée. Leur délocalisation ne s'accompagne cependant pas d'une perte de signal mais au contraire de l'association à une voie aux propriétés distinctes. A la lumière de ces considérations, l'idée d'un rôle inhibiteur des microdomaines dans la régulation de la signalisation pourrait ainsi être réévaluée. La méconnaissance éventuelle de la diversité des voies de signalisation associées à un

récepteur pourrait en effet mener à l'idée éronnée qu'il adopte une conformation inactive au sein des microdomaines. La définition de conformation inactive s'avérant relever d'un concept particulièrement relatif, les exemples de l'EGFR (Mineo et al., 1999) ou encore de la rhodopsine (Mitchell et al., 1990) pour lesquels la présence dans les rafts est perçue comme restrictive quant à leur activité, pourrait ainsi être revisités avec surprise.

LE POINT DE VUE PHARMACOLOGIQUE

La rigidité de l'environnement membranaire correspondant aux microdomaines de type raft pourrait ainsi limiter considérablement la diversité des conformations adoptées par un récepteur donné et constituer un frein mécanique à certains mouvements allostériques. Ce faisant, la localisation différentielle d'un récepteur dans divers compartiments membranaires menerait à la formation de sous populations de ce dernier caractérisées par des champs allostériques distincts et des affinités spécifiques vis à vis de divers ligands. La localisation des récepteurs membranaires dans les rafts ou dans des microdomaines associés pourrait par exemple expliquer certaines des conséquences fonctionnelles observées avec les agonistes inverses (Audet et al., 2005; Azzi et al., 2003; Reversi et al., 2005; Wei et al., 2003). En favorisant certaines conformations d'un récepteur donné, un ligand pourraient en retour modifier l'affinité d'un récepteur pour des structures membranaires spécifiques. L'exemple de l'EGFR est encore une fois très éclairant à ce sujet. Il a été proposé que sa présence dans les rafts s'accompagne d'une conformation défavorisant sa dimérisation (Mineo et al., 1999) et son affinité vis à vis de l'EGF (Pike, 2003). Comme nous l'avons vu, en fonction de la concentration d'EGF, le récepteur est internalisé par l'intermédiaire des puits recouverts de clathrine ou encore par une voie dépendante de la cavéoline (Chen and De Camilli, 2005; Sigismund et al., 2005) (Fig 23). Ces deux comportements différents reflètent fort probablement l'association du récepteur à des complexes moléculaires distincts, comme l'indique la relation entre son ubiquitination, la liaison directe aux protéines Cbl et Eps15 (de Melker et al., 2004a; de Melker et al., 2004b) et son internalisation par les caveolae (Sigismund et

al., 2005). La diminution de l'affinité de l'EGFR pour l'EGF dans le contexte des rafts, pourrait ainsi expliquer pourquoi de fortes concentrations d'EGF sont nécessaires à l'induction de la voie d'internalisation par les caveolae et à son ultime dégradation. Cette idée est consistante avec la nécessité pour plusieurs récepteurs (EGF, Insulin ou encore TCR) ou protéines telles que H-ras, de sortir des rafts à l'issue de leur activation (Mineo et al., 1996; Roy et al., 2002) et d'internaliser par l'intermédiaire des puits recouverts de clathrine (Ceresa et al., 1998; Roy et al., 2002; Vieira et al., 1996). Ce mouvement à l'extérieur des rafts mettrait ainsi en jeu, un rôle de *dispatcher* (ou de triage) de ces microdomaines. Des observations récentes par le groupe de Di Fiore (Puri et al., 2005) ont en effet mis en évidence le recrutement des composants du manteau de clathrine (AP2 et clathrine) au niveau des rafts à l'issue de l'activation de l'EGFR. Ce rôle de triage des rafts pourrait en outre se révéler spécifique vis à vis des différents éléments d'un même complexe de signalisation. Des données récentes montrent que l'activation du β 2AR conduit à l'internalisation du récepteur par l'intermédiaire des CCP et à celle de la protéine G α s par l'intermédiaire de la voie raft/caveolae (Hynes et al., 2004b; Allen et al., 2005). Une telle délocalisation des différents composants d'un complexe de signalisation met un frein évident au signal émanant du récepteur, tout en supportant la propagation du signal vers des voies de transduction parallèles. L'implication de G α s dans la régulation de la dégradation de l'EGFR pourrait en constituer un exemple (Zheng et al., 2004).

En conclusion, les dernières années ont permis une accumulation impressionnante de données concernant l'importance des rafts dans l'initiation et la régulation des complexes de signalisation dans les cas des récepteurs de l'EGF, de l'insuline, du TNF, ou encore des récepteurs TCR ou Fc ϵ RI (Golub et al., 2004; Itoh et al., 2002; Simons and Toomre, 2000). Plus que des domaines concentrant les protéines, ces structures pourraient constituer des zones de triage et de remaniement des complexes de signalisation. Ce faisant, les propriétés d'association des récepteurs membranaires à ces microdomaines vont définir de manière dynamique la spécificité de couplage de ces derniers mais également les voies de transport qu'ils empruntent à

l'issue de leur activation. Bien que plusieurs observations suggèrent qu'une telle fonction puisse s'étendre à la famille des GPCR (Li et al., 2000; Jiao et al., 2005; Hjalm et al., 2001; Hur et al., 2004; Rapacciuolo et al., 2003; Rimoldi et al., 2003), la diversité des récepteurs appartenant à cette famille constitue un frein évident à la généralisation de cette idée. Les résultats présentés dans cette étude tendent néanmoins à indiquer qu'au-delà des difficultés liées à l'étude même des microdomaines membranaires, cette hypothèse peut se révéler appropriée dans le cas du β 2AR.

Il sera ainsi intéressant dans l'avenir d'évaluer dans quelle mesure des événements de régulation phare de la signalisation associée aux GPCR pourraient être dépendants de la compartimentation membranaire. Le recrutement de la β arrestine est à ce titre fort intéressant. Dans les photorécepteurs, l'arrestine est transloquée au niveau de domaines riches en cholestérol, suggérant que la localisation membranaire de cette protéine ne soit pas uniquement déterminée par sa liaison au récepteur et joue un rôle dans la régulation de sa fonction (Lee and Montell, 2004; Nair et al., 2002). Par ailleurs, son implication dans les phénomènes de transactivation des voies de signalisation liées à l'EGFR et sa liaison à des protéines tyrosines kinases telles que src, Hck ou Yes, classiquement associées aux microdomaines ordonnés est particulièrement intrigante (Lefkowitz and Shenoy, 2005). L'importance des rafts dans la transactivation de l'EGFR par l'AT1R, un récepteur recrutant la β arrestine avec une grande affinité pourrait supporter de telles hypothèses (Olivares-Reyes et al., 2005; Ushio-Fukai et al., 2001).

Comme nous le verrons au paragraphe suivant, la fonction de la protéine NSF dans la régulation de l'activité de couplage du récepteur GABA_B pourrait également se trouver liée à la présence de ces deux protéines dans les rafts. Cela serait d'ailleurs réminiscent du rôle de NSF dans sa fonction de modulation des complexes de SNARE présents à l'issue du phénomène de fusion membranaire dans des domaines membranaires de type raft (Lafont et al., 1999).

RÔLE DE LA PROTÉINE CHAPERONE NSF

Les différentes observations présentées dans l'étude N°2 suggèrent que NSF participe à la régulation de l'efficacité de signalisation du récepteur GABA_B. La liaison directe de cette AAA ATPase au récepteur semble nécessaire à sa désensibilisation. Ce phénomène d'atténuation de l'activité du GABA_B serait dépendant du recrutement par le récepteur de la protéine PKC et s'accompagnerait de la déstabilisation de l'interaction entre le récepteur et la protéine NSF.

CARACTÉRISATION DE LA LIAISON DE NSF AU GABA_BR

En plus de confirmer l'interaction mise en évidence entre la sous unité GBR2 du récepteur GABA_B et la protéine NSF par complémentation chez la levure, les expériences de liaison réalisées in vitro entre la protéine NSF purifiée et une protéine GST fusionnée à la queue c-terminale du GBR1 ou du GBR2, ont permis d'en déterminer des caractéristiques importantes. L'activité biologique de NSF étant le plus souvent dépendante de son activité ATPasique (Whiteheart and Matveeva, 2004), il semblait important d'évaluer l'influence de cette dernière sur les propriétés de liaison de NSF aux différents deux récepteurs.

Comme cela avait été montré dans le cas des SNARE (Brunger and DeLaBarre, 2003) ou du récepteur GluR2 (Hanley et al., 2002; Song et al., 1998), la liaison de l'ATPase au GABA_BR semble fortement favoriser par l'inhibition de son activité enzymatique à l'aide de nucléotides non hydrolysables par exemple. Confirmant que l'intégrité de l'ATPase est importante dans un contexte biologique, la co-immunoprécipitation entre NSF et chacune des deux sous unités est inhibée par un traitement au NEM, un agent alkylant, inhibant définitivement son activité catalytique.

Contrairement à nombre de protéines caractérisées par leur liaison exclusive à l'une ou l'autre des sous unités de l'hétérodimère GABA_BR, 14-3-3 (Couve et al., 2001) ou CREB2/ATFx (White et al., 2000) par exemple, NSF semble donc lier de manière équivalente, à la fois les homodimères GBR1 et GBR2, mais aussi leur forme

hétérodimérique. L'interaction directe de NSF et de la région *coiled coil* de la sous unité GBR2 par double hybride, suggère en outre que cette liaison s'établisse au niveau du domaine *coiled coil* de l'hétérodimère.

Si la co-immunoprécipitation entre NSF et le récepteur GBR1 suggère qu'NSF soit impliqué dans le transport de l'hétérodimère vers la membrane, c'est cependant sa propriété de liaison à la forme active de l'hétérodimère à la surface membranaire qui nous a tout particulièrement intéressés.

UN MODÈLE POTENTIEL DE L'ACTION DE NSF

L'importance de l'activité ATPasique de NSF dans sa liaison à l'hétérodimère suggère que sa fonction envers le récepteur GABA_B nécessite son rôle de chaperone protéique. Ces données supportent l'établissement d'un parallèle entre le cas étudié et l'interaction de NSF aux SNARE au cours de la fusion membranaire. Un tel rapprochement conduit à deux hypothèses principales : 1) NSF module l'interface *coiled coil* des deux sous unités GBR1/GBR2; 2) NSF contrôle l'interaction du récepteur avec d'autres partenaires protéiques impliqués dans sa désensibilisation. Ces deux hypothèses ne sont néanmoins pas exclusives. Dans le contexte où certains partenaires de signalisation interagissent spécifiquement à l'une ou l'autre des deux sous unités, La modulation de l'interface superhéliçoïdale du GABA_BR par NSF pourrait donner l'occasion à de telles protéines d'interagir avec l'une ou l'autre des sous unités de l'hétérodimère.

La caractérisation plus précise du site d'interaction de NSF à la sous unité GBR2 par des méthodes de co-immunoprécipitation entre des récepteurs mutants de GBR2 et la protéine est informative à ce sujet. NSF lierait la région coiled coil de GBR2 par l'intermédiaire de trois résidus D⁸⁰⁶K⁸⁰⁷D⁸⁰⁸ (SP résultats non publiés). La modélisation de la structure du coiled coil dans cette région positionne le résidu D⁸⁰⁶ comme un élément important dans sa stabilité (Fig 30) (Kammerer et al., 1999). En effet, en interagissant avec le résidu K⁹⁰⁵ de la sous unité GBR1, le résidu D⁸⁰⁶ tamponnerait les effets déstabilisants de la charge positive de la lysine dans l'environnement hydrophobe du cœur de la structure superhéliçoïdale (Kammerer et al., 1999) (Fig 30).

En conséquence, la liaison de NSF à ce résidu constituerait un levier efficace à la déstabilisation du coiled coil formé entre les deux récepteurs. La seule perturbation de la liaison ionique instaurée entre les résidus D⁸⁰⁶ de GBR2 et K⁹⁰⁵ de GBR1 pourrait potentiellement induire une déstabilisation du coiled coil.

DYNAMIQUE DE LA LIAISON DE NSF À L'HÉTÉRODIMÈRE

L'importance de l'intégrité de l'ATPase de NSF dans son association au récepteur suggère qu'à l'état basal, l'activité enzymatique de la protéine soit inhibée. A l'issue de l'activation du récepteur, la déstabilisation de la liaison de NSF à l'hétérodimère serait par contre consistante avec une augmentation de son activité ATPasique.

Les similitudes entre l'association NSF/GABA_BR et NSF/SNAP/SNARE nous ont conduit à proposer l'hypothèse que la phosphorylation de NSF par PKC soit à l'origine de la dissociation entre NSF et le récepteur observée en présence de GABA. Dans le cas de l'exocytose des neurotransmetteurs, PKC phosphoryle la AAA ATPase et inhibe son association au complexe de SNARE (Matveeva et al., 2001). Cette hypothèse semble cependant infirmée dans notre cas puisqu'aucun changement dans le niveau de phosphorylation de l'ATPase n'est détectable à l'issue d'un traitement au GABA ou au PMA. L'implication de PKC dans la perturbation de l'interaction NSF/GABA_BR peut trouver explication à travers un modèle alternatif.

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre d'introduction, le dimère $G\beta\gamma$ interfère [le lecteur est référé au § concernant la régulation des canaux potassiques; (Wada et al., 2000)] avec l'activité des domaines de liaison à l'ATP retrouvé entre autres, chez NSF (Fig. 24) (Whiteheart and Matveeva, 2004). Dans le cadre de nos résultats, cette hypothèse pourrait constituer une base intéressante à un modèle d'étude où l'association basale de NSF au récepteur serait favorisée par l'interaction de l'ATPase avec le dimère $G\beta\gamma$. A l'issue de l'activation du récepteur et du recrutement de PKC. La phosphorylation du $GABA_B$ R par la kinase conduirait au déplacement du dimère $G\beta\gamma$ et à la levée de l'inhibition de l'activité ATPasique de NSF. Dans son état lié à l'ADP, NSF verrait alors sa liaison au récepteur diminuer, hypothèse consistante avec la caractérisation des propriétés de liaison de NSF aux récepteurs déterminées par des expériences de liaison *in vitro*.

LE RÔLE DE NSF DANS LA DIFFUSION LATÉRALE

L'interaction de NSF avec divers récepteurs, le GluR2 (Lee et al., 2004b), le β 2AR (Cong et al., 2001; McDonald et al., 1999) ou encore le CRLR (Bomberger et al., 2005b) a été impliquée dans la régulation de leur transport et plus particulièrement de leur recyclage vers la surface à l'issue de leur endocytose. Dans notre cas, l'interaction de NSF et du $GABA_B$ R ne semble pas jouer de rôle dans un tel processus, puisque la présence du récepteur à la surface ne semble pas modifiée par son activation (Fairfax et al., 2004; Perroy et al., 2003). De manière intéressante, NSF interagit avec un autre GPCR n'internalisant que marginalement, le récepteur D3-dopaminergique (D3R; (Fairfax et al., 2004; Zou et al., 2005).

Des résultats obtenus récemment avec le GluR2 suggèrent que NSF pourrait également être impliquée dans la régulation de la diffusion latérale du canal ionique en contrôlant l'interaction de GluR2 avec une protéine d'échafaudage modulant son internalisation, PICK1 (Fig 22) (Gardner et al., 2005; Steinberg et al., 2004). Au vu de résultats récents reliant la régulation de l'activité du récepteur $GABA_B$ R à sa présence dans les rafts (Becher et al., 2004), une telle hypothèse pourrait également se révéler pertinente dans le cas de ce récepteur. Cette idée est en outre supportée par la

présence constitutive dans les rafts non seulement du récepteur (SP résultats non publiés), comme cela l'avait été observé dans les neurones de cortex de rat (Becher et al., 2001), mais aussi de NSF (SP résultats non publiés; (Schnitzer et al., 1995)).

Nous avons vu dans le chapitre d'introduction que les rafts étaient vraisemblablement de petites structures de l'ordre de 10nm (Mayor and Rao, 2004; Sharma et al., 2004). Leur agrégation à l'issue de la multimérisation de protéines membranaires ou de remaniements du cytosquelette sous cortical constituerait un événement très important dans la régulation des phénomènes de signalisation. Dans ce contexte, l'un des rôles possibles de NSF pourrait être de contrôler cette événement d'agrégation.

Comme indiqué précédemment, la filamine semble interagir avec la sous unité GBR2 de l'hétérodimère [voir référence (Calver et al., 2002)]. L'association de cette protéine aux rafts et aux cytosquelettes d'actine ajoutée à son implication récente dans la modulation de la diffusion membranaire du D3R (Kim et al., 2005a) en font un candidat solide dans le cadre de nos résultats. Le contrôle par NSF de l'interaction entre GBR2 et la filamine pourrait ainsi constituer un mécanisme potentiel de régulation de la diffusion latérale du récepteur et de sa subséquente désensibilisation. Un scénario intéressant pourrait reposer sur la déstabilisation constitutive de l'interaction entre la filamine et le GABA_BR par NSF. La libération de NSF à l'issue de l'activation du récepteur permettrait alors la stabilisation de l'interaction du récepteur avec la filamine et l'immobilisation de ce dernier à travers son association indirecte au cytosquelette. La régulation de l'activité du récepteur ne reposerait donc pas sur la modulation de sa présence dans les rafts, mais plutôt sur le contrôle de la mobilité des microdomaines l'environnant et leur niveau d'agrégation.

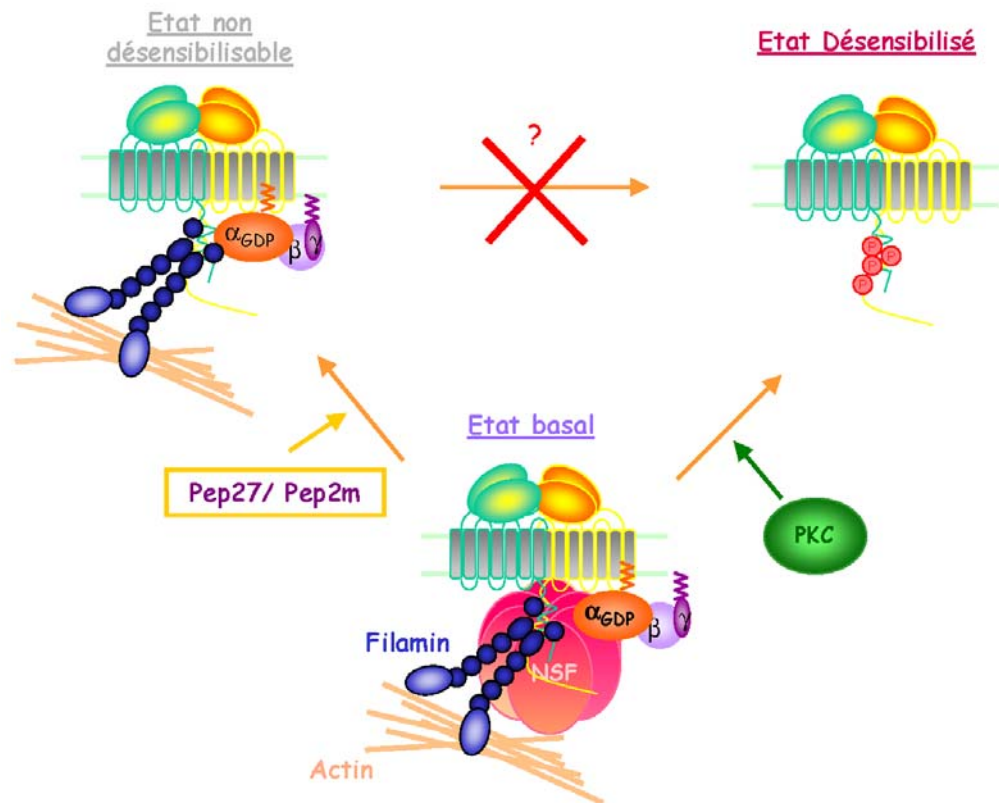


Figure 31. Rôle de NSF dans la régulation du récepteur GABA_B.

A l'état basal, le récepteur est présent dans des structures membranaires rafts dans lesquelles il est associé à NSF et hypothétiquement à la filamine. Cette association immobilise le récepteur dans la membrane en le liant au réseau d'actine sous membranaire. En présence de GABA, le récepteur active la protéine G et recrute PKC. La phosphorylation de cette dernière initie alors son découplage de la protéine G levant l'inhibition imposée par Gβγ sur l'activité ATPasique de NSF. En déstabilisant la liaison entre la filamine et le récepteur, NSF augmente la mobilité membranaire de ce dernier et réduit son efficacité de couplage à la protéine G. En l'absence de la liaison à NSF en raison du traitement pep2m/pep27, l'association du récepteur à la filamine persiste et le récepteur est piégé dans un état non désensibilisable.

Alternativement, la filamine pourrait lier la sous unité GBR2 à l'état basal et NSF mènerait à la déstabilisation de cette interaction à l'issu de l'activation du récepteur. La mobilité membranaire de ce dernier serait donc augmentée dans son état désensibilisé. Le rôle de PKC dans la déstabilisation de l'association de la filamine au D2R (Li et al., 2000), comme d'ailleurs l'exemple du D3R (Kim et al., 2005a), pourraient suggérer la pertinence d'une telle hypothèse.

Dans le cas du D3R, la liaison basale de ce récepteur à la filamine et à la β arr2 limite sa mobilité à l'état basal. Une fois activé la déstabilisation du complexe D3R/ β arr/filamine par GRK3 (Kim et al., 2005a) conduit à l'augmentation de sa mobilité latérale. L'importance de la dissociation de la liaison de la filamine au récepteur dans notre cas serait donc consistante avec l'importance de la liaison de NSF dans le processus de désensibilisation du récepteur (Fig 31).

INFLUENCE DU RÉCEPTEUR GABA_B SUR L'ACTIVITÉ DE NSF

En dehors, de son rôle dans la désensibilisation du GABA_BR, l'interaction entre NSF et ce récepteur pourrait également avoir des conséquences au niveau de l'ATPase elle-même. L'un des rôles physiologiques établis du GABA_BR est d'inhiber l'exocytose des neurotransmetteurs. Comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction, cette inhibition repose sur divers mécanismes : la modulation de l'activité des canaux calciques potentiel-dépendant tout d'abord; la modulation de la machinerie de fusion par ailleurs. Il a été proposé que ce dernier mécanismes impliquerait le dimère G $\beta\gamma$ et son interaction directe avec les composants du complexes SNARE essentiel à la fusion membranaire (Blackmer et al., 2005). Néanmoins, l'interaction du récepteur avec NSF, un composant essentiel à la régulation de l'interaction des SNARE, pourrait refléter l'existence d'un mécanisme alternatif ou complémentaire de modulation directe de la fusion membranaire par le GABA_BR. On peut en effet imaginer, que la libération d'une protéine NSF dans sa forme ADP à l'issu de l'activation de l'hétérodimère pourrait constituer un événement régulateur important lorsque cette libération s'effectue à proximité des complexes protéiques assurant le phénomène d'exocytose.

En conclusion, la modulation de l'activité du récepteur GABA_B par la protéine NSF pourrait être consistante avec un rôle pour NSF dans la régulation de la diffusion membranaire du récepteur. L'idée d'une telle fonction pour NSF a émergé, il y a peu (Gardner et al., 2005; Steinberg et al., 2004), elle présente néanmoins l'intérêt de pouvoir embrasser l'ensemble des rôles disparates associés à cette ATPase depuis plus de quinze ans. D'un point de vue théorique, le rôle de NSF dans le recyclage et le routage membranaire de diverses protéines, VAMP et synaptotagmine, ste2 (Hicke, 1997), le GluR2 (Lee et al., 2004b), le β 2AR (Cong et al., 2001) ou encore le CRLR (Bomberger et al., 2005b) pourrait en une simple modulation de la diffusion membranaire latérale de celles-ci à travers le contrôle de leur association à diverses complexes protéiques. Cette idée serait en effet tout à fait réconciliable avec l'implication de NSF dans le guidage préférentiel des protéines vers des voies de transport particulières aboutissant à leur recyclage ou au contraire à leur rétention dans les compartiments intracellulaires (Hicke, 1997; Lee et al., 2004b). La présence dans les rafts, des complexes de SNARE à l'issue de la fusion membranaire (Lafont et al., 1999), du D3R (Kim et al., 2005a) ou encore du récepteur GABA_B (Becher et al., 2001) pourrait en outre indiquer que NSF participe à cette fonction de triage des microdomaines membranaires, précédemment évoquée.

Les résultats présentés dans la publication N°2 tendent à suggérer à nouveau un rôle central des rafts dans la régulation de l'activité d'un récepteur et souligne le rôle potentiellement charnière de la protéine NSF dans cette influence exercée par les microdomaines.

De manière intéressante, un lien semble également exister entre les mécanismes d'ubiquitination et la présence des protéines ubiquitinées dans les rafts. L'observation d'une localisation préférentielle de E3-ubiquitin ligase majeure dans la signalisation, Cbl et Nedd4, dans des fractions membranaires résistantes au TritonX100 supporte cette idée (Lafont and Simons, 2001). En outre, comme nous l'avons vu dans la dernière partie de l'introduction générale, l'ubiquitination s'avère déterminante à

l'internalisation du récepteur de l'EGF par l'intermédiaire des caveolae (Chen and Davis, 2002; Sigismund et al., 2005).

Dans le cas où les hypothèses évoquées au chapitre précédent concernant la translocation de la β arrestine au niveau de structures de type raft se vérifient, il sera donc intéressant d'évaluer si l'état d'ubiquitination de cette protéine peut influencer son association aux microdomaines ou si inversement cette association décide de son état d'ubiquitination.

RÔLE DE L'UBIQUITINATION DANS LA RÉGULATION DES COMPLEXES PROTÉIQUES

Comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises dans cette thèse, l'ubiquitination constitue une modification post-traductionnelle ayant émergé au cours des dix dernières années comme un régulateur majeur de la dynamique des interactions protéiques. En outre, en dehors de son rôle classique dans les phénomènes de dégradation par le protéasome, elle va également contrôler différents phénomènes de transport, membranaires ou cytosoliques (Hicke, 2001b; Hicke and Dunn, 2003; Raiborg et al., 2003; Sigismund et al., 2005; Weissman, 2001).

La publication N°3 constituait une preuve de principe de l'utilisation potentielle du BRET et des techniques reposant sur le transfert d'énergie pour suivre en temps réel et dans des cellules vivantes le phénomène d'ubiquitination. Nous démontrons en outre que l'utilisation de substrats de la luciférase présentant des propriétés spectrales compatibles avec la GFP ou la YFP, permet de suivre de manière concomitante l'ubiquitination d'une protéine d'intérêt, la β arr par exemple, et la modulation des interactions de cette dernière avec l'un de ses partenaires de signalisation, le V2R dans ce cas.

Si ce double BRET peut s'avérer intéressant pour comparer les cinétiques respectives de chacun des deux événements observés, il est néanmoins important de

noter qu'il ne peut en aucun cas constituer un lien causal entre ces phénomènes. En effet, le signal de BRET reflétant une population de protéines, chacun de ces deux signaux pourrait correspondre à une population arborant un comportement particulier et indépendant vis à vis de l'autre. Le développement dans l'avenir de méthodes couplant des techniques de BRET/FRET, BRET/PCA (protein complementation assay) ou encore de FRET/PCA, pourront en revanche permettre de détecter l'évolution de différents phénomènes intervenant sur une population spécifique de protéines. Dans tous les cas, la capacité de suivre en temps réel et dans des cellules vivantes le phénomène d'ubiquitination par la méthode de BRET offre l'opportunité d'un nouveau regard sur le phénomène d'ubiquitination.

Certains des résultats présentés pourraient également avoir une signification du point de vu des propriétés moléculaires de l'ubiquitination de la β arr. La détection qualitativement équivalente du phénomène à l'aide d'une protéine de fusion GFP-Ubi sauvage ou mutée au niveau de ses lysines K^{48/63} semble à ce titre intéressante. La surexpression du mutant de l'ubiquitine K^{48/63} étant généralement considéré comme un moyen d'inhiber de manière efficace les phénomènes de polyubiquitination, ces résultats pourraient suggérer la modification de la β arr par plusieurs motifs monoubiquitines. Cette hypothèse est consistante avec des observations récentes réalisées par Shenoy et Lefkowitz suggérant que l'ubiquitination de la β arrestine n'est pas exclusive à des lysines données (Shenoy and Lefkowitz, 2005). La stabilité du poids moléculaire apparent des formes ubiquitinées de la β arrestine dans cette publication et ce quelques soit l'identité des lysines mutées est consistante avec cette idée. Des observations similaires avait également été réalisées dans le cas de la mise en évidence de la multi-monoubiquitination de l'EGFR ou du PDGFR (Haglund et al., 2003).

Dans le cadre de notre étude, le fait que l'ajout possible d'une GFP-Ubi^{K48/68A} à la fin d'un motif de polyubiquitination puisse également être détecté en BRET limite considérablement les conclusions concernant la nature des motifs d'ubiquitination spécifique de la protéine.

En permettant de suivre en temps réel la dynamique d'ubiquitination de la β arrestine, cette méthode permettra donc peut être de répondre à certaines des questions encore sans réponse concernant la fonction exacte de cette modification dans la régulation de la β arrestine ainsi que potentiellement dans la caractérisation de la régulation spécifique de la fonction des β arr1 et 2.

Malgré leur homologie de séquence, la β arr1 comporte non seulement plus de lysines dans sa séquence (35 au lieu de 31) mais exhibe surtout des séquences enrichies en résidus P, E/D, S/T (séquence PEST; analyse de séquence réalisée à partir des séquences NCBI en utilisant le site PESTfind EMBnet Austria) caractéristiques des protéines dont la durée de vie est précisément régulée et (Rechsteiner and Rogers, 1996; Rogers et al., 1986) et impliquée dans la liaison aux E3-ubiquitine ligases. Comme l'illustre la figure 32, la portion c-terminale de la β arr1 est excessivement riche en résidus de type PEST par rapport à la β arr2. En outre, qu'il s'agisse de la séquence retrouvée entre les résidus 363-393 ou encore 402-418, ces régions ont toutes deux été décrites comme importantes fonctionnellement. La délétion de la β arr1 au niveau de son résidu 383 stimule la vitesse de son recrutement (Oakley et al., 2001) tandis que la sérine 412 est importante quant à la régulation de la fonction d'échafaudage de la β arr1 (Hupfeld et al., 2005). On retrouve en outre au niveau de ces séquences les sites de liaison à la clathrine et AP2.

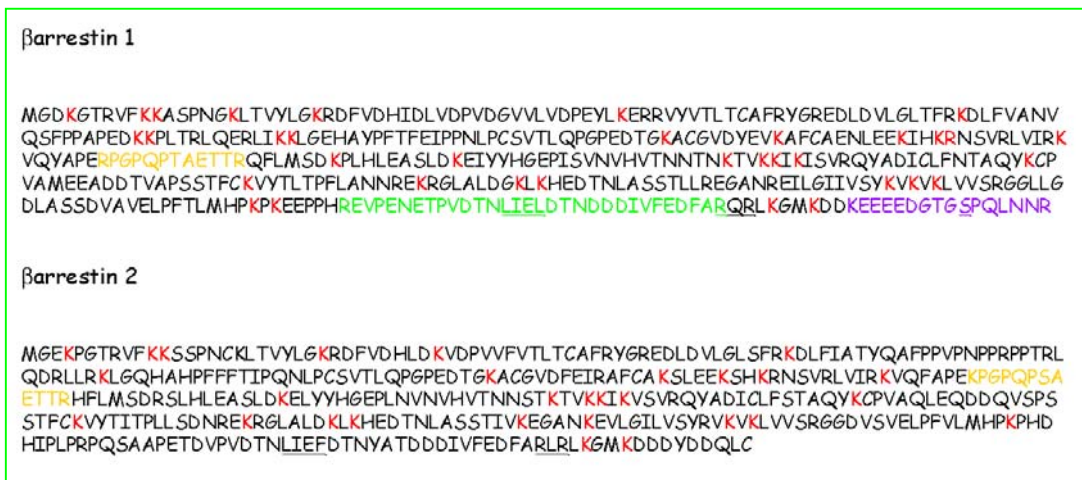


Figure 32. Identification des motifs PEST présents dans les séquences de βarr1 et βarr2.

Séquences NCBI des βarr1 et βarr2 humaines. Les résidus lysines sont indiqués en rouge. La région PEST commune aux deux protéines est indiquée en jaune et se localise respectivement entre les résidus 177-188 de la βarr1 et 163-174 de la βarr2, c'est à dire à proximité du core polaire important pour le changement conformation potentiel de la βarr lors de son recrutement à la membrane (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Les régions PEST spécifiques à βarr1 sont indiquées en vert et violet et correspondent respectivement aux résidus 363-393 et 403-418 de cette dernière. Les sites de liaison à la clathrine (LIEφ) et à AP2 (RXR) sont soulignés dans chaque cas. L'analyse des séquences a été effectuée à l'aide du logiciel PESTfind sur le site EMBnet Austria.

Le rôle émergent et spécifique de la βarr1 dans la modulation de l'ubiquitination et de la dégradation de diverses protéines [l'IGF1 (Girmita et al., 2005), l'IRS1 (Usui et al., 2004) ou IkappaB (Witherow et al., 2004)] pourrait ainsi être relié à la présence de ces séquences particulières absentes chez la βarr2. Il sera ainsi très intéressant d'évaluer les conséquences de l'ubiquitination de ces régions sur la liaison de βarr1 au composants de la machinerie de transport membranaire (AP2 ou clathrine) ainsi qu'à certains de ses partenaires spécifiques, comme par exemple NSF ou certaines tyrosines kinases comme Hck, Yes ou Fgr (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Ces résultats pourraient en outre se révéler très éclairants concernant le rôle de la βarr1 dans la régulation de la translocation du transporteur Glut4 ou de la dégranulation des neutrophiles en réponse au CXCR1. La méthode développée dans notre étude pourra donc constituer un avantage technique intéressant pour répondre à ces différentes questions.

CONCLUSION

Les travaux rapportés dans cette thèse étudiaient le rôle de la compartimentation et de la modulation des interactions protéiques dans les mécanismes de régulation des GPCR. Comme l'a illustré entre autres, la publication N°1, la formation des complexes de signalisation et le couplage d'un récepteur à ses partenaires de transduction est étroitement contrôlé par leur localisation membranaire. Cette dernière serait ainsi impliquée dans la spécificité de formation de ces signalosomes en liant préférentiellement certains des composants d'une voie de signalisation donnée. L'importance des microdomaines et plus particulièrement des rafts dans l'organisation des complexes de signalisation et de leur remaniement éventuels pourrait s'étendre jusqu'à la formation de complexes responsables du transport et de la diffusion des protéines membranaires (Puri et al., 2005). Ce faisant, les rafts seraient non seulement impliqués dans certains mécanismes initiant la signalisation, mais aussi dans la détermination du routage membranaire des composants de ces complexes. La fonction de l'interaction du récepteur GABA_B à la protéine NSF pourrait illustrer cette idée et positionner NSF comme une protéine importante de la machinerie de routage présente au niveau des rafts. Comme nous l'avons évoqué lors de l'introduction, ce rôle semble étroitement dépendant du phénomène d'ubiquitination et il a été récemment proposé que l'ubiquitination de certains récepteurs membranaires (l'EGFR essentiellement) définisse leur internalisation par une voie dépendante des rafts ou de microdomaines associés, les caveolae. Dans le cas des GPCR, l'ubiquitination de la β arrestine jouerait un rôle similaire en favorisant différents types de comportement des récepteurs endocytés. Le rôle précis de la β arrestine et l'influence potentielle des microdomaines dans ce phénomène restent mal définis. L'étude des mécanismes de régulation de la translocation de l'arrestine aux photorécepteurs (Nair et al., 2002; Lee and Montell, 2004) suggèrent néanmoins que cet événement ait lieu au niveau de structures membranaires ordonnées de type raft (Nair et al., 2002). L'éventuelle pertinence de ces observations dans le cas des

β arrestine suggèrerait un rôle pour ces protéines dans la modulation de la mobilité membranaire latérale des GPCR.

En garantissant la spécificité spatio-temporelle des complexes protéiques, la compartimentation et les protéines telles que NSF ou encore la β arr vont contrôler la destinée des différents récepteurs membranaires. Dans ces mécanismes, l'ubiquitine constitue un élément essentiel de régulation en modifiant les différents composants des signalosomes. La méthode de détection décrite dans la publication N°3 offrira sans doute l'occasion d'un nouveau regard sur la dynamique et les remaniements de ces complexes de signalisation.

REFERENCES

Abramson,S.N., Martin,M.W., Hughes,A.R., Harden,T.K., Neve,K.A., Barrett,D.A., and Molinoff,P.B. (1988). Interaction of beta-adrenergic receptors with the inhibitory guanine nucleotide-binding protein of adenylate cyclase in membranes prepared from cyc- S49 lymphoma cells. *Biochem. Pharmacol.* *37*, 4289-4297.

Afshar,K., Willard,F.S., Colombo,K., Johnston,C.A., McCudden,C.R., Siderovski,D.P., and Gonczy,P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* *119*, 219-230.

Aguilar,R.C. and Wendland,B. (2005). Endocytosis of membrane receptors: two pathways are better than one. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 2679-2680.

Ahn,S., Shenoy,S.K., Wei,H., and Lefkowitz,R.J. (2004). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J. Biol. Chem.* *279*, 35518-35525.

Allen,J.A., Yu,J.Z., Donati,R.J., and Rasenick,M.M. (2005). Beta-adrenergic receptor stimulation promotes G alpha s internalization through lipid rafts: a study in living cells. *Mol. Pharmacol.* *67*, 1493-1504.

Anderson,R.G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 199-225.

Anderson,R.G. and Jacobson,K. (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* *296*, 1821-1825.

Angers,S., Salahpour,A., Joly,E., Hilaiet,S., Chelsky,D., Dennis,M., and Bouvier,M. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 3684-3689.

Ango,F., Prezeau,L., Muller,T., Tu,J.C., Xiao,B., Worley,P.F., Pin,J.P., Bockaert,J., and Fagni,L. (2001). Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* *411*, 962-965.

Armstrong,N., Mayer,M., and Gouaux,E. (2003). Tuning activation of the AMPA-sensitive GluR2 ion channel by genetic adjustment of agonist-induced conformational changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 5736-5741.

Arshavsky,V.Y. and Bownds,M.D. (1992). Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* 357, 416-417.

Ashery,U., Koch,H., Scheuss,V., Brose,N., and Rettig,J. (1999). A presynaptic role for the ADP ribosylation factor (ARF)-specific GDP/GTP exchange factor msec7-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 1094-1099.

Attramadal,H., Arriza,J.L., Aoki,C., Dawson,T.M., Codina,J., Kwatra,M.M., Snyder,S.H., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* 267, 17882-17890.

Audet,N., Paquin-Gobeil,M., Landry-Paquet,O., Schiller,P.W., and Pineyro,G. (2005). Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *J. Biol. Chem.* 280, 7808-7816.

Awata,H., Huang,C., Handlogten,M.E., and Miller,R.T. (2001). Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *J. Biol. Chem.* 276, 34871-34879.

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

Baillie,G.S., Sood,A., McPhee,I., Gall,I., Perry,S.J., Lefkowitz,R.J., and Houslay,M.D. (2003). beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 940-945.

Baneres,J.L. and Parello,J. (2003). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J. Mol. Biol.* 329, 815-829.

Barak,L.S., Tiberi,M., Freedman,N.J., Kwatra,M.M., Lefkowitz,R.J., and Caron,M.G. (1994). A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta 2-adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* 269, 2790-2795.

Barki-Harrington,L., Perrino,C., and Rockman,H.A. (2004). Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 63, 391-402.

Barlic,J., Andrews,J.D., Kelvin,A.A., Bosinger,S.E., DeVries,M.E., Xu,L., Dobransky,T., Feldman,R.D., Ferguson,S.S., and Kelvin,D.J. (2000). Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1. *Nat. Immunol.* 1, 227-233.

Barnes,W.G., Reiter,E., Violin,J.D., Ren,X.R., Milligan,G., and Lefkowitz,R.J. (2005). beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* *280*, 8041-8050.

Basanez,G., Ruiz-Arguello,M.B., Alonso,A., Goni,F.M., Karlsson,G., and Edwards,K. (1997). Morphological changes induced by phospholipase C and by sphingomyelinase on large unilamellar vesicles: a cryo-transmission electron microscopy study of liposome fusion. *Biophys. J.* *72*, 2630-2637.

Baumann,C.A., Ribon,V., Kanzaki,M., Thurmond,D.C., Mora,S., Shigematsu,S., Bickel,P.E., Pessin,J.E., and Saltiel,A.R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* *407*, 202-207.

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

Becher,A., White,J.H., and McIlhinney,R.A. (2001). The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* *79*, 787-795.

Belitsky,B.R. and Sonenshein,A.L. (1999). An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 10290-10295.

Benmerah,A., Lamaze,C., Begue,B., Schmid,S.L., Dautry-Varsat,A., and Cerf-Bensussan,N. (1998). AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* *140*, 1055-1062.

Benovic,J.L. and Gomez,J. (1993). Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *J. Biol. Chem.* *268*, 19521-19527.

Benovic,J.L., Onorato,J.J., Arriza,J.L., Stone,W.C., Lohse,M., Jenkins,N.A., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1991). Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *J. Biol. Chem.* *266*, 14939-14946.

Benovic,J.L., Strasser,R.H., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1986). Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 2797-2801.

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

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

Berstein,G., Blank,J.L., Jhon,D.Y., Exton,J.H., Rhee,S.G., and Ross,E.M. (1992). Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell* *70*, 411-418.

Bichet,D., Cornet,V., Geib,S., Carlier,E., Volsen,S., Hoshi,T., Mori,Y., and De Waard,M. (2000). The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* *25*, 177-190.

Bickel,P.E. (2002). Lipid rafts and insulin signaling. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *282*, E1-E10.

Binda,A.V., Kabbani,N., Lin,R., and Levenson,R. (2002). D2 and D3 dopamine receptor cell surface localization mediated by interaction with protein 4.1N. *Mol. Pharmacol.* *62*, 507-513.

Bischoff,S., Leonhard,S., Reymann,N., Schuler,V., Shigemoto,R., Kaupmann,K., and Bettler,B. (1999). Spatial distribution of GABA(B)R1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *J. Comp Neurol.* *412*, 1-16.

Blackmer,T., Larsen,E.C., Bartleson,C., Kowalchuk,J.A., Yoon,E.J., Preininger,A.M., Alford,S., Hamm,H.E., and Martin,T.F. (2005). G protein betagamma directly regulates SNARE protein fusion machinery for secretory granule exocytosis. *Nat. Neurosci.* *8*, 421-425.

Blackmer,T., Larsen,E.C., Takahashi,M., Martin,T.F., Alford,S., and Hamm,H.E. (2001). G protein betagamma subunit-mediated presynaptic inhibition: regulation of exocytotic fusion downstream of Ca²⁺ entry. *Science* *292*, 293-297.

Bock,J.B. and Scheller,R.H. (1999). SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 12227-12229.

Bockaert,J., Fagni,L., Dumuis,A., and Marin,P. (2004). GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol. Ther.* *103*, 203-221.

Bockaert,J., Marin,P., Dumuis,A., and Fagni,L. (2003). The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* *546*, 65-72.

Bockaert,J. and Pin,J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* *18*, 1723-1729.

Bomberger,J.M., Parameswaran,N., Hall,C.S., Aiyar,N., and Spielman,W.S. (2005b). Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* *280*, 9297-9307.

Bomberger,J.M., Spielman,W.S., Hall,C.S., Weinman,E.J., and Parameswaran,N. (2005a). Receptor activity-modifying protein (RAMP) isoform-specific regulation of adrenomedullin receptor trafficking by NHERF-1. *J. Biol. Chem.* *280*, 23926-23935.

Bormann,J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *21*, 16-19.

Bouche,N., Lacombe,B., and Fromm,H. (2003). GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends Cell Biol.* *13*, 607-610.

Bouvier,M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 274-286.

Bowser,R., Muller,H., Govindan,B., and Novick,P. (1992). Sec8p and Sec15p are components of a plasma membrane-associated 19.5S particle that may function downstream of Sec4p to control exocytosis. *J. Cell Biol.* *118*, 1041-1056.

Bray,D. and Duke,T. (2004). Conformational spread: the propagation of allosteric states in large multiprotein complexes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *33*, 53-73.

Bredt,D.S. and Nicoll,R.A. (2003). AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* *40*, 361-379.

Bretscher,A., Edwards,K., and Fehon,R.G. (2002a). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 586-599.

Bretscher,A., Edwards,K., and Fehon,R.G. (2002b). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 586-599.

Brown,D. (2003). The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am. J. Physiol Renal Physiol* *284*, F893-F901.

Brown,D.A. and Rose,J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* *68*, 533-544.

Brunger,A.T. (2001). Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *30*, 157-171.

Brunger,A.T. and DeLaBarre,B. (2003). NSF and p97/VCP: similar at first, different at last. *FEBS Lett.* *555*, 126-133.

Bryant,R.G. (1996). The dynamics of water-protein interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *25*, 29-53.

Cabrera-Vera,T.M., Vanhauwe,J., Thomas,T.O., Medkova,M., Preininger,A., Mazzoni,M.R., and Hamm,H.E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* *24*, 765-781.

Calderwood,D.A., Huttenlocher,A., Kiosses,W.B., Rose,D.M., Woodside,D.G., Schwartz,M.A., and Ginsberg,M.H. (2001). Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1060-1068.

Calver,A.R., Davies,C.H., and Pangalos,M. (2002). GABA(B) receptors: from monogamy to promiscuity. *Neurosignals.* *11*, 299-314.

Campbell-Valois F-X. Massive perturbation of a foldon. Accepté dans PNAS 2005.

Cant,S.H. and Pitcher,J.A. (2005). G Protein-coupled Receptor Kinase 2-mediated Phosphorylation of Ezrin Is Required for G Protein-coupled Receptor-dependent Reorganization of the Actin Cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* *16*, 3088-3099.

Cao,T.T., Deacon,H.W., Reczek,D., Bretscher,A., and von Zastrow,M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* *401*, 286-290.

Cao,T.T., Mays,R.W., and von Zastrow,M. (1998). Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* *273*, 24592-24602.

Cao,W., Luttrell,L.M., Medvedev,A.V., Pierce,K.L., Daniel,K.W., Dixon,T.M., Lefkowitz,R.J., and Collins,S. (2000). Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *J. Biol. Chem.* *275*, 38131-38134.

Capogna,M., Gahwiler,B.H., and Thompson,S.M. (1996). Calcium-independent actions of alpha-latrotoxin on spontaneous and evoked synaptic transmission in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* *76*, 3149-3158.

Carman,C.V., Parent,J.L., Day,P.W., Pronin,A.N., Sternweis,P.M., Wedegaertner,P.B., Gilman,A.G., Benovic,J.L., and Kozasa,T. (1999). Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J. Biol. Chem.* *274*, 34483-34492.

Caroni,P. (2001). New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* *20*, 4332-4336.

Catterall,W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 521-555.

Ceresa,B.P., Kao,A.W., Santeler,S.R., and Pessin,J.E. (1998). Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol. Cell Biol.* *18*, 3862-3870.

Cha,B., Kenworthy,A., Murtazina,R., and Donowitz,M. (2004). The lateral mobility of NHE3 on the apical membrane of renal epithelial OK cells is limited by the PDZ domain proteins NHERF1/2, but is dependent on an intact actin cytoskeleton as determined by FRAP. *J. Cell Sci.* *117*, 3353-3365.

Chabre,M., Cone,R., and Saibil,H. (2003). Biophysics: is rhodopsin dimeric in native retinal rods? *Nature* *426*, 30-31.

Chang,W.J., Ying,Y.S., Rothberg,K.G., Hooper,N.M., Turner,A.J., Gambliel,H.A., De Gunzburg,J., Mumby,S.M., Gilman,A.G., and Anderson,R.G. (1994). Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell Biol.* *126*, 127-138.

Chen,H. and De Camilli,P. (2005). The association of epsin with ubiquitinated cargo along the endocytic pathway is negatively regulated by its interaction with clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 2766-2771.

Chen,J., DeVivo,M., Dingus,J., Harry,A., Li,J., Sui,J., Carty,D.J., Blank,J.L., Exton,J.H., Stoffel,R.H., and . (1995). A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science* *268*, 1166-1169.

Chen,L. and Davis,N.G. (2002). Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway. *Traffic.* *3*, 110-123.

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

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

Chen,Y., Harry,A., Li,J., Smit,M.J., Bai,X., Magnusson,R., Pieroni,J.P., Weng,G., and Iyengar,R. (1997). Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 14100-14104.

Chen,Y.A. and Scheller,R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 98-106.

Chernomordik,L., Kozlov,M.M., and Zimmerberg,J. (1995). Lipids in biological membrane fusion. *J. Membr. Biol.* 146, 1-14.

Cherukuri,A., Dykstra,M., and Pierce,S.K. (2001). Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity.* 14, 657-660.

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

Choquet,D. and Triller,A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 251-265.

Christopoulos,A. and Kenakin,T. (2002). G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol. Rev.* 54, 323-374.

Cismowski,M.J., Takesono,A., Ma,C., Lizano,J.S., Xie,X., Fuernkranz,H., Lanier,S.M., and Duzic,E. (1999). Genetic screens in yeast to identify mammalian nonreceptor modulators of G-protein signaling. *Nat. Biotechnol.* 17, 878-883.

Claing,A., Chen,W., Miller,W.E., Vitale,N., Moss,J., Premont,R.T., and Lefkowitz,R.J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 42509-42513.

Claing,A., Laporte,S.A., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.* 66, 61-79.

- Clark, J.A., Mezey, E., Lam, A.S., and Bonner, T.I. (2000). Distribution of the GABA(B) receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Res.* 860, 41-52.
- Coleman, S.K., Cai, C., Mottershead, D.G., Haapalahti, J.P., and Keinänen, K. (2003). Surface expression of GluR-D AMPA receptor is dependent on an interaction between its C-terminal domain and a 4.1 protein. *J. Neurosci.* 23, 798-806.
- Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R., and Owen, D.J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109, 523-535.
- Cong, M., Perry, S.J., Hu, L.A., Hanson, P.I., Claing, A., and Lefkowitz, R.J. (2001). Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J. Biol. Chem.* 276, 45145-45152.
- Cooper, D.M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem. J.* 375, 517-529.
- Copley, R.R., Letunic, I., and Bork, P. (2002). Genome and protein evolution in eukaryotes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 39-45.
- Corey, S., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (1998). Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K^+ channel, IKACH. *J. Biol. Chem.* 273, 5271-5278.
- Cornish-Bowden, A.J. and Koshland, D.E., Jr. (1971). The quaternary structure of proteins composed of identical subunits. *J. Biol. Chem.* 246, 3092-3102.
- Correa, S.A., Munton, R., Nishimune, A., Fitzjohn, S., and Henley, J.M. (2004). Development of GABAB subunits and functional GABAB receptors in rat cultured hippocampal neurons. *Neuropharmacology* 47, 475-484.
- Costa, T. and Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 7321-7325.
- Couve, A., Filippov, A.K., Connolly, C.N., Bettler, B., Brown, D.A., and Moss, S.J. (1998). Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 26361-26367.
- Couve, A., Kittler, J.T., Uren, J.M., Calver, A.R., Pangalos, M.N., Walsh, F.S., and Moss, S.J. (2001). Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol. Cell Neurosci.* 17, 317-328.

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

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

Craft,C.M., Whitmore,D.H., and Wiechmann,A.F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.* *269*, 4613-4619.

Crotzer,V.L., Mabardy,A.S., Weiss,A., and Brodsky,F.M. (2004). T cell receptor engagement leads to phosphorylation of clathrin heavy chain during receptor internalization. *J. Exp. Med.* *199*, 981-991.

Daaka,Y., Luttrell,L.M., Ahn,S., Della Rocca,G.J., Ferguson,S.S., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *273*, 685-688.

Daaka,Y., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* *390*, 88-91.

Dabora,S.L. and Sheetz,M.P. (1988). The microtubule-dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the ER from cultured cell extracts. *Cell* *54*, 27-35.

Dale,L.B., Babwah,A.V., and Ferguson,S.S. (2002). Mechanisms of metabotropic glutamate receptor desensitization: role in the patterning of effector enzyme activation. *Neurochem. Int.* *41*, 319-326.

Dalle,S., Ricketts,W., Imamura,T., Vollenweider,P., and Olefsky,J.M. (2001). Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. *J. Biol. Chem.* *276*, 15688-15695.

Damm,E.M., Pelkmans,L., Kartenbeck,J., Mezzacasa,A., Kurzchalia,T., and Helenius,A. (2005). *Clat.* *J. Cell Biol.* *168*, 477-488.

Dascal,N., Schreibmayer,W., Lim,N.F., Wang,W., Chavkin,C., DiMagno,L., Labarca,C., Kieffer,B.L., Gaveriaux-Ruff,C., Trollinger,D., and . (1993). Atrial G protein-activated K⁺ channel: expression cloning and molecular properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 10235-10239.

Daub,H., Weiss,F.U., Wallasch,C., and Ullrich,A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.

Daw,M.I., Chittajallu,R., Bortolotto,Z.A., Dev,K.K., Duprat,F., Henley,J.M., Collingridge,G.L., and Isaac,J.T. (2000). PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 28, 873-886.

de Figueiredo,P., Doody,A., Polizotto,R.S., Drecktrah,D., Wood,S., Banta,M., Strang,M.S., and Brown,W.J. (2001). Inhibition of transferrin recycling and endosome tubulation by phospholipase A2 antagonists. *J. Biol. Chem.* 276, 47361-47370.

De Lean,A., Stadel,J.M., and Lefkowitz,R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108-7117.

De Matteis,M.A. and Godi,A. (2004). PI-3-kinase membrane traffic. *Nat. Cell Biol.* 6, 487-492.

De Melker,A.A., van der,H.G., and Borst,J. (2004b). c-Cbl directs EGF receptors into an endocytic pathway that involves the ubiquitin-interacting motif of Eps15. *J. Cell Sci.* 117, 5001-5012.

De Melker,A.A., van der,H.G., and Borst,J. (2004a). Ubiquitin ligase activity of c-Cbl guides the epidermal growth factor receptor into clathrin-coated pits by two distinct modes of Eps15 recruitment. *J. Biol. Chem.* 279, 55465-55473.

De Waard,M., Liu,H., Walker,D., Scott,V.E., Gurnett,C.A., and Campbell,K.P. (1997). Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385, 446-450.

DeCamp,D.L., Thompson,T.M., de Sauvage,F.J., and Lerner,M.R. (2000). Smoothed activates G-protein-mediated signaling in frog melanophores. *J. Biol. Chem.* 275, 26322-26327.

DeFea,K.A., Vaughn,Z.D., O'Bryan,E.M., Nishijima,D., Dery,O., and Bunnett,N.W. (2000a). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 11086-11091.

DeFea,K.A., Zalevsky,J., Thoma,M.S., Dery,O., Mullins,R.D., and Bunnett,N.W. (2000b). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell Biol.* 148, 1267-1281.

Devaux,P.F. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30, 1163-1173.

- Devaux,P.F. and Morris,R. (2004). Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*. 5, 241-246.
- Devoto,A., Hartmann,H.A., Piffanelli,P., Elliott,C., Simmons,C., Taramino,G., Goh,C.S., Cohen,F.E., Emerson,B.C., Schulze-Lefert,P., and Panstruga,R. (2003). Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. *J. Mol. Evol.* 56, 77-88.
- Di Guglielmo,G.M., Le Roy,C., Goodfellow,A.F., and Wrana,J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* 5, 410-421.
- Dietrich,C., Yang,B., Fujiwara,T., Kusumi,A., and Jacobson,K. (2002). Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys. J.* 82, 274-284.
- Diverse-Pierluissi,M., McIntire,W.E., Myung,C.S., Lindorfer,M.A., Garrison,J.C., Goy,M.F., and Dunlap,K. (2000). Selective coupling of G protein beta gamma complexes to inhibition of Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 275, 28380-28385.
- Diverse-Pierluissi,M., Remmers,A.E., Neubig,R.R., and Dunlap,K. (1997). Novel form of crosstalk between G protein and tyrosine kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 5417-5421.
- Diviani,D., Lattion,A.L., Abuin,L., Staub,O., and Cotecchia,S. (2003). The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 278, 19331-19340.
- Dolphin,A.C. (2003). G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 55, 607-627.
- Douppnik,C.A., Davidson,N., and Lester,H.A. (1995). The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 268-277.
- Douppnik,C.A., Davidson,N., Lester,H.A., and Kofuji,P. (1997). RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of gbetagamma-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 10461-10466.
- Dulac,C. and Axel,R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195-206.
- Dupree,P., Parton,R.G., Raposo,G., Kurzchalia,T.V., and Simons,K. (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.* 12, 1597-1605.

Dutar,P. and Nicoll,R.A. (1988b). A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. *Nature* 332, 156-158.

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

Edidin,M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 257-283.

Ehrlich,M., Boll,W., Van Oijen,A., Hariharan,R., Chandran,K., Nibert,M.L., and Kirchhausen,T. (2004). Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 118, 591-605.

Ellis,R.J. (2001). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 114-119.

Engisch,K.L., Wagner,J.J., and Alger,B.E. (1996). Whole-cell voltage-clamp investigation of the role of PKC in muscarinic inhibition of IAHP in rat CA1 hippocampal neurons. *Hippocampus* 6, 183-191.

Enz,R. and Croci,C. (2003). Different binding motifs in metabotropic glutamate receptor type 7b for filamin A, protein phosphatase 1C, protein interacting with protein kinase C (PICK) 1 and syntenin allow the formation of multimeric protein complexes. *Biochem. J.* 372, 183-191.

Epanand,R.M., Maekawa,S., Yip,C.M., and Epanand,R.F. (2001). Protein-induced formation of cholesterol-rich domains. *Biochemistry* 40, 10514-10521.

Evans,B.N., Rosenblatt,M.I., Mnayer,L.O., Oliver,K.R., and Dickerson,I.M. (2000). CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 31438-31443.

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

Farsad,K. and De Camilli,P. (2003). Mechanisms of membrane deformation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 372-381.

Felder,C.B., Graul,R.C., Lee,A.Y., Merkle,H.P., and Sadee,W. (1999). The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS. PharmSci.* 1, E2.

- Ferguson,S.S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* *53*, 1-24.
- Fernandez,I., Ying,Y., Albanesi,J., and Anderson,R.G. (2002). Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 11193-11198.
- Ferreira,S.A., Scott,C.J., Kuehl,D.E., and Jackson,G.L. (1996). Differential regulation of luteinizing hormone release by gamma-aminobutyric acid receptor subtypes in the arcuate-ventromedial region of the castrated ram. *Endocrinology* *137*, 3453-3460.
- Fletcher,J.E., Lindorfer,M.A., DeFilippo,J.M., Yasuda,H., Guilford,M., and Garrison,J.C. (1998). The G protein beta5 subunit interacts selectively with the Gq alpha subunit. *J. Biol. Chem.* *273*, 636-644.
- Foord,S.M. and Marshall,F.H. (1999). RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 184-187.
- Fotiadis,D., Liang,Y., Filipek,S., Saperstein,D.A., Engel,A., and Palczewski,K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* *421*, 127-128.
- Fotiadis,D., Liang,Y., Filipek,S., Saperstein,D.A., Engel,A., and Palczewski,K. (2004). The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett.* *564*, 281-288.
- Frauenfelder,H., Parak,F., and Young,R.D. (1988). Conformational substates in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* *17*, 451-479.
- Fredriksson,R., Lagerstrom,M.C., Lundin,L.G., and Schioth,H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* *63*, 1256-1272.
- Fredriksson,R. and Schioth,H.B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* *67*, 1414-1425.
- Freire,E. (2000). Can allosteric regulation be predicted from structure? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 11680-11682.
- Fritschy,J.M., Meskenaite,V., Weinmann,O., Honer,M., Benke,D., and Mohler,H. (1999). GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 761-768.

Fritschy,J.M., Sidler,C., Parpan,F., Gassmann,M., Kaupmann,K., Bettler,B., and Benke,D. (2004). Independent maturation of the GABA(B) receptor subunits GABA(B1) and GABA(B2) during postnatal development in rodent brain. *J. Comp Neurol.* 477, 235-252.

Fujiwara,T., Ritchie,K., Murakoshi,H., Jacobson,K., and Kusumi,A. (2002). Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.* 157, 1071-1081.

Fushimi,K., Sasaki,S., and Marumo,F. (1997). Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J. Biol. Chem.* 272, 14800-14804.

Gabilondo,A.M., Hegler,J., Krasel,C., Boivin-Jahns,V., Hein,L., and Lohse,M.J. (1997). A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic receptor is involved in receptor internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12285-12290.

Gabilondo,A.M., Krasel,C., and Lohse,M.J. (1996). Mutations of Tyr326 in the beta 2-adrenoceptor disrupt multiple receptor functions. *Eur. J. Pharmacol.* 307, 243-250.

Gage,R.M., Kim,K.A., Cao,T.T., and von Zastrow,M. (2001). A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 44712-44720.

Gaiarsa,J.L., Tseeb,V., and Ben Ari,Y. (1995). Postnatal development of pre- and postsynaptic GABAB-mediated inhibitions in the CA3 hippocampal region of the rat. *J. Neurophysiol.* 73, 246-255.

Gaidarov,I., Santini,F., Warren,R.A., and Keen,J.H. (1999). Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 1-7.

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

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

Galvez,T., Parmentier,M.L., Joly,C., Malitschek,B., Kaupmann,K., Kuhn,R., Bittiger,H., Froestl,W., Bettler,B., and Pin,J.P. (1999). Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J. Biol. Chem.* 274, 13362-13369.

Gao,H., Sun,Y., Wu,Y., Luan,B., Wang,Y., Qu,B., and Pei,G. (2004). Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol. Cell* *14*, 303-317.

Garcia,D.E., Li,B., Garcia-Ferreiro,R.E., Hernandez-Ochoa,E.O., Yan,K., Gautam,N., Catterall,W.A., Mackie,K., and Hille,B. (1998). G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca²⁺ channels. *J. Neurosci.* *18*, 9163-9170.

Gardner,S.M., Takamiya,K., Xia,J., Suh,J.G., Johnson,R., Yu,S., and Huganir,R.L. (2005). Calcium-permeable AMPA receptor plasticity is mediated by subunit-specific interactions with PICK1 and NSF. *Neuron* *45*, 903-915.

Garritsen,A., van Galen,P.J., and Simonds,W.F. (1993). The N-terminal coiled-coil domain of beta is essential for gamma association: a model for G-protein beta gamma subunit interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 7706-7710.

Gassmann,M., Haller,C., Stoll,Y., Aziz,S.A., Biermann,B., Mosbacher,J., Kaupmann,K., and Bettler,B. (2005). The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function. *Mol. Pharmacol.* *68*, 137-144.

Gassmann,M., Shaban,H., Vigot,R., Sansig,G., Haller,C., Barbieri,S., Humeau,Y., Schuler,V., Muller,M., Kinzel,B., Klebs,K., Schmutz,M., Froestl,W., Heid,J., Kelly,P.H., Gentry,C., Jatou,A.L., Van der,P.H., Mombereau,C., Lecourtier,L., Mosbacher,J., Cryan,J.F., Fritschy,J.M., Luthi,A., Kaupmann,K., and Bettler,B. (2004). Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J. Neurosci.* *24*, 6086-6097.

GERHART,J.C. and PARDEE,A.B. (1962). The enzymology of control by feedback inhibition. *J. Biol. Chem.* *237*, 891-896.

Gilman,A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* *56*, 615-649.

Gimpl,G., Burger,K., and Fahrenholz,F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* *36*, 10959-10974.

Girnit,L., Shenoy,S.K., Sehat,B., Vasilcanu,R., Girnit,A., Lefkowitz,R.J., and Larsson,O. (2005). {beta}-Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J. Biol. Chem.* *280*, 24412-24419.

Glenney,J.R., Jr. (1989). Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* *264*, 20163-20166.

Glenney, J.R., Jr. and Zokas, L. (1989). Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* *108*, 2401-2408.

Golub, T., Wacha, S., and Caroni, P. (2004). Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 542-550.

Gonzalez-Gaitan, M. (2003). Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 213-224.

Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* *383*, 447-450.

Goodsell, D.S. and Olson, A.J. (2000). Structural symmetry and protein function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *29*, 105-153.

Graber, S.G., Figler, R.A., and Garrison, J.C. (1992). Expression and purification of functional G protein alpha subunits using a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* *267*, 1271-1278.

Greger, I.H., Khatri, L., Kong, X., and Ziff, E.B. (2003). AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* *40*, 763-774.

Greger, I.H., Khatri, L., and Ziff, E.B. (2002). RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* *34*, 759-772.

Grovdal, L.M., Stang, E., Sorkin, A., and Madhus, I.H. (2004). Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation. *Exp. Cell Res.* *300*, 388-395.

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

Gu, C., Cali, J.J., and Cooper, D.M. (2002). Dimerization of mammalian adenylate cyclases. *Eur. J. Biochem.* *269*, 413-421.

Gurevich, V.V. and Gurevich, E.V. (2003). The new face of active receptor bound arrestin attracts new partners. *Structure. (Camb.)* *11*, 1037-1042.

Gurevich, V.V. and Gurevich, E.V. (2004). The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 105-111.

Guzzi,F., Zanchetta,D., Cassoni,P., Guzzi,V., Francolini,M., Parenti,M., and Chini,B. (2002). Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene* 21, 1658-1667.

Hagen,D.C., McCaffrey,G., and Sprague,G.F., Jr. (1986). Evidence the yeast STE3 gene encodes a receptor for the peptide pheromone a factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 1418-1422.

Haglund,K., Sigismund,S., Polo,S., Szymkiewicz,I., Di Fiore,P.P., and Dikic,I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* 5, 461-466.

Hall,D. and Minton,A.P. (2003). Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges. *Biochim. Biophys. Acta* 1649, 127-139.

Hall,R.A., Premont,R.T., Chow,C.W., Blitzer,J.T., Pitcher,J.A., Claing,A., Stoffel,R.H., Barak,L.S., Shenolikar,S., Weinman,E.J., Grinstein,S., and Lefkowitz,R.J. (1998). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392, 626-630.

Hamm,H.E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 4819-4821.

Han,M., Gurevich,V.V., Vishnivetskiy,S.A., Sigler,P.B., and Schubert,C. (2001). Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure. (Camb.)* 9, 869-880.

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

Hanlon,M.R., Berrow,N.S., Dolphin,A.C., and Wallace,B.A. (1999). Modelling of a voltage-dependent Ca²⁺ channel beta subunit as a basis for understanding its functional properties. *FEBS Lett.* 445, 366-370.

Hanoune,J. and Defer,N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 145-174.

Hartwell,L.H. (1980). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone. *J. Cell Biol.* 85, 811-822.

He,C., Yan,X., Zhang,H., Mirshahi,T., Jin,T., Huang,A., and Logothetis,D.E. (2002). Identification of critical residues controlling G protein-gated inwardly rectifying K(+) channel activity through interactions with the beta gamma subunits of G proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 6088-6096.

He,C., Zhang,H., Mirshahi,T., and Logothetis,D.E. (1999). Identification of a potassium channel site that interacts with G protein betagamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 12517-12524.

He,H.J., Kole,S., Kwon,Y.K., Crow,M.T., and Bernier,M. (2003). Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 27096-27104.

Heger,S., Seney,M., Bless,E., Schwarting,G.A., Bilger,M., Mungenast,A., Ojeda,S.R., and Tobet,S.A. (2003). Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice. *Endocrinology* 144, 2566-2579.

Hemler,M.E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 397-422.

Herlitze,S., Garcia,D.E., Mackie,K., Hille,B., Scheuer,T., and Catterall,W.A. (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 258-262.

Herlitze,S., Hockerman,G.H., Scheuer,T., and Catterall,W.A. (1997). Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel alpha1A subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1512-1516.

Hicke,L. (1997). Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J.* 11, 1215-1226.

Hicke,L. (2001a). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527-530.

Hicke,L. (2001b). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 195-201.

Hicke,L. and Dunn,R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 141-172.

Hicke,L. and Riezman,H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-287.

Hilaiet,S., Foord,S.M., Marshall,F.H., and Bouvier,M. (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.

Hill,C.A., Fox,A.N., Pitts,R.J., Kent,L.B., Tan,P.L., Chrystal,M.A., Cravchik,A., Collins,F.H., Robertson,H.M., and Zwiebel,L.J. (2002). G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 176-178.

Hill,D.R. and Bowery,N.G. (1981). 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290, 149-152.

Hirono,M., Yoshioka,T., and Konishi,S. (2001). GABA(B) receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* 4, 1207-1216.

Hirsch,J.A., Schubert,C., Gurevich,V.V., and Sigler,P.B. (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* 97, 257-269.

Hjalm,G., MacLeod,R.J., Kifor,O., Chattopadhyay,N., and Brown,E.M. (2001). Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 34880-34887.

Hoffmann,C., Gaietta,G., Bunemann,M., Adams,S.R., Oberdorff-Maass,S., Behr,B., Vilardaga,J.P., Tsien,R.Y., Ellisman,M.H., and Lohse,M.J. (2005). A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat. Methods* 2, 171-176.

Holthuis,J.C. and Levine,T.P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 209-220.

Honing,S., Ricotta,D., Krauss,M., Spate,K., Spolaore,B., Motley,A., Robinson,M., Robinson,C., Haucke,V., and Owen,D.J. (2005). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol. Cell* 18, 519-531.

Hsu,S.C., Hazuka,C.D., Foletti,D.L., and Scheller,R.H. (1999). Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol.* 9, 150-153.

Hu,B., Nakata,H., Gu,C., De Beer,T., and Cooper,D.M. (2002). A critical interplay between Ca²⁺ inhibition and activation by Mg²⁺ of AC5 revealed by mutants and chimeric constructs. *J. Biol. Chem.* 277, 33139-33147.

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

Huang,Y., Man,H.Y., Sekine-Aizawa,Y., Han,Y., Juluri,K., Luo,H., Cheah,J., Lowenstein,C., Huganir,R.L., and Snyder,S.H. (2005). S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Neuron* 46, 533-540.

Hupfeld,C.J., Resnik,J.L., Ugi,S., and Olefsky,J.M. (2005). Insulin-induced beta-arrestin1 Ser-412 phosphorylation is a mechanism for desensitization of ERK activation by G α phai-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 1016-1023.

Hur,E.M., Park,Y.S., Lee,B.D., Jang,I.H., Kim,H.S., Kim,T.D., Suh,P.G., Ryu,S.H., and Kim,K.T. (2004). Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src. Implications for a role of lipid microdomains. *J. Biol. Chem.* 279, 5852-5860.

Husi,H., Ward,M.A., Choudhary,J.S., Blackstock,W.P., and Grant,S.G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.* 3, 661-669.

Huynh,H., Bottini,N., Williams,S., Cherepanov,V., Musumeci,L., Saito,K., Bruckner,S., Vachon,E., Wang,X., Kruger,J., Chow,C.W., Pellicchia,M., Monosov,E., Greer,P.A., Trimble,W., Downey,G.P., and Mustelin,T. (2004). Control of vesicle fusion by a tyrosine phosphatase. *Nat. Cell Biol.* 6, 831-839.

Hynes,T.R., Mervine,S.M., Yost,E.A., Sabo,J.L., and Berlot,C.H. (2004). Live cell imaging of G α s and the beta2-adrenergic receptor demonstrates that both alphas and beta1gamma7 internalize upon stimulation and exhibit similar trafficking patterns that differ from that of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 44101-44112.

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

Iino,R., Koyama,I., and Kusumi,A. (2001). Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys. J.* 80, 2667-2677.

Ikeda,S.R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 255-258.

Innamorati,G., Sadeghi,H.M., Tran,N.T., and Birnbaumer,M. (1998). A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2222-2226.

Inoue,M., Chang,L., Hwang,J., Chiang,S.H., and Saltiel,A.R. (2003). The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* 422, 629-633.

Inoue,T., Nielsen,S., Mandon,B., Terris,J., Kishore,B.K., and Knepper,M.A. (1998). SNAP-23 in rat kidney: colocalization with aquaporin-2 in collecting duct vesicles. *Am. J. Physiol* 275, F752-F760.

Isomoto,S., Kaibara,M., Sakurai-Yamashita,Y., Nagayama,Y., Uezono,Y., Yano,K., and Taniyama,K. (1998). Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABAB receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 10-15.

Itoh,K., Sakakibara,M., Yamasaki,S., Takeuchi,A., Arase,H., Miyazaki,M., Nakajima,N., Okada,M., and Saito,T. (2002). Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J. Immunol.* 168, 541-544.

Jackson,C.L. and Casanova,J.E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 10, 60-67.

Jan,L.Y. and Jan,Y.N. (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 91-123.

Jarvis,S.E., Magga,J.M., Beedle,A.M., Braun,J.E., and Zamponi,G.W. (2000). G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and Gbetagamma. *J. Biol. Chem.* 275, 6388-6394.

Jarvis,S.E. and Zamponi,G.W. (2001). Distinct molecular determinants govern syntaxin 1A-mediated inactivation and G-protein inhibition of N-type calcium channels. *J. Neurosci.* 21, 2939-2948.

Javitch,J.A. (2004). The ants go marching two by two: oligomeric structure of G-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 66, 1077-1082.

Jiao,X., Zhang,N., Xu,X., Oppenheim,J.J., and Jin,T. (2005). Ligand-induced partitioning of human CXCR1 chemokine receptors with lipid raft microenvironments facilitates G-protein-dependent signaling. *Mol. Cell Biol.* 25, 5752-5762.

Jing,J., Chikvashvili,D., Singer-Lahat,D., Thornhill,W.B., Reuveny,E., and Lotan,I. (1999). Fast inactivation of a brain K⁺ channel composed of Kv1.1 and Kvbeta1.1 subunits modulated by G protein beta gamma subunits. *EMBO J.* *18*, 1245-1256.

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

Josefsson,L.G. (1999). Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. *Gene* *239*, 333-340.

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

Kanai,F., Marignani,P.A., Sarbassova,D., Yagi,R., Hall,R.A., Donowitz,M., Hisaminato,A., Fujiwara,T., Ito,Y., Cantley,L.C., and Yaffe,M.B. (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* *19*, 6778-6791.

Kanzaki,M. and Pessin,J.E. (2003). Insulin signaling: GLUT4 vesicles exit via the exocyst. *Curr. Biol.* *13*, R574-R576.

Katanaev,V.L., Ponzielli,R., Semeriva,M., and Tomlinson,A. (2005). Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* *120*, 111-122.

Katsura,T., Gustafson,C.E., Ausiello,D.A., and Brown,D. (1997). Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol* *272*, F817-F822.

Kaufman,R.J. (2004). Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 152-158.

Kaupmann,K., Huggel,K., Heid,J., Flor,P.J., Bischoff,S., Mickel,S.J., McMaster,G., Angst,C., Bittiger,H., Froestl,W., and Bettler,B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* *386*, 239-246.

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

Kaupmann,K., Schuler,V., Mosbacher,J., Bischoff,S., Bittiger,H., Heid,J., Froestl,W., Leonhard,S., Pfaff,T., Karschin,A., and Bettler,B. (1998b). Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14991-14996.

Kenakin,T. (2004). Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 186-192.

Kenakin,T. and Onaran,O. (2002). The ligand paradox between affinity and efficacy: can you be there and not make a difference? *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 275-280.

Kent,R.S., De Lean,A., and Lefkowitz,R.J. (1980). A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol. Pharmacol.* 17, 14-23.

Kenworthy,A.K., Nichols,B.J., Remmert,C.L., Hendrix,G.M., Kumar,M., Zimmerberg,J., and Lippincott-Schwartz,J. (2004). Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J. Cell Biol.* 165, 735-746.

Kenworthy,A.K., Petranova,N., and Edidin,M. (2000). High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Biol. Cell* 11, 1645-1655.

Kern,D. and Zuiderweg,E.R. (2003). The role of dynamics in allosteric regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 748-757.

Keyel,P.A. and Traub,L.M. (2004). Clathrin: now you see me, now you don't! *Dev. Cell* 7, 283-284.

Keys,D.N., Lewis,D.L., Selegue,J.E., Pearson,B.J., Goodrich,L.V., Johnson,R.L., Gates,J., Scott,M.P., and Carroll,S.B. (1999). Recruitment of a hedgehog regulatory circuit in butterfly eyespot evolution. *Science* 283, 532-534.

Kifor,O., Diaz,R., Butters,R., Kifor,I., and Brown,E.M. (1998). The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J. Biol. Chem.* 273, 21708-21713.

Kim,J., Ahn,S., Guo,R., and Daaka,Y. (2003). Regulation of epidermal growth factor receptor internalization by G protein-coupled receptors. *Biochemistry* 42, 2887-2894.

Kim,J., Ahn,S., Ren,X.R., Whalen,E.J., Reiter,E., Wei,H., and Lefkowitz,R.J. (2005b). Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 1442-1447.

Kim,K.M., Gainetdinov,R.R., Laporte,S.A., Caron,M.G., and Barak,L.S. (2005a). G protein-coupled receptor kinase regulates dopamine D3 receptor signaling by modulating the stability of a receptor-filamin-beta-arrestin complex. A case of autoreceptor regulation. *J. Biol. Chem.* *280*, 12774-12780.

Kim,P.S. and Arvan,P. (1998). Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocr. Rev.* *19*, 173-202.

Kim,P.S., Hossain,S.A., Park,Y.N., Lee,I., Yoo,S.E., and Arvan,P. (1998). A single amino acid change in the acetylcholinesterase-like domain of thyroglobulin causes congenital goiter with hypothyroidism in the cog/cog mouse: a model of human endoplasmic reticulum storage diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 9909-9913.

Kirchhausen,T. (2000). Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 699-727.

Kisselev,O., Ermolaeva,M., and Gautam,N. (1995a). Efficient interaction with a receptor requires a specific type of prenyl group on the G protein gamma subunit. *J. Biol. Chem.* *270*, 25356-25358.

Kisselev,O., Pronin,A., Ermolaeva,M., and Gautam,N. (1995b). Receptor-G protein coupling is established by a potential conformational switch in the beta gamma complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 9102-9106.

Klapisz,E., Sorokina,I., Lemeer,S., Pijnenburg,M., Verkleij,A.J., and van Bergen en Henegouwen PM (2002). A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *J. Biol. Chem.* *277*, 30746-30753.

Knall,C. and Johnson,G.L. (1998). G-protein regulatory pathways: rocketing into the twenty-first century. *J. Cell Biochem. Suppl* *30-31*, 137-146.

Knoblich,J.A. (2001). Asymmetric cell division during animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 11-20.

Kohout,T.A., Nicholas,S.L., Perry,S.J., Reinhart,G., Junger,S., and Struthers,R.S. (2004). Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2

activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J. Biol. Chem.* *279*, 23214-23222.

Kolakowski,L.F., Jr. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors. Channels* *2*, 1-7.

Koshland,D.E., Jr. and Hamadani,K. (2002). Proteomics and models for enzyme cooperativity. *J. Biol. Chem.* *277*, 46841-46844.

Koshland,D.E., Jr., Nemethy,G., and Filmer,D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* *5*, 365-385.

Kristiansen,K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* *103*, 21-80.

Ktistakis,N.T., Brown,H.A., Waters,M.G., Sternweis,P.C., and Roth,M.G. (1996). Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J. Cell Biol.* *134*, 295-306.

Kubo,Y., Baldwin,T.J., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* *362*, 127-133.

Kunapuli,P., Onorato,J.J., Hosey,M.M., and Benovic,J.L. (1994). Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J. Biol. Chem.* *269*, 1099-1105.

Kuner,R., Kohr,G., Grunewald,S., Eisenhardt,G., Bach,A., and Kornau,H.C. (1999). Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* *283*, 74-77.

Kunishima,N., Shimada,Y., Tsuji,Y., Sato,T., Yamamoto,M., Kumasaka,T., Nakanishi,S., Jingami,H., and Morikawa,K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* *407*, 971-977.

Kunkel,M.T. and Peralta,E.G. (1995). Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels. *Cell* *83*, 443-449.

Kurzchalia,T.V., Dupree,P., Parton,R.G., Kellner,R., Virta,H., Lehnert,M., and Simons,K. (1992). VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* *118*, 1003-1014.

Kusumi,A., Nakada,C., Ritchie,K., Murase,K., Suzuki,K., Murakoshi,H., Kasai,R.S., Kondo,J., and Fujiwara,T. (2005). Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *34*, 351-378.

Laflamme,M.A. and Becker,P.L. (1998). Do beta 2-adrenergic receptors modulate Ca²⁺ in adult rat ventricular myocytes? *Am. J. Physiol* *274*, H1308-H1314.

Lafont,F. and Simons,K. (2001). Raft-partitioning of the ubiquitin ligases Cbl and Nedd4 upon IgE-triggered cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 3180-3184.

Lafont,F., Verkade,P., Galli,T., Wimmer,C., Louvard,D., and Simons,K. (1999). Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 3734-3738.

Lamaze,C., Dujeancourt,A., Baba,T., Lo,C.G., Benmerah,A., and Dautry-Varsat,A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* *7*, 661-671.

Lambright,D.G., Sondek,J., Bohm,A., Skiba,N.P., Hamm,H.E., and Sigler,P.B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* *379*, 311-319.

Lanier,S.M. (2004). AGS proteins, GPR motifs and the signals processed by heterotrimeric G proteins. *Biol. Cell* *96*, 369-372.

Laporte,S.A., Oakley,R.H., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (2000). The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* *275*, 23120-23126.

Laporte,S.A., Oakley,R.H., Zhang,J., Holt,J.A., Ferguson,S.S., Caron,M.G., and Barak,L.S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 3712-3717.

Laszlo,F.A., Laszlo,F., Jr., and De Wied,D. (1991). Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. *Pharmacol. Rev.* *43*, 73-108.

Lau,A.G. and Hall,R.A. (2001). Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry* *40*, 8572-8580.

Laux,T., Fukami,K., Thelen,M., Golub,T., Frey,D., and Caroni,P. (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell Biol.* *149*, 1455-1472.

Le Roy,C. and Wrana,J.L. (2005). *Clat.* *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 112-126.

Le,P.U., Guay,G., Altschuler,Y., and Nabi,I.R. (2002). Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *277*, 3371-3379.

Lee-Kwon,W., Kim,J.H., Choi,J.W., Kawano,K., Cha,B., Dartt,D.A., Zoukhri,D., and Donowitz,M. (2003). Ca²⁺-dependent inhibition of NHE3 requires PKC alpha which binds to E3KARP to decrease surface NHE3 containing plasma membrane complexes. *Am. J. Physiol Cell Physiol* *285*, C1527-C1536.

Lee,M.C., Miller,E.A., Goldberg,J., Orci,L., and Schekman,R. (2004a). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 87-123.

Lee,S.H., Simonetta,A., and Sheng,M. (2004b). Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* *43*, 221-236.

Lee,S.J. and Montell,C. (2004). Light-dependent translocation of visual arrestin regulated by the NINAC myosin III. *Neuron* *43*, 95-103.

Lefkowitz,R.J., Cotecchia,S., Samama,P., and Costa,T. (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* *14*, 303-307.

Lefkowitz,R.J., Mullikin,D., and Caron,M.G. (1976). Regulation of beta-adrenergic receptors by guanyl-5'-yl imidodiphosphate and other purine nucleotides. *J. Biol. Chem.* *251*, 4686-4692.

Lefkowitz,R.J. and Shenoy,S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* *308*, 512-517.

Legendre-Guillemin,V., Wasiak,S., Hussain,N.K., Angers,A., and McPherson,P.S. (2004). ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J. Cell Sci.* *117*, 9-18.

Legler,D.F., Micheau,O., Doucey,M.A., Tschopp,J., and Bron,C. (2003). Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity.* *18*, 655-664.

Lei,Q., Jones,M.B., Talley,E.M., Schrier,A.D., McIntire,W.E., Garrison,J.C., and Bayliss,D.A. (2000). Activation and inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein beta gamma subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 9771-9776.

Levkowitz,G., Waterman,H., Zamir,E., Kam,Z., Oved,S., Langdon,W.Y., Beguinot,L., Geiger,B., and Yarden,Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 12, 3663-3674.

Lezcano,N., Mrzljak,L., Eubanks,S., Levenson,R., Goldman-Rakic,P., and Bergson,C. (2000). Dual signaling regulated by calcyon, a D1 dopamine receptor interacting protein. *Science* 287, 1660-1664.

Li,M., Bermak,J.C., Wang,Z.W., and Zhou,Q.Y. (2000). Modulation of dopamine D(2) receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280). *Mol. Pharmacol.* 57, 446-452.

Li,M., Li,C., Weingarten,P., Bunzow,J.R., Grandy,D.K., and Zhou,Q.Y. (2002). Association of dopamine D(3) receptors with actin-binding protein 280 (ABP-280). *Biochem. Pharmacol.* 63, 859-863.

Li,X., Galli,T., Leu,S., Wade,J.B., Weinman,E.J., Leung,G., Cheong,A., Louvard,D., and Donowitz,M. (2001). Na⁺-H⁺ exchanger 3 (NHE3) is present in lipid rafts in the rabbit ileal brush border: a role for rafts in trafficking and rapid stimulation of NHE3. *J. Physiol* 537, 537-552.

Lin,F., Wang,H., and Malbon,C.C. (2000). Gravin-mediated formation of signaling complexes in beta 2-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *J. Biol. Chem.* 275, 19025-19034.

Lin,F.T., Miller,W.E., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (1999). Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 15971-15974.

Lin,R., Karpa,K., Kabbani,N., Goldman-Rakic,P., and Levenson,R. (2001). Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5258-5263.

Lindorfer,M.A., Myung,C.S., Savino,Y., Yasuda,H., Khazan,R., and Garrison,J.C. (1998). Differential activity of the G protein beta5 gamma2 subunit at receptors and effectors. *J. Biol. Chem.* 273, 34429-34436.

Littleton,J.T., Chapman,E.R., Kreber,R., Garment,M.B., Carlson,S.D., and Ganetzky,B. (1998). Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. *Neuron* 21, 401-413.

Logothetis,D.E., Kurachi,Y., Galper,J., Neer,E.J., and Clapham,D.E. (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325, 321-326.

Lohse,M.J., Benovic,J.L., Codina,J., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550.

Luby-Phelps,K. (2000). Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* 192, 189-221.

Luebke,A.E., Dahl,G.P., Roos,B.A., and Dickerson,I.M. (1996). Identification of a protein that confers calcitonin gene-related peptide responsiveness to oocytes by using a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3455-3460.

Luhmann,H.J. and Prince,D.A. (1991). Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 65, 247-263.

Luque,I., Leavitt,S.A., and Freire,E. (2002). The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 235-256.

Luscher,C., Jan,L.Y., Stoffel,M., Malenka,R.C., and Nicoll,R.A. (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19, 687-695.

Luttrell,D.K. and Luttrell,L.M. (2004). Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* 23, 7969-7978.

Luttrell,L.M., Daaka,Y., Della Rocca,G.J., and Lefkowitz,R.J. (1997). G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 31648-31656.

Luttrell,L.M., Ferguson,S.S., Daaka,Y., Miller,W.E., Maudsley,S., Della Rocca,G.J., Lin,F., Kawakatsu,H., Owada,K., Luttrell,D.K., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661.

Luttrell,L.M., Hawes,B.E., van Biesen,T., Luttrell,D.K., Lansing,T.J., and Lefkowitz,R.J. (1996). Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled rece. *J. Biol. Chem.* 271, 19443-19450.

Luttrell,L.M., Roudabush,F.L., Choy,E.W., Miller,W.E., Field,M.E., Pierce,K.L., and Lefkowitz,R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2449-2454.

- Macdonald,R.L. and Olsen,R.W. (1994). GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* *17*, 569-602.
- Mackay,V. and Manney,T.R. (1974b). Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of nonmating mutants. *Genetics* *76*, 255-271.
- Mackay,V. and Manney,T.R. (1974a). Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic analysis of nonmating mutants. *Genetics* *76*, 273-288.
- Maguire,M.E., Van Arsdale,P.M., and Gilman,A.G. (1976). An agonist-specific effect of guanine nucleotides on binding to the beta adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* *12*, 335-339.
- Manes,S., del Real,G., Lacalle,R.A., Lucas,P., Gomez-Mouton,C., Sanchez-Palomino,S., Delgado,R., Alcamí,J., Mira,E., and Martínez,A. (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep.* *1*, 190-196.
- Marchese,A. and Benovic,J.L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J. Biol. Chem.* *276*, 45509-45512.
- Marchese,A., Raiborg,C., Santini,F., Keen,J.H., Stenmark,H., and Benovic,J.L. (2003). The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev. Cell* *5*, 709-722.
- Margeta-Mitrovic,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* *27*, 97-106.
- Margeta-Mitrovic,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2001b). Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 14649-14654.
- Margeta-Mitrovic,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2001a). Ligand-induced signal transduction within heterodimeric GABA(B) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 14643-14648.
- Mark,M.D. and Herlitze,S. (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* *267*, 5830-5836.
- Marsh,L. and Herskowitz,I. (1988). STE2 protein of *Saccharomyces kluyveri* is a member of the rhodopsin/beta-adrenergic receptor family and is responsible for recognition of the peptide ligand alpha factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 3855-3859.

Martin,N.P., Lefkowitz,R.J., and Shenoy,S.K. (2003). Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J. Biol. Chem.* *278*, 45954-45959.

Martin,N.P., Whalen,E.J., Zamah,M.A., Pierce,K.L., and Lefkowitz,R.J. (2004). PKA-mediated phosphorylation of the beta1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cell Signal.* *16*, 1397-1403.

Mastick,C.C. and Falick,A.L. (1997). Association of N-ethylmaleimide sensitive fusion (NSF) protein and soluble NSF attachment proteins-alpha and -gamma with glucose transporter-4-containing vesicles in primary rat adipocytes. *Endocrinology* *138*, 2391-2397.

Matlack,K.E., Misselwitz,B., Plath,K., and Rapoport,T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* *97*, 553-564.

Matsui,T., Yonemura,S., Tsukita,S., and Tsukita,S. (1999). Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr. Biol.* *9*, 1259-1262.

Matsushita,K., Morrell,C.N., Cambien,B., Yang,S.X., Yamakuchi,M., Bao,C., Hara,M.R., Quick,R.A., Cao,W., O'Rourke,B., Lowenstein,J.M., Pevsner,J., Wagner,D.D., and Lowenstein,C.J. (2003). Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* *115*, 139-150.

Matveeva,E.A., Whiteheart,S.W., Vanaman,T.C., and Slevin,J.T. (2001). Phosphorylation of the N-ethylmaleimide-sensitive factor is associated with depolarization-dependent neurotransmitter release from synaptosomes. *J. Biol. Chem.* *276*, 12174-12181.

Maxfield,F.R. (2002). Plasma membrane microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 483-487.

Mayer,M.L. and Armstrong,N. (2004). Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu. Rev. Physiol* *66*, 161-181.

Mayor,S. and Rao,M. (2004). Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.* *5*, 231-240.

McCormick,D.A. (1989). GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* *62*, 1018-1027.

McDonald,P.H., Chow,C.W., Miller,W.E., Laporte,S.A., Field,M.E., Lin,F.T., Davis,R.J., and Lefkowitz,R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-1577.

McDonald,P.H., Cote,N.L., Lin,F.T., Premont,R.T., Pitcher,J.A., and Lefkowitz,R.J. (1999). Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 10677-10680.

McIntire,W.E., MacCleery,G., and Garrison,J.C. (2001). The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 15801-15809.

McLatchie,L.M., Fraser,N.J., Main,M.J., Wise,A., Brown,J., Thompson,N., Solari,R., Lee,M.G., and Foord,S.M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393, 333-339.

McMahon,H.T. and Mills,I.G. (2004b). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 379-391.

McMahon,H.T. and Mills,I.G. (2004a). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 379-391.

McNew,J.A., Parlati,F., Fukuda,R., Johnston,R.J., Paz,K., Paumet,F., Sollner,T.H., and Rothman,J.E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407, 153-159.

Medalia,O., Weber,I., Frangakis,A.S., Nicastro,D., Gerisch,G., and Baumeister,W. (2002). Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* 298, 1209-1213.

Mehta,A.K. and Ticku,M.K. (1999). An update on GABAA receptors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 29, 196-217.

Mercier,J.F., Salahpour,A., Angers,S., Breit,A., and Bouvier,M. (2002). Quantitative assessment of be. *J. Biol. Chem.* 277, 44925-44931.

Miaczynska,M., Pelkmans,L., and Zerial,M. (2004). Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 400-406.

- Miller,K.G., Emerson,M.D., McManus,J.R., and Rand,J.B. (2000). RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* 27, 289-299.
- Mineo,C., Gill,G.N., and Anderson,R.G. (1999). Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J. Biol. Chem.* 274, 30636-30643.
- Mineo,C., James,G.L., Smart,E.J., and Anderson,R.G. (1996). Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 11930-11935.
- Mitchell,D.C., Niu,S.L., and Litman,B.J. (2001). Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: kinetics of rhodopsin-transducin binding. *J. Biol. Chem.* 276, 42801-42806.
- Mitchell,D.C., Straume,M., Miller,J.L., and Litman,B.J. (1990). Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids. *Biochemistry* 29, 9143-9149.
- Moffett,S., Mouillac,B., Bonin,H., and Bouvier,M. (1993). Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J.* 12, 349-356.
- MONOD,J., WYMAN,J., and CHANGEUX,J.P. (1965). ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.
- 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.
- Morgan,A. and Burgoyne,R.D. (2004). Membrane traffic: controlling membrane fusion by modifying NSF. *Curr. Biol.* 14, R968-R970.
- Morrell,C.N., Matsushita,K., Chiles,K., Scharpf,R.B., Yamakuchi,M., Mason,R.J., Bergmeier,W., Mankowski,J.L., Baldwin,W.M., III, Faraday,N., and Lowenstein,C.J. (2005). Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 3782-3787.
- Motley,A., Bright,N.A., Seaman,M.N., and Robinson,M.S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* 162, 909-918.

Mundell,S.J., Pula,G., More,J.C., Jane,D.E., Roberts,P.J., and Kelly,E. (2004). Activation of cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the desensitization and internalization of metabotropic glutamate receptors 1a and 1b. *Mol. Pharmacol.* *65*, 1507-1516.

Muppidi,J.R., Tschopp,J., and Siegel,R.M. (2004). Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity.* *21*, 461-465.

Murakami,A., Yajima,T., Sakuma,H., McLaren,M.J., and Inana,G. (1993). X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett.* *334*, 203-209.

Murase,K., Fujiwara,T., Umemura,Y., Suzuki,K., Iino,R., Yamashita,H., Saito,M., Murakoshi,H., Ritchie,K., and Kusumi,A. (2004). Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys. J.* *86*, 4075-4093.

Murase,T. and Roldan,E.R. (1996). Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. *Biochem. J.* *320 (Pt 3)*, 1017-1023.

Murata,M., Peranen,J., Schreiner,R., Wieland,F., Kurzchalia,T.V., and Simons,K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 10339-10343.

Nabi,I.R. and Le,P.U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* *161*, 673-677.

Naga Prasad,S.V., Barak,L.S., Rapacciuolo,A., Caron,M.G., and Rockman,H.A. (2001). Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* *276*, 18953-18959.

Naga Prasad,S.V., Jayatilleke,A., Madamanchi,A., and Rockman,H.A. (2005). Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* *7*, 785-796.

Naga Prasad,S.V., Laporte,S.A., Chamberlain,D., Caron,M.G., Barak,L., and Rockman,H.A. (2002). Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J. Cell Biol.* *158*, 563-575.

Nair,K.S., Balasubramanian,N., and Slepak,V.Z. (2002). Signal-dependent translocation of transducin, RGS9-1-Gbeta5L complex, and arrestin to detergent-resistant membrane rafts in photoreceptors. *Curr. Biol.* *12*, 421-425.

Nakada,C., Ritchie,K., Oba,Y., Nakamura,M., Hotta,Y., Iino,R., Kasai,R.S., Yamaguchi,K., Fujiwara,T., and Kusumi,A. (2003). Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat. Cell Biol.* 5, 626-632.

Nakagawa,M., Orii,H., Yoshida,N., Jojima,E., Horie,T., Yoshida,R., Haga,T., and Tsuda,M. (2002). Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate. *Eur. J. Biochem.* 269, 5112-5118.

Nakashima,S. (2002). Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 669-675.

Neer,E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.

Nesterov,A., Kurten,R.C., and Gill,G.N. (1995a). Association of epidermal growth factor receptors with coated pit adaptins via a tyrosine phosphorylation-regulated mechanism. *J. Biol. Chem.* 270, 6320-6327.

Nesterov,A., Kurten,R.C., and Gill,G.N. (1995b). Association of epidermal growth factor receptors with coated pit adaptins via a tyrosine phosphorylation-regulated mechanism. *J. Biol. Chem.* 270, 6320-6327.

Nesterov,A., Wiley,H.S., and Gill,G.N. (1995c). Ligand-induced endocytosis of epidermal growth factor receptors that are defective in binding adaptor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8719-8723.

Ng,T.K. and Yung,K.K. (2001). Differential expression of GABA(B)R1 and GABA(B)R2 receptor immunoreactivity in neurochemically identified neurons of the rat neostriatum. *J. Comp Neurol.* 433, 458-470.

Nguyen,D.H. and Taub,D. (2002). CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J. Immunol.* 168, 4121-4126.

Nichols,B. (2003b). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* 116, 4707-4714.

Nichols,B.J. (2002a). A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 374-378.

Nichols,B.J. (2002b). A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 374-378.

- Nichols,B.J. (2003a). GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits. *Curr. Biol.* *13*, 686-690.
- Niehrs,C. and Pollet,N. (1999). Synexpression groups in eukaryotes. *Nature* *402*, 483-487.
- Nishimune,A., Isaac,J.T., Molnar,E., Noel,J., Nash,S.R., Tagaya,M., Collingridge,G.L., Nakanishi,S., and Henley,J.M. (1998). NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* *21*, 87-97.
- Niv,H., Gutman,O., Kloog,Y., and Henis,Y.I. (2002). Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J. Cell Biol.* *157*, 865-872.
- Noel,J., Ralph,G.S., Pickard,L., Williams,J., Molnar,E., Uney,J.B., Collingridge,G.L., and Henley,J.M. (1999). Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron* *23*, 365-376.
- Nossal,R. (2001). Energetics of clathrin basket assembly. *Traffic.* *2*, 138-147.
- Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* *274*, 32248-32257.
- Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J. Biol. Chem.* *276*, 19452-19460.
- Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Caron,M.G., and Barak,L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* *275*, 17201-17210.
- Oh,P. and Schnitzer,J.E. (2001). Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol. Biol. Cell* *12*, 685-698.
- Ohno,S. and Nishizuka,Y. (2002). Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem. (Tokyo)* *132*, 509-511.
- Olivares-Reyes,J.A., Shah,B.H., Hernandez-Aranda,J., Garcia-Caballero,A., Farshori,M.P., Garcia-Sainz,J.A., and Catt,K.J. (2005). Agonist-induced interactions between angiotensin AT1 and epidermal growth factor receptors. *Mol. Pharmacol.* *68*, 356-364.

Onaran,H.O. and Costa,T. (1997). Agonist efficacy and allosteric models of receptor action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 812, 98-115.

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

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

Ostrom,R.S., Gregorian,C., Drenan,R.M., Xiang,Y., Regan,J.W., and Insel,P.A. (2001). Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 276, 42063-42069.

Ostrom,R.S., Violin,J.D., Coleman,S., and Insel,P.A. (2000). Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 57, 1075-1079.

Owen,D.J. and Evans,P.R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* 282, 1327-1332.

Owens,D.F. and Kriegstein,A.R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 715-727.

Pagano,A., Rovelli,G., Mosbacher,J., Lohmann,T., Duthey,B., Stauffer,D., Ristig,D., Schuler,V., Meigel,I., Lampert,C., Stein,T., Prezeau,L., Blahos,J., Pin,J., Froestl,W., Kuhn,R., Heid,J., Kaupmann,K., and Bettler,B. (2001). C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J. Neurosci.* 21, 1189-1202.

Palczewski,K., Kumasaka,T., Hori,T., Behnke,C.A., Motoshima,H., Fox,B.A., Le,T., I, Teller,D.C., Okada,T., Stenkamp,R.E., Yamamoto,M., and Miyano,M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.

Park,J.Y., Ahn,H.J., Gu,J.G., Lee,K.H., Kim,J.S., Kang,H.W., and Lee,J.H. (2003). Molecular identification of Ca²⁺ channels in human sperm. *Exp. Mol. Med.* 35, 285-292.

Patel,T.B., Du,Z., Pierre,S., Cartin,L., and Scholich,K. (2001). Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269, 13-25.

Pelkmans,L., Burli,T., Zerial,M., and Helenius,A. (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118, 767-780.

Pelkmans,L., Fava,E., Grabner,H., Hannus,M., Habermann,B., Krausz,E., and Zerial,M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clat. *Nature* 436, 78-86.

Pelkmans,L. and Helenius,A. (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 414-422.

Pelkmans,L., Kartenbeck,J., and Helenius,A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3, 473-483.

Pelkmans,L., Puntener,D., and Helenius,A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296, 535-539.

Pelkmans,L. and Zerial,M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436, 128-133.

Perez,D.M. (2003). The evolutionarily triumphant G-protein-coupled receptor. *Mol. Pharmacol.* 63, 1202-1205.

Perroy,J., Adam,L., Qanbar,R., Chenier,S., and Bouvier,M. (2003). Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* 22, 3816-3824.

Perroy,J., El Far,O., Bertaso,F., Pin,J.P., Betz,H., Bockaert,J., and Fagni,L. (2002). PICK1 is required for the control of synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7. *EMBO J.* 21, 2990-2999.

Perry,S.J., Baillie,G.S., Kohout,T.A., McPhee,I., Magiera,M.M., Ang,K.L., Miller,W.E., McLean,A.J., Conti,M., Houslay,M.D., and Lefkowitz,R.J. (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* 298, 834-836.

Perutz,M.F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 228, 726-739.

Perutz,M.F., Wilkinson,A.J., Paoli,M., and Dodson,G.G. (1998). The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 1-34.

Pierce,K.L., Maudsley,S., Daaka,Y., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (2000). Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 1489-1494.

Pierce,K.L., Premont,R.T., and Lefkowitz,R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 639-650.

Pike,L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* *44*, 655-667.

Pin,J.P., Galvez,T., and Prezeau,L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* *98*, 325-354.

Piqueras,L. and Martinez,V. (2004). Peripheral GABAB agonists stimulate gastric acid secretion in mice. *Br. J. Pharmacol.* *142*, 1038-1048.

Pires-daSilva,A. and Sommer,R.J. (2003). The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 39-49.

Polo,S., Sigismund,S., Faretta,M., Guidi,M., Capua,M.R., Bossi,G., Chen,H., De Camilli,P., and Di Fiore,P.P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* *416*, 451-455.

Popik,W., Alce,T.M., and Au,W.C. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J. Virol.* *76*, 4709-4722.

Pralle,A., Keller,P., Florin,E.L., Simons,K., and Horber,J.K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* *148*, 997-1008.

Premont,R.T., Koch,W.J., Inglese,J., and Lefkowitz,R.J. (1994). Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* *269*, 6832-6841.

Premont,R.T., Macrae,A.D., Stoffel,R.H., Chung,N., Pitcher,J.A., Ambrose,C., Inglese,J., MacDonald,M.E., and Lefkowitz,R.J. (1996b). Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J. Biol. Chem.* *271*, 6403-6410.

Premont,R.T., Matsuoka,I., Mattei,M.G., Pouille,Y., Defer,N., and Hanoune,J. (1996a). Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* *271*, 13900-13907.

Prieto,J.C., Hueso,C., and Carmena,M.J. (1990). Modulation of the beta-adrenergic stimulation of cyclic AMP accumulation in rat prostatic epithelial cells by membrane fluidity. *Gen. Pharmacol.* *21*, 931-933.

Prior,I.A., Harding,A., Yan,J., Sluimer,J., Parton,R.G., and Hancock,J.F. (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat. Cell Biol.* *3*, 368-375.

Prior,I.A., Muncke,C., Parton,R.G., and Hancock,J.F. (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.* *160*, 165-170.

Puri,C., Tosoni,D., Comai,R., Rabellino,A., Segat,D., Caneva,F., Luzzi,P., Di Fiore,P.P., and Tacchetti,C. (2005). Relationships between EGFR signaling-competent and endocytosis-competent membrane microdomains. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2704-2718.

Pyenta,P.S., Holowka,D., and Baird,B. (2001). Cross-correlation analysis of inner-leaflet-anchored green fluorescent protein co-redistributed with IgE receptors and outer leaflet lipid raft components. *Biophys. J.* *80*, 2120-2132.

Qanbar,R. and Bouvier,M. (2003). Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* *97*, 1-33.

Qiu,J., Bosch,M.A., Tobias,S.C., Grandy,D.K., Scanlan,T.S., Ronnekleiv,O.K., and Kelly,M.J. (2003). Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J. Neurosci.* *23*, 9529-9540.

Racz,B., Blanpied,T.A., Ehlers,M.D., and Weinberg,R.J. (2004). Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* *7*, 917-918.

Raiborg,C., Bache,K.G., Gillooly,D.J., Madshus,I.H., Stang,E., and Stenmark,H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat. Cell Biol.* *4*, 394-398.

Raiborg,C., Rusten,T.E., and Stenmark,H. (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 446-455.

Ramjeesingh,M., Kidd,J.F., Huan,L.J., Wang,Y., and Bear,C.E. (2003b). Dimeric cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exists in the plasma membrane. *Biochem. J.* *374*, 793-797.

Ramjeesingh,M., Ugwu,F., Li,C., Dhani,S., Huan,L.J., Wang,Y., and Bear,C.E. (2003a). Stable dimeric assembly of the second membrane-spanning domain of CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) reconstitutes a chloride-selective pore. *Biochem. J.* *375*, 633-641.

Ramoino,P., Fronte,P., Beltrame,F., Diaspro,A., Fato,M., Raiteri,L., Stigliani,S., and Usai,C. (2003). Swimming behavior regulation by GABAB receptors in Paramecium. *Exp. Cell Res.* *291*, 398-405.

Randhawa,V.K., Thong,F.S., Lim,D.Y., Li,D., Garg,R.R., Rudge,R., Galli,T., Rudich,A., and Klip,A. (2004). Insulin and hypertonicity recruit GLUT4 to the plasma membrane of muscle cells by using N-ethylmaleimide-sensitive factor-dependent SNARE mechanisms but different v-SNAREs: role of TI-VAMP. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5565-5573.

Rapacciuolo,A., Suvarna,S., Barki-Harrington,L., Luttrell,L.M., Cong,M., Lefkowitz,R.J., and Rockman,H.A. (2003). Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J. Biol. Chem.* *278*, 35403-35411.

Rapoport,I., Miyazaki,M., Boll,W., Duckworth,B., Cantley,L.C., Shoelson,S., and Kirchhausen,T. (1997). Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *EMBO J.* *16*, 2240-2250.

Raposo,G., Dunia,I., Delavier-Klutchko,C., Kaveri,S., Strosberg,A.D., and Benedetti,E.L. (1989). Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur. J. Cell Biol.* *50*, 340-352.

Razani,B., Rubin,C.S., and Lisanti,M.P. (1999). Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J. Biol. Chem.* *274*, 26353-26360.

Razani,B., Woodman,S.E., and Lisanti,M.P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* *54*, 431-467.

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

Rechsteiner,M. and Rogers,S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 267-271.

Ren,X.R., Reiter,E., Ahn,S., Kim,J., Chen,W., and Lefkowitz,R.J. (2005). Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 1448-1453.

Restituito,S., Couve,A., Bawagan,H., Jourdain,S., Pangalos,M.N., Calver,A.R., Freeman,K.B., and Moss,S.J. (2005). Multiple motifs regulate the trafficking of GABA(B) receptors at distinct checkpoints within the secretory pathway. *Mol. Cell Neurosci.* *28*, 747-756.

Reversi,A., Rimoldi,V., Marrocco,T., Cassoni,P., Bussolati,G., Parenti,M., and Chini,B. (2005). The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a "biased agonist" mechanism. *J. Biol. Chem.* *280*, 16311-16318.

Richman,R.W., Strock,J., Hains,M.D., Cabanilla,N.J., Lau,K.K., Siderovski,D.P., and Diverse-Pierluissi,M. (2005). RGS12 interacts with the SNARE-binding region of the Cav2.2 calcium channel. *J. Biol. Chem.* *280*, 1521-1528.

Rimoldi,V., Reversi,A., Taverna,E., Rosa,P., Francolini,M., Cassoni,P., Parenti,M., and Chini,B. (2003). Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains. *Oncogene* *22*, 6054-6060.

Rishal,I., Porozov,Y., Yakubovich,D., Varon,D., and Dascal,N. (2005). Gbetagamma-dependent and Gbetagamma-independent basal activity of G protein-activated K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* *280*, 16685-16694.

Robertson,H.M. (1998). Two large families of chemoreceptor genes in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae* reveal extensive gene duplication, diversification, movement, and intron loss. *Genome Res.* *8*, 449-463.

Rockman,H.A., Koch,W.J., and Lefkowitz,R.J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* *415*, 206-212.

Rodriguez-Boulan,E., Kreitzer,G., and Musch,A. (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 233-247.

Rogers,S., Wells,R., and Rechsteiner,M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* *234*, 364-368.

Ross,E.M. and Wilkie,T.M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 795-827.

Rothberg,K.G., Heuser,J.E., Donzell,W.C., Ying,Y.S., Glenney,J.R., and Anderson,R.G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.

Rothman,J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.

Roux,A., Cappello,G., Cartaud,J., Prost,J., Goud,B., and Bassereau,P. (2002). A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 5394-5399.

Roy,S., Luetterforst,R., Harding,A., Apolloni,A., Etheridge,M., Stang,E., Rolls,B., Hancock,J.F., and Parton,R.G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat. Cell Biol.* 1, 98-105.

Roy,S., Wyse,B., and Hancock,J.F. (2002). H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol. Cell Biol.* 22, 5128-5140.

Rybin,V.O., Pak,E., Alcott,S., and Steinberg,S.F. (2003). Developmental changes in beta2-adrenergic receptor signaling in ventricular myocytes: the role of Gi proteins and caveolae microdomains. *Mol. Pharmacol.* 63, 1338-1348.

Rybin,V.O., Xu,X., Lisanti,M.P., and Steinberg,S.F. (2000). Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 41447-41457.

Saitoh,O., Kubo,Y., Miyatani,Y., Asano,T., and Nakata,H. (1997). RGS8 accelerates G-protein-mediated modulation of K⁺ currents. *Nature* 390, 525-529.

Sako,Y. and Kusumi,A. (1994). Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.* 125, 1251-1264.

Sako,Y., Nagafuchi,A., Tsukita,S., Takeichi,M., and Kusumi,A. (1998). Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 140, 1227-1240.

Salahpour,A., Angers,S., Mercier,J.F., Lagace,M., Marullo,S., and Bouvier,M. (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J. Biol. Chem.* 279, 33390-33397.

Salim,S., Sinnarajah,S., Kehrl,J.H., and Dessauer,C.W. (2003). Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *J. Biol. Chem.* 278, 15842-15849.

Sallese,M., Lombardi,M.S., and De Blasi,A. (1994). Two isoforms of G protein-coupled receptor kinase 4 identified by molecular cloning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *199*, 848-854.

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

Samama,P., Cotecchia,S., Costa,T., and Lefkowitz,R.J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* *268*, 4625-4636.

Scanziani,M., Capogna,M., Gahwiler,B.H., and Thompson,S.M. (1992). Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* *9*, 919-927.

Scarpace,P.J., O'Connor,S.W., and Abrass,I.B. (1985). Cholesterol modulation of beta-adrenergic receptor characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* *845*, 520-525.

Schaefer,M., Shevchenko,A., Shevchenko,A., and Knoblich,J.A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *10*, 353-362.

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

Schmidt,C.J., Thomas,T.C., Levine,M.A., and Neer,E.J. (1992). Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J. Biol. Chem.* *267*, 13807-13810.

Schnitzer,J.E., Liu,J., and Oh,P. (1995). Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J. Biol. Chem.* *270*, 14399-14404.

Scholic,K., Mullenix,J.B., Wittpoth,C., Poppleton,H.M., Pierre,S.C., Lindorfer,M.A., Garrison,J.C., and Patel,T.B. (1999). Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase. *Science* *283*, 1328-1331.

Schubert,C., Hirsch,J.A., Gurevich,V.V., Engelman,D.M., Sigler,P.B., and Fleming,K.G. (1999). Visual arrestin activity may be regulated by self-association. *J. Biol. Chem.* *274*, 21186-21190.

Schuler,V., Luscher,C., Blanchet,C., Klix,N., Sansig,G., Klebs,K., Schmutz,M., Heid,J., Gentry,C., Urban,L., Fox,A., Spooren,W., Jatou,A.L., Vigouret,J., Pozza,M., Kelly,P.H., Mosbacher,J., Froestl,W., Kaslin,E., Korn,R., Bischoff,S., Kaupmann,K., Van der,P.H., and Bettler,B. (2001). Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron* 31, 47-58.

Schweisguth,F. (2004). [Genetic basis of planar polarity]. *Med. Sci. (Paris)* 20, 424-430.

Schwencke,C., Okumura,S., Yamamoto,M., Geng,Y.J., and Ishikawa,Y. (1999). Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane. *J. Cell Biochem.* 75, 64-72.

Scott,K. and Zuker,C.S. (1998). Assembly of the *Drosophila* phototransduction cascade into a signalling complex shapes elementary responses. *Nature* 395, 805-808.

Seck,T., Baron,R., and Horne,W.C. (2003). Binding of filamin to the C-terminal tail of the calcitonin receptor controls recycling. *J. Biol. Chem.* 278, 10408-10416.

Sharma,P., Varma,R., Sarasij,R.C., Ira, Gousset,K., Krishnamoorthy,G., Rao,M., and Mayor,S. (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 116, 577-589.

Shenolikar,S., Minkoff,C.M., Steplock,D.A., Evangelista,C., Liu,M., and Weinman,E.J. (2001). N-terminal PDZ domain is required for NHERF dimerization. *FEBS Lett.* 489, 233-236.

Shenoy,S.K. and Lefkowitz,R.J. (2003). Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* 278, 14498-14506.

Shenoy,S.K. and Lefkowitz,R.J. (2005). Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.* 280, 15315-15324.

Shenoy,S.K., McDonald,P.H., Kohout,T.A., and Lefkowitz,R.J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307-1313.

Shi,Q.X., Yuan,Y.Y., and Roldan,E.R. (1997). gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 677-683.

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

Shichi,H. and Somers,R.L. (1978). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. Purification and properties of rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 253, 7040-7046.

Siderovski,D.P., Diverse-Pierluissi,M., and De Vries,L. (1999). The GoLoco motif: a Galphai/o binding motif and potential guanine-nucleotide exchange factor. *Trends Biochem. Sci.* 24, 340-341.

Sigismund,S., Woelk,T., Puri,C., Maspero,E., Tacchetti,C., Transidico,P., Di Fiore,P.P., and Polo,S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 2760-2765.

Silinsky,E.M. (2004). Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J. Physiol* 558, 389-401.

Simons,K. and Ikonen,E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

Simons,K. and Toomre,D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.

Simons,P.C., Pietromonaco,S.F., Reczek,D., Bretscher,A., and Elias,L. (1998). C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 561-565.

Singer,S.J. and Nicolson,G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.

Sinnarajah,S., Dessauer,C.W., Srikumar,D., Chen,J., Yuen,J., Yilma,S., Dennis,J.C., Morrison,E.E., Vodyanoy,V., and Kehrl,J.H. (2001). RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* 409, 1051-1055.

Smart,E.J., Ying,Y.S., Mineo,C., and Anderson,R.G. (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10104-10108.

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

Song,K.S., Scherer,P.E., Tang,Z., Okamoto,T., Li,S., Chafel,M., Chu,C., Kohtz,D.S., and Lisanti,M.P. (1996). Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271, 15160-15165.

Sorensen,S.D. and Conn,P.J. (2003). G protein-coupled receptor kinases regulate metabotropic glutamate receptor 5 function and expression. *Neuropharmacology* 44, 699-706.

Sorkin,A., Mazzotti,M., Sorkina,T., Scotto,L., and Beguinot,L. (1996a). Epidermal growth factor receptor interaction with clathrin adaptors is mediated by the Tyr974-containing internalization motif. *J. Biol. Chem.* 271, 13377-13384.

Sorkin,A., Mazzotti,M., Sorkina,T., Scotto,L., and Beguinot,L. (1996b). Epidermal growth factor receptor interaction with clathrin adaptors is mediated by the Tyr974-containing internalization motif. *J. Biol. Chem.* 271, 13377-13384.

Sorkin,A. and von Zastrow,M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 600-614.

Sourjik,V. (2004). Receptor clustering and signal processing in E. coli chemotaxis. *Trends Microbiol.* 12, 569-576.

Spafford,J.D. and Zamponi,G.W. (2003). Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 308-314.

Sprang,S.R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 639-678.

Spring,D.J. and Neer,E.J. (1994). A 14-amino acid region of the G protein gamma subunit is sufficient to confer selectivity of gamma binding to the beta subunit. *J. Biol. Chem.* 269, 22882-22886.

Stadel,J.M., DeLean,A., and Lefkowitz,R.J. (1980). A high affinity agonist . beta-adrenergic receptor complex is an intermediate for catecholamine stimulation of adenylate cyclase in turkey and frog erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 255, 1436-1441.

Stahlhut,M. and van Deurs,B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 11, 325-337.

Stang,E., Blystad,F.D., Kazacic,M., Bertelsen,V., Brodahl,T., Raiborg,C., Stenmark,H., and Madshus,I.H. (2004). Cbl-dependent ubiquitination is required for progression of EGF receptors into clathrin-coated pits. *Mol. Biol. Cell* 15, 3591-3604.

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

Steinberg,S.F. and Brunton,L.L. (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *41*, 751-773.

Stevens,R.C. and Lipscomb,W.N. (1992). A molecular mechanism for pyrimidine and purine nucleotide control of aspartate transcarbamoylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 5281-5285.

Steward GR. gamma-aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber?. *Science* *110*, 439-440. 2005.

Ref Type: Generic

Stoddart,A., Dykstra,M.L., Brown,B.K., Song,W., Pierce,S.K., and Brodsky,F.M. (2002). Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity.* *17*, 451-462.

Stoddart,A., Jackson,A.P., and Brodsky,F.M. (2005). Plasticity of B cell receptor internalization upon conditional depletion of clathrin. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2339-2348.

Stoffel,R.H., Randall,R.R., Premont,R.T., Lefkowitz,R.J., and Inglesse,J. (1994). Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J. Biol. Chem.* *269*, 27791-27794.

Stossel,T.P., Condeelis,J., Cooley,L., Hartwig,J.H., Noegel,A., Schleicher,M., and Shapiro,S.S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 138-145.

Strock,J. and Diverse-Pierluissi,M.A. (2004). Ca²⁺ channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. *Mol. Pharmacol.* *66*, 1071-1076.

Subczynski,W.K. and Kusumi,A. (2003). Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* *1610*, 231-243.

Sudhof TC. Σψναπσεσ. Stevens CF. John Hopkins univeristy press . 2005.
Ref Type: Generic

Suel,G.M., Lockless,S.W., Wall,M.A., and Ranganathan,R. (2003). Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 59-69.

Sunahara,R.K., Dessauer,C.W., Whisnant,R.E., Kleuss,C., and Gilman,A.G. (1997b). Interaction of G α with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* *272*, 22265-22271.

Sunahara,R.K., Tesmer,J.J., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1997a). Crystal structure of the adenylyl cyclase activator G α . *Science* 278, 1943-1947.

Suzuki,K., Ritchie,K., Kajikawa,E., Fujiwara,T., and Kusumi,A. (2005). Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys. J.* 88, 3659-3680.

Takesono,A., Cismowski,M.J., Ribas,C., Bernard,M., Chung,P., Hazard,S., III, Duzic,E., and Lanier,S.M. (1999). Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 33202-33205.

Tall,G.G., Krumins,A.M., and Gilman,A.G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 278, 8356-8362.

Tang,Z., Scherer,P.E., Okamoto,T., Song,K., Chu,C., Kohtz,D.S., Nishimoto,I., Lodish,H.F., and Lisanti,M.P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 2255-2261.

Taniyama,K., Niwa,M., Kataoka,Y., and Yamashita,K. (1993). Inhibition of the vesicular release of neurotransmitters by stimulation of GABAB receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 707, 496-499.

Tasken,K. and Aandahl,E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 84, 137-167.

Taussig,R. and Zimmermann,G. (1998). Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 32, 81-98.

Taylor,J.M., Jacob-Mosier,G.G., Lawton,R.G., Remmers,A.E., and Neubig,R.R. (1994). Binding of an alpha 2 adrenergic receptor third intracellular loop peptide to G beta and the amino terminus of G alpha. *J. Biol. Chem.* 269, 27618-27624.

Tesmer,J.J., Berman,D.M., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1997a). Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 89, 251-261.

Tesmer,J.J., Sunahara,R.K., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1997b). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* 278, 1907-1916.

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

Tolkovsky,A.M., Braun,S., and Levitzki,A. (1982). Kinetics of interaction between beta-receptors, GTP protein, and the catalytic unit of turkey erythrocyte adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 213-217.

Tolkovsky,A.M. and Levitzki,A. (1978). Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry* 17, 3795.

Tomes,C.N., Michaut,M., De Blas,G., Visconti,P., Matti,U., and Mayorga,L.S. (2002). SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 243, 326-338.

Tosetti,P., Turner,T., Lu,Q., and Dunlap,K. (2002). Unique isoform of Galpha -interacting protein (RGS-GAIP) selectively discriminates between two Go-mediated pathways that inhibit Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 277, 46001-46009.

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

Tsai,B., Ye,Y., and Rapoport,T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 246-255.

Ushio-Fukai,M., Hilenski,L., Santanam,N., Becker,P.L., Ma,Y., Griendling,K.K., and Alexander,R.W. (2001). Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells: role of cholesterol-rich microdomains and focal adhesions in angiotensin II signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 48269-48275.

Usui,I., Imamura,T., Huang,J., Satoh,H., Shenoy,S.K., Lefkowitz,R.J., Hupfeld,C.J., and Olefsky,J.M. (2004). beta-arrestin-1 competitively inhibits insulin-induced ubiquitination and degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol. Cell Biol.* 24, 8929-8937.

van Delft,S., Govers,R., Strous,G.J., Verkleij,A.J., and van Bergen en Henegouwen PM (1997). Epidermal growth factor induces ubiquitination of Eps15. *J. Biol. Chem.* 272, 14013-14016.

van Meer,G. and Sprong,H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 373-378.

Varma,R. and Mayor,S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394, 798-801.

- Vernon,E., Meyer,G., Pickard,L., Dev,K., Molnar,E., Collingridge,G.L., and Henley,J.M. (2001). GABA(B) receptors couple directly to the transcription factor ATF4. *Mol. Cell Neurosci.* *17*, 637-645.
- Vieira,A.V., Lamaze,C., and Schmid,S.L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* *274*, 2086-2089.
- Virlon,B., Firsov,D., Cheval,L., Reiter,E., Troispoux,C., Guillou,F., and Elalouf,J.M. (1998). Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants. *Endocrinology* *139*, 2784-2795.
- Vishnivetskiy,S.A., Paz,C.L., Schubert,C., Hirsch,J.A., Sigler,P.B., and Gurevich,V.V. (1999). How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J. Biol. Chem.* *274*, 11451-11454.
- Vorherr,T., Knopfel,L., Hofmann,F., Mollner,S., Pfeuffer,T., and Carafoli,E. (1993). The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase. *Biochemistry* *32*, 6081-6088.
- Vrljic,M., Nishimura,S.Y., Brasselet,S., Moerner,W.E., and McConnell,H.M. (2002). Translational diffusion of individual class II MHC membrane proteins in cells. *Biophys. J.* *83*, 2681-2692.
- Wada,Y., Yamashita,T., Imai,K., Miura,R., Takao,K., Nishi,M., Takeshima,H., Asano,T., Morishita,R., Nishizawa,K., Kokubun,S., and Nukada,T. (2000). A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K(+) channels by G-protein betagamma-subunits. *EMBO J.* *19*, 4915-4925.
- Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J., and Gay,N.J. (1982). Distantly related sequences in the a. *EMBO J.* *1*, 945-951.
- Wang,T.Y. and Silvius,J.R. (2001). Cholesterol does not induce segregation of liquid-ordered domains in bilayers modeling the inner leaflet of the plasma membrane. *Biophys. J.* *81*, 2762-2773.
- Wang,Y., Macke,J.P., Abella,B.S., Andreasson,K., Worley,P., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Nathans,J. (1996). A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene *frizzled*. *J. Biol. Chem.* *271*, 4468-4476.
- Wang,Y.J., Wang,J., Sun,H.Q., Martinez,M., Sun,Y.X., Macia,E., Kirchhausen,T., Albanesi,J.P., Roth,M.G., and Yin,H.L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* *114*, 299-310.

Ward,D.T., Hammond,T.G., and Harris,H.W. (1999). Modulation of vasopressin-elicited water transport by trafficking of aquaporin2-containing vesicles. *Annu. Rev. Physiol* *61*, 683-697.

Waterman,H., Levkowitz,G., Alroy,I., and Yarden,Y. (1999). The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* *274*, 22151-22154.

Watson,R.T., Kanzaki,M., and Pessin,J.E. (2004). Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr. Rev.* *25*, 177-204.

Wei,H., Ahn,S., Shenoy,S.K., Karnik,S.S., Hunyady,L., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 10782-10787.

Weiss,E.R., Raman,D., Shirakawa,S., Ducceschi,M.H., Bertram,P.T., Wong,F., Kraft,T.W., and Osawa,S. (1998). The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from. *Mol. Vis.* *4*, 27.

Weiss,J.M., Morgan,P.H., Lutz,M.W., and Kenakin,T.P. (1996). The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J. Theor. Biol.* *181*, 381-397.

Weissman,A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 169-178.

Wenk,M.R. and De Camilli,P. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 8262-8269.

Wenthold,R.J., Prybylowski,K., Standley,S., Sans,N., and Petralia,R.S. (2003). Trafficking of NMDA receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *43*, 335-358.

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

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

Whiteheart,S.W. and Kubalek,E.W. (1995). SNAPs and NSF: general members of the fusion apparatus. *Trends Cell Biol.* *5*, 64-68.

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

Wilde,A., Beattie,E.C., Lem,L., Riethof,D.A., Liu,S.H., Mobley,W.C., Soriano,P., and Brodsky,F.M. (1999). EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* *96*, 677-687.

Willard,F.S., Kimple,R.J., and Siderovski,D.P. (2004). Return of the GDI: the GoLoco motif in cell division. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 925-951.

Witherow,D.S., Garrison,T.R., Miller,W.E., and Lefkowitz,R.J. (2004). beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 8603-8607.

Wittpoth,C., Scholich,K., Yigzaw,Y., Stringfield,T.M., and Patel,T.B. (1999). Regions on adenylyl cyclase that are necessary for inhibition of activity by beta gamma and G(ialpha) subunits of heterotrimeric G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 9551-9556.

Wolynes,P.G. (1996). Symmetry and the energy landscapes of biomolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 14249-14255.

Wu,L.G. and Saggau,P. (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* *20*, 204-212.

Xia,J., Zhang,X., Staudinger,J., and Huganir,R.L. (1999). Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* *22*, 179-187.

Xiang,Y. and Kobilka,B. (2003). The PDZ-binding motif of the beta2-adrenoceptor is essential for physiologic signaling and trafficking in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 10776-10781.

Xiang,Y., Li,Y., Zhang,Z., Cui,K., Wang,S., Yuan,X.B., Wu,C.P., Poo,M.M., and Duan,S. (2002b). Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat. Neurosci.* *5*, 843-848.

Xiang,Y., Naro,F., Zoudilova,M., Jin,S.L., Conti,M., and Kobilka,B. (2005). Phosphodiesterase 4D is required for beta2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 909-914.

Xiang,Y., Rybin,V.O., Steinberg,S.F., and Kobilka,B. (2002a). Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 34280-34286.

Xiao,B., Tu,J.C., Petralia,R.S., Yuan,J.P., Doan,A., Breder,C.D., Ruggiero,A., Lanahan,A.A., Wenthold,R.J., and Worley,P.F. (1998). Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 21, 707-716.

Xiao,R.P., Ji,X., and Lakatta,E.G. (1995). Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 47, 322-329.

Xie,J., Murone,M., Luoh,S.M., Ryan,A., Gu,Q., Zhang,C., Bonifas,J.M., Lam,C.W., Hynes,M., Goddard,A., Rosenthal,A., Epstein,E.H., Jr., and de Sauvage,F.J. (1998). Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90-92.

Xu,Y., Piston,D.W., and Johnson,C.H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 151-156.

Yan,S.Z., Huang,Z.H., Andrews,R.K., and Tang,W.J. (1998). Conversion of forskolin-insensitive to forskolin-sensitive (mouse-type IX) adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 53, 182-187.

Yasuda,H., Lindorfer,M.A., Woodfork,K.A., Fletcher,J.E., and Garrison,J.C. (1996). Role of the prenyl group on the G protein gamma subunit in coupling trimeric G proteins to A1 adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 271, 18588-18595.

Yevenes,G.E., Peoples,R.W., Tapia,J.C., Parodi,J., Soto,X., Olate,J., and Aguayo,L.G. (2003). Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits. *Nat. Neurosci.* 6, 819-824.

Yuan,H., Michelsen,K., and Schwappach,B. (2003). 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr. Biol.* 13, 638-646.

Yun,C.H., Lamprecht,G., Forster,D.V., and Sidor,A. (1998). NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *J. Biol. Chem.* 273, 25856-25863.

Yun,C.H., Oh,S., Zizak,M., Steplock,D., Tsao,S., Tse,C.M., Weinman,E.J., and Donowitz,M. (1997). cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3010-3015.

Zaccolo,M. and Pozzan,T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295, 1711-1715.

Zacharias,D.A., Violin,J.D., Newton,A.C., and Tsien,R.Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-916.

Zamah,A.M., Delahunty,M., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 277, 31249-31256.

Zamponi,G.W., Bourinet,E., Nelson,D., Nargeot,J., and Snutch,T.P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 385, 442-446.

Zerial,M. and McBride,H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107-117.

Zhang,M. and Breitwieser,G.E. (2005). High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 280, 11140-11146.

Zheng,B., Lavoie,C., Tang,T.D., Ma,P., Meerloo,T., Beas,A., and Farquhar,M.G. (2004). Regulation of epidermal growth factor receptor degradation by heterotrimeric Galphas protein. *Mol. Biol. Cell* 15, 5538-5550.

Zheng,B., Ma,Y.C., Ostrom,R.S., Lavoie,C., Gill,G.N., Insel,P.A., Huang,X.Y., and Farquhar,M.G. (2001). RGS-PX1, a GAP for Galphas and sorting nexin in vesicular trafficking. *Science* 294, 1939-1942.

Zhou,Y.Y., Cheng,H., Bogdanov,K.Y., Hohl,C., Altschuld,R., Lakatta,E.G., and Xiao,R.P. (1997). Localized cAMP-dependent signaling mediates beta 2-adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Am. J. Physiol* 273, H1611-H1618.

Zhu,A.J., Zheng,L., Suyama,K., and Scott,M.P. (2003). Altered localization of Drosophila Smoothed protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev.* 17, 1240-1252.

Zou,S., Li,L., Pei,L., Vukusic,B., Van Tol,H.H., Lee,F.J., Wan,Q., and Liu,F. (2005). Protein-protein coupling/uncoupling enables dopamine D2 receptor regulation of AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *J. Neurosci.* 25, 4385-4395.